UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NATÁLIA BERTINI CONTIERI

**Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente
a isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da
cavidade bucal de gatos domésticos**

NATÁLIA BERTINI CONTIERI

**Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente
a isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da
cavidade bucal de gatos domésticos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof^a. Dra. Valéria Maria Lara Carregaro

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC762a Contieri, Natália Bertini
Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos
essenciais frente a isolados de *Staphylococcus* spp.
e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de ga
/ Natália Bertini Contieri ; orientadora Valéria
Maria Lara Carregaro. -- Pirassununga, 2017.
79 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Gatos domésticos sadios e com gengivite. 2.
Óleos essenciais. 3. *Staphylococcus* spp.. 4.
Pasteurella spp.. I. Carregaro, Valéria Maria Lara,
orient. II. Título.

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 74135 - 9206555 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Natália Bertini Contieri no Programa: Biociência Animal, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 18 dias do mês de setembro de 2017, no(a) Sala de aula do UDCH realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Natália Bertini Contieri, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a isolados de *Staphylococcus spp.* e *Pasteurella spp.* oriundas da cavidade bucal de gatos domésticos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Valéria Maria Lara Carregaro	Presidente	SEMVINCULO(FZEA)	Não Votante
Ricardo Luiz Moro de Sousa	Titular	FZEA - USP	<u>Aprovada</u>
Andréia Cristina Nakashima Vaz	Titular	Especialista-FZEA	<u>Aprovada</u>
Rosely Bianca dos Santos Kuroda	Titular	FMU - Externo	<u>Aprovada</u>

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 18 dias do mês de setembro de 2017.

Ricardo Luiz Moro de Sousa

Andréia Cristina Nakashima Vaz

Rosely Bianca dos Santos Kuroda

Valéria Maria Lara Carregaro
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 20.09.2017, e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Biociência Animal.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Profª. Drª. Rosemary Ap. de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

Aprovado "ad referendum" da CPG/FZEA
em 20 / 09 / 2017.

Dedicatória

Aos meus pais e minha irmã, por serem a base da minha vida e por me apoiarem durante esta etapa, permitindo que eu continuasse nessa caminhada, não me deixando desistir perante os obstáculos.

Agradecimentos

À Prof^ª. Dra. Valéria Maria Lara Carregaro por ter me acolhido, por tanta paciência e por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis e por todo apoio, conhecimentos transmitidos durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro por ter me auxiliado nesta etapa, fazendo com que eu conseguisse prosseguir no mestrado.

À Prof^ª Dra. Ana Maria Centola Vidal e a Prof^ª. Dra. Mariza Pires de Melo por terem cedido os laboratórios para que pudesse realizar as análises desse projeto e por todo auxílio prestado.

À Andréia Cristina Nakashima Vaz e Silvana Marina Piccolli Pugini, que sempre estavam presentes durante os momentos difíceis dos experimentos, me auxiliando e dando apoio para que continuasse.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA Pirassununga/SP e ao Programa de Biociência Animal, pela estrutura oferecida, a todos os professores pelos ensinamentos ministrados nas disciplinas, e a todos os funcionários que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos, por todo apoio e mensagens de encorajamento durante esta etapa vivida.

A Deus, por ter me dado as condições para ter chegado até aqui.

E para todas as pessoas, que de algum modo são importantes e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CONTIEIRI, N.B. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos. 2017, 79 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

As afecções bucais em gatos domésticos são causas frequentes de atendimento clínico. São enfermidades multifatoriais, cuja etiopatogenia ainda não foi elucidada. Contudo, acredita-se que o desequilíbrio da microbiota bucal e da resposta imune local resulte num processo inflamatório, que a longo prazo poderá interferir no comportamento do animal, ocasionar perda de dentes e levar até a morte. A microbiota bucal é composta por diferentes gêneros bacterianos, dentre estes destacam-se *Staphylococcus* spp. e a *Pasteurella* spp. O tratamento das afecções bucais é baseado no uso de antimicrobianos e anti-inflamatórios, porém há uma alta taxa de insucesso. Adicionalmente, como a escolha dos antimicrobianos na maioria das vezes é feita de maneira empírica e indiscriminada, existe a possibilidade de surgimento de bactérias multirresistentes. Desta maneira, nos últimos anos vários esforços foram realizados com intuito de superar o advento da resistência bacteriana e os produtos naturais possuem potencial para isto, dentre estes destacam-se os óleos essenciais de plantas. Visto isso, o presente estudo objetivou isolar e identificar cepas de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite. Posteriormente, os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana frente a seis óleos essenciais (OEs): *Citrus bergamia* (bergamota), *Anthemis nobile* (camomila romana), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Copaifera officinalis* (Copaíba), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree ou melaleuca). Os resultados mostraram que *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. estão presentes tanto na cavidade bucal de gatos sadios, quanto em animais com gengivite. Os OEs com melhor efetividade antimicrobiana frente a maioria dos isolados foram capim limão, cravo, melaleuca e camomila romana. Os achados obtidos no presente estudo foram similares a outras investigações anteriores. Já os OEs de copaíba e bergamota não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana. As discrepâncias observadas podem ser explicadas, principalmente, pelas diferenças de composição química, de concentração dos compostos químicos, pelo sinergismo entre eles, pela origem fitogeográfica e condições de cultivo da planta utilizada para obtenção dos OEs.

Palavras-chave: Gatos. Óleos essenciais. *Staphylococcus*. *Pasteurella*. Gengivite.

ABSTRACT

CONTIEIRI, N.B. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus* spp. and *Pasteurella* spp. from oral cavity of domestic cats. 2017, 79 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The oral affections in domestic cats are frequent causes of clinical care. These are multifactorial diseases, which etiopathogenesis has not been elucidated yet. However, believes that imbalanced oral microbiota and a immune response local results in the inflammatory process, which in a long term can cause various physical changes in the animal. The oral microbiota is composed of different bacterial genera, among these highlighting *Staphylococcus* spp. and the *Pasteurella* spp. The treatment of these affections is based on the use of antimicrobials and anti-inflammatories, but there is a high failure rate. In addition, the choice of antimicrobials is mostly done in a empirical and indiscriminate way, these is a possibility of appearance of multiresistant bacteria. In this way, in the last years several efforts have been made to overcome the advent bacterial resistance and natural products have potential for this. Among there are the essential oils. Then, the present study aimed to isolate and identify strains of *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. Of samples of oral cavity of healthy domestic cats and with gingivitis. Posteriorly, the isolates were submmited to the antimicrobial susceptibility test before the six essential oils (EOs): *Citrus bergamia* (bergamot), *Anthemis nobile* (roman chamomile), *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Copaifera officinalis* (Copaiba), *Eugenia caryophyllus* (clove) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree or melaleuca). The results showed that the *Staphylococcus* spp. and the *Pasteurella* spp are presented as soon in the oral cavity of healthy cats, as in animals with gingivitis. The EOs with better antimicrobial effectiveness against of the most of the isolates were *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Eugenia caryophyllus* (cloves), *Melaleuca alternifolia* (tea tree or melaleuca) and *Anthemis nobile* (roman chamomile). The findings obtained in the present study were similar to the others investigations. Then, the EOs of *Copaifera officinalis* (Copaiba) and *Citrus bergamia* (bergamot) did not present any antimicrobial action. The discrepancies can be explained, mainly, by differences in the chemical compositions, concentration of chemical compounds, by synergism among them, by phytogeographic origen and conditions of culture of plant utilized to obtain of EOs.

Key-words: Cats. Essential oils. *Staphylococcus*. *Pasteurella*. Gingivitis. Healthy.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Teste de difusão em ágar da cepa padrão de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) frente aos seis óleos essenciais em diferentes concentrações	40
Figura 2 - Teste de difusão em ágar de espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos sadios frente aos seis óleos essenciais.....	43
Figura 3 - Teste de difusão em ágar de espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite frente aos seis óleos essenciais.....	45
Figura 4- Teste de difusão em ágar de três espécies de <i>Pasteurella</i> isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos frente aos seis óleos essenciais.....	47
Figura 5 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos sadios.....	51
Figura 6 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite.....	53
Figura 7 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de <i>Pasteurella</i> spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais provas bioquímicas utilizadas para a diferenciação das espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> , segundo Jorgensen et al. (2015).....	30
Tabela 2 - Principais provas bioquímicas utilizadas para a diferenciação das espécies do gênero <i>Pasteurella</i> , segundo Jorgensen et al. (2015).....	31
Tabela 3 - Composição química dos seis óleos essenciais comerciais, da marca Arte dos Aromas Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil.....	33
Tabela 4 - Os principais microrganismos isolados de 43 amostras da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com diferentes graus de gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....	38
Tabela 5 - Resultados do teste de difusão em ágar da cepa padrão de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) frente aos seis óleos essenciais e à gentamicina.....	39
Tabela 6 - Resultados do teste de difusão em ágar das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos sadios, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....	42
Tabela 7 - Resultados do teste de difusão em ágar das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....	44
Tabela 8 - Resultados do teste de difusão em ágar para as espécies de <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Pasteurella aerogenes</i> e <i>Pasteurella stomatis</i> isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....	46
Tabela 9 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a <i>Staphylococcus</i> spp isolados de amostras bucais de gatos domésticos sadios, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....	50
Tabela 10 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a <i>Staphylococcus</i> spp isolados de amostras bucais de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo	52

Tabela 11 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Pasteurella* spp isoladas de amostras bucais de gatos domésticos sadios, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....54

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Pasteurella* spp isoladas de amostras bucais de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo.....55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 GENGIVITE E MICROBIOTA BUCAL.....	15
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	20
2.2.1 Óleo Essencial de Bergamota.....	22
2.2.2 Óleo Essencial de camomila romana.....	22
2.2.3 Óleo Essencial de capim limão.....	23
2.2.4 Óleo Essencial de Melaleuca.....	24
2.2.5 Óleo Essencial de Copaíba.....	25
2.2.6 Óleo Essencial de Cravo.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS.....	28
4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	28
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	29
4.3.1 Cultivo Bacteriano.....	29
4.3.2 Identificação do gênero e espécies de <i>Staphylococcus</i>	29
4.3.3 Identificação do gênero e espécies de <i>Pasteurella</i>	31
4.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE FRENTE AOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OES).....	32
4.4.1 Teste de Difusão em Ágar.....	32
4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34
4.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	35

5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A população de animais domésticos tem crescido nos últimos anos, em especial a população de gatos. De acordo com uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa (IBGE) em parceria com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet), mostrou que o Brasil tem a segunda maior população de animais domésticos do mundo, com 22,1 milhões de felinos, no ano de 2013. Desta maneira, uma das causas frequentes de atendimentos clínicos em gatos domésticos são as afecções bucais. Os sintomas comumente apresentados por esses animais são perda de apetite, disfagia, halitose, salivação excessiva, dificuldade de engolir, respirar e higienizar-se, perda de peso, sangramento bucal, desidratação, dor e agressividade, trazendo grande desconforto ao animal, dificultando a convivência com esses animais. É importante ressaltar que as afecções bucais que acometem os gatos domésticos podem ter diversas causas, desde fatores ambientais, nutricionais e de manejo, a ocorrência de infecções bacterianas e virais, podendo se desenvolver nos primeiros anos de vida do animal, até na fase de envelhecimento.

Ademais, a microbiota bucal é composta por diversos microrganismos, como por exemplo, bactérias e fungos, possuindo assim um papel importante na doença e saúde geral do animal. Entretanto, é difícil determinar a real participação desses microrganismos nas afecções bucais. Em alguns estudos, já foram identificados alguns gêneros bacterianos predominantes em amostras bucais de gatos saudáveis, destacando-se a *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Treponema* spp., *Kingella* spp., *Porphyromonas* spp., *Capnocytophaga* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Entretanto, em gatos com gengivite há uma predominância de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp.) e gram-negativas (*Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, *E. coli*).

Além disso, o aumento da população de gatos domésticos, tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que os proprietários desconhecem o risco da transmissão de bactérias comuns da microbiota felina aos seres humanos, através de mordeduras e arranhaduras, acarretando o surgimento de doenças. Devido a esse fato, torna-se importante a caracterização dos microrganismos presentes na cavidade bucal desses animais domésticos, uma vez que, sabendo quais são esses microrganismos, pode-se traçar medidas de prevenção e tratamento de possíveis doenças que possam surgir.

O tratamento das afecções bucais compreende ações mecânicas, como remoção de placas bacterianas aderidas ao dente, podendo chegar a remoção dos dentes acometidos, e

tratamento farmacológico, com a utilização de anti-inflamatórios e antimicrobianos. Os antimicrobianos mais utilizados nesses casos são clindamicina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, metronidazol, enrofloxacin, doxiciclina e ampicilina.

O uso indiscriminado dos agentes antimicrobianos tem desencadeado a resistência bacteriana, no qual em muitos casos, o tratamento farmacológico utilizado acaba se tornando ineficaz. A resistência bacteriana é considerada um problema atual e de saúde pública. Ademais, deve-se ressaltar que, nos últimos anos, houve uma diminuição da síntese de novos antimicrobianos, e a busca por novas substâncias tem se intensificado e o estudo de substâncias de origem vegetal tem aumentado significativamente. Em contrapartida, a busca por novos agentes antimicrobianos tem levado a pesquisas de compostos naturais, tanto para uso humano, quanto para uso veterinário.

Em decorrência desses fatos, muitas pesquisas voltaram-se para o uso de extratos de plantas e óleos essenciais, afim de encontrar novos agentes antimicrobianos, levando em consideração o conhecimento popular para justificar essas pesquisas. Os óleos essenciais possuem grande potencial terapêutico e já são muito utilizados na indústria cosmética e como conservantes em alimentos, e são comercializados em sua forma bruta ou beneficiada, e utilizados como aromas e fragrâncias em composições farmacêuticas. Nas plantas, os óleos essenciais são importantes agentes antimicrobianos, além de possuírem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, o que impulsiona novas pesquisas voltadas para esse âmbito.

Pelo exposto, o presente trabalho buscou isolar e identificar através de metodologias tradicionais, bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp., que são comumente isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com doenças periodontais. Para tal estudo, foram coletadas amostras da cavidade de gatos domésticos saudáveis e com gengivite, oriundas do município de Pirassununga, São Paulo. Adicionalmente, o presente trabalho buscou avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Anthemis nobilis* (camomila romana), *Citrus bergamia* (bergamota), *Eugenia caryophyllus* (cravo), *Copaifera officinalis* (Copaíba), *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) e *Cymbopogon citratus* (capim limão), através das metodologias de Difusão em Ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), visando trazer novos compostos para serem utilizados na clínica veterinária, principalmente no tratamento de afecções bucais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GENGIVITE E MICROBIOTA BUCAL

As afecções bucais em gatos domésticos são causas frequentes de atendimento clínico (VALPALAHTI et al., 2016). Em um estudo recente realizado na Finlândia, observou-se que a gengivite e a presença de placas dentárias foram as afecções mais comuns em gatos domésticos de raça e sem raça definida (VALPALAHTI et al., 2016). Ainda nesse contexto, na Inglaterra, mostrou-se que a doença periodontal foi a mais prevalente entre 3.584 (13,9%) atendimentos clínicos (O'NEILL et al., 2014). No Brasil, em um estudo com 588 gatos atendidos, 38% apresentaram doença periodontal, 29% lesões de reabsorção, 22% apresentaram fraturas dentárias, 8% gengivite e 3% outros tipos de afecções bucais (VENTURINI et al., 2007).

As afecções inflamatórias da cavidade bucal felina recebem diferentes terminologias, como gengivite crônica, estomatite linfocítica crônica, complexo gengivite-estomatite-faringite plasmocitária, estomatite necrosante, estomatite plasmocítica ou gengivite crônica intratável, dependendo da distribuição das lesões e dos achados histopatológicos (LYON, 2005). Além disso, as desordens bucais podem ser localizadas ou generalizadas, podem ser agudas ou crônicas, podem ocorrer desde os primeiros anos de vida do animal ou apenas na fase adulta, ou mesmo na fase de envelhecimento (LOMMER, 2013).

A gengivite é caracterizada clinicamente pela mudança da coloração normal da gengiva de rósea para avermelhada e nota-se a presença de inchaço, inflamação e sangramento. Inicialmente não é um processo doloroso, podendo permanecer sem ser tratada por um longo período. Entretanto ela pode progredir para uma periodontite (SCANNAPIECO et al., 2013). A periodontite não inclui apenas o processo inflamatório, mas também ocorre a degradação do ligamento periodontal e do tecido ósseo de suporte do dente. Se não for tratada, a periodontite pode levar a perda de tecidos de suporte e também a perda do dente (SCANNAPIECO et al., 2013).

Os principais sinais clínicos da gengivite em gatos são inapetência, halitose, ptialismo, disfagia, sialorreia, dificuldade em higienizar-se, engolir e respirar, sangramento bucal, desidratação, perda de peso, dor e agressividade pelo desconforto gerado (BELLEI et al., 2008; LOMMER, 2013).

A etiopatogenia da gengivite felina ainda não foi totalmente estabelecida. Entretanto, acredita-se que seja uma doença multifatorial em que a associação destes elementos contribui para a instalação e manutenção desta afecção. Dentre esses, destacam-se as infecções

bacterianas e virais, fatores nutricionais, ambientais e de manejo, associados a fatores genéticos (DOLIESLAGER et al., 2013). Uma das teorias aceitas é que esses elementos podem iniciar diretamente ou indiretamente o processo inflamatório, através do desequilíbrio da microbiota bacteriana bucal e da resposta imune local (DIEHL; ROSYCHUCK, 1993).

A microbiota corporal em humanos e animais é composta por diversos tipos de microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e fungos (WADE, 2013; KIL; SWANSON, 2014). A quantidade e a composição da microbiota podem variar de acordo com a região do corpo pesquisada. Os microrganismos da microbiota são divididos em comensais, também conhecidos como “normais”, e patogênicos (KIL; SWANSON, 2014). A discriminação entre os microrganismos comensais e os patogênicos é difícil, pois muitos agentes etiológicos de enfermidades são frequentemente isolados de animais sadios.

As funções da microbiota têm sido determinadas ao longo dos anos, principalmente no que tange ao trato digestório. A proteção do organismo é uma das funções mais relevantes da microbiota. Contudo, ela está relacionada com a síntese de vitaminas B e K, a defesa imunológica, a motilidade intestinal, o desenvolvimento do trato digestório, o metabolismo, entre outros (TANNOCK, 1997). Com relação a microbiota bucal, estudos têm mostrado que ela é complexa, abundante e composta por diversos grupos bacterianos e que possui um papel crítico na saúde geral e na doença. Ademais, a caracterização da microbiota bucal ainda não foi completamente estabelecida, devido às limitações dos métodos utilizados (STURGEON et al., 2014). Porém, alguns autores sugerem que é possível extrapolar e determinar a microbiota bucal de animais a partir dos achados obtidos de amostras de lesões oriundas de mordidas (GOLDSTEIN et al., 1978; LOVE; MALIK; NORRIS, 2000; ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011).

A cavidade bucal de um gato doméstico sadio possui uma microbiota rica em bactérias aeróbias e anaeróbias (STURGEON et al., 2014). Segundo Bellows (2010), fazem parte da microbiota bucal da maioria dos gatos os cocos Gram positivos sem motilidade como *Staphylococcus* e *Streptococcus* spp. Além desses gêneros, já foram isolados *Fusobacterium necrophorum*, *F. pseudonecrophorum*, *Porphyromonas gulae*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *T. socranskii*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* spp. e *Peptostreptococcus anaerobius* (GREENE, 2014; LOVE et al., 1989). Entretanto, deve-se ressaltar que esses achados foram baseados em métodos tradicionais de cultivo e isolamento bacteriano.

Em estudos recentes, com métodos de biologia molecular, pelo menos oito filos bacterianos têm sido predominantes nas amostras bucais de gatos sadios (STURGEON et al.,

2014; DEWHIRST et al., 2015). Entre os gêneros bacterianos identificados, destacam-se a *Neisseria* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Treponema* spp., *Kingella* spp., *Porphyromonas* spp., *Capnocytophaga* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (BOOIJ-VRIELING et al., 2010; DOLIESLAGER et al., 2011; STURGEON et al., 2014; DEWHIRST et al., 2015).

Já em gatos com gengivite, há uma predominância de bactérias aeróbias gram-positivas e anaeróbias gram-negativas (HARVEY; THORNSBERRY; MILLER, 1995). Entretanto, no início da afecção gengival, as bactérias que colonizam a cavidade bucal são predominantemente cocos não patogênicos, aeróbios e anaeróbios facultativos (BELLOWS, 2010). Contudo, a placa dentária pode causar irritação na gengiva do animal, dando espaço para bactérias patogênicas. Após a instalação desses microrganismos na cavidade bucal, por meio de produtos do metabolismo bacteriano, o sistema imune é estimulado, resultando na liberação de citocinas e prostaglandinas causando inflamação nos tecidos de suporte dentário (BELLOWS, 2010).

A real participação de microrganismos na etiopatogenia das afecções bucais de felinos torna-se difícil, uma vez que vários gêneros bacterianos constituem a microbiota oral. Porém, nesse sentido, alguns esforços já foram realizados. As principais bactérias já implicadas aos quadros de gengivite foram *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. gingivalis* e *B. intermedius*), *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*, *Neisseria* spp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* alfa e beta-hemolíticos, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bartonella* spp. e *Pasteurella multocida* (MALLONEE et al., 1988; LOVE et al., 1990; GLAUS et al., 1997; ADDIE et al., 2003).

Em um trabalho de Dolieslager et al. (2011), no qual compararam-se os métodos tradicionais de identificação bacteriana e os baseados em biologia molecular, as principais espécies identificadas em gatos sem e com gengivite, respectivamente, foram *P. pneumotropica* e *P. multocida*. Por outro lado, pelos métodos de biologia molecular, em que foi sequenciado fragmentos do gene 16S rRNA, além da *P. multocida*, foram identificados *Pseudomonas* spp., *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas circumdentaria* (DOLIESLAGER et al., 2011).

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias ubiquitárias das superfícies corporais. Porém é associada frequentemente a uma variedade de infecções em gatos e outras espécies animais. Os *Staphylococcus* têm sido uma das bactérias mais preponderantes nas amostras bucais de gatos com e sem gengivite, com altos índices de isolamento (66% a 100%) (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013). As espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas têm sido as mais prevalentes nas amostras

buciais, tanto de gatos saudáveis, como de gatos com gengivite (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013).

Além disso, em um estudo realizado com amostras de lesões oriundas de mordeduras de felinos, o *Staphylococcus* foi um dos gêneros mais preponderantes nessas amostras, só atrás das *Pasteurella* e dos *Streptococcus* (TALAN et al., 1999). *S. epidermidis* e *S. warneri* foram as espécies mais frequentes isoladas das feridas humanas provocadas por mordedura de gatos. Em menor frequência, destacam-se *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. intermedius*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus* e *S. simulans* (TALAN et al., 1999). Fatos interessantes a serem ressaltados são que os animais, por albergarem esses microrganismos, tornam-se um problema de saúde pública e que muitos proprietários desconhecem o potencial risco dos seus “pets” (OEHLER et al., 2009).

A *Pasteurella* spp. tem sido identificada predominantemente na microbiota bucal de animais domésticos, inclusive em amostras bucais de gatos domésticos e silvestres (ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011). Além disso, tem sido o gênero mais preponderante em amostras de lesões humanas ocasionadas por mordedura de gatos, que resultaram em celulite, linfangite, abscessos, peritonite e artrite séptica (HEY et al., 2012; SOL; VAN DE KAR; SCHREUDER, 2013; GUSTAVSSON et al., 2016). As espécies isoladas na maioria das vezes são *P. multocida* (54%), seguida pela *P. dagmatis* (7%), *P. stomatis* (4%) e *P. canis* (2%) (TALAN et al., 1999).

A *P. multocida* é considerada um patógeno oportunista do trato respiratório superior de várias espécies de animais domésticos, inclusive na cavidade bucal de gatos saudáveis (ELLIOTT et al., 2005; HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; FRESHWATER, 2008; LAM; PAGE, 2015; RAJKHOMA, 2015). Em gatos, a *P. multocida* tem sido implicada como agente etiológico de pneumonia, rinite, conjuntivite, abscessos, osteonecrose, gengivite e estomatite (HILI; EVANS; VENESS, 1997; LIORET et al., 2013). Sua patogenicidade está ligada a diversos fatores de virulência, que já foram identificados por meio de estudos moleculares (HARPER; BOYCE; ADLER, 2006; WILSON; HO, 2013; RAJKHOWA, 2015). Esse patógeno, deve-se ressaltar, pode ser transmitido para seres humanos através de mordedura, arranhaduras e lambeduras de animais domésticos, podendo ocasionar infecções leves a graves, como abscessos, peritonite, artrite séptica, endocardite e septicemia, tornando-o assim um problema de saúde pública (WEISS; PANESAR, 2012; WILSON; HO, 2013; KIM et al., 2014).

Desde a década de 50, o fármaco de escolha para o tratamento da *P. multocida* tem sido as penicilinas, apesar da maioria das bactérias Gram-negativas não serem sensíveis a elas.

Existem alguns antibióticos que não possuem bom efeito antimicrobiano se usados individualmente, contra diferentes espécies de *Pasteurella*. Entre estes, destacam-se eritromicina, as lincosamidas (como a clindamicina) e os beta-lactâmicos (como cefalexina) (WILSON; HO, 2013). Nesse contexto, o tratamento recomendado se baseia, normalmente, no uso de penicilina G, ou amoxicilina associada ao ácido clavulânico, ou tetraciclina e ou ciprofloxacina (FRESHWATER, 2008).

Em um estudo realizado com amostra de mucosa bucal de gatos domésticos, a *P. multocida* foi identificada em 10,5% das amostras. Além disso, foi avaliada a sensibilidade antimicrobiana desses isolados frente a ampicilina, ceftiofur, clotrimazol, doxiciclina, enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, florfenicol, penicilina, sulfizoxazole, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetopina. Os resultados mostraram que 12,1% das *P. multocida* apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados, a resistência mais frequente foi perante ao sulfametoxazol-trimetopina representando 75,6%, seguido pelo sulfizoxazol com 60,9% (FERREIRA et al., 2015).

Apesar de todos os estudos relacionados aos possíveis fatores etiopatogênicos das afecções bucais ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Contudo, há consenso entre os veterinários sobre a importância destas afecções para saúde geral dos gatos, refletindo assim na relevância do desenvolvimento de trabalhos, que visem elucidar e compreender os aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos destas afecções (DOLIESLAGER et al., 2013).

Com relação aos tratamentos das afecções bucais ainda existem muitas limitações, e na maioria das vezes é necessário uma intervenção invasiva, resultando na extração do(s) dente(s) acometido(s). Porém, na maioria das vezes, a terapêutica se baseia na administração de anti-inflamatório e antimicrobiano (HARVEY, 2005). Os principais antibióticos utilizados para o tratamento da gengivite são a clindamicina, espiramicina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, metronidazol, enrofloxacina, doxiciclina e ampicilina (LYON, 2005). A clorexidina é amplamente utilizada como antisséptico bucal, sendo eficaz contra os microrganismos responsáveis pela formação da placa bacteriana, mas pode causar manchas escuras nos dentes, devendo ser usada com cautela (SANTOS et al., 2012a). Deve-se ressaltar que a escolha dos antimicrobianos utilizados na maioria das vezes é feita de maneira empírica e indiscriminadamente.

Ao longo das últimas décadas, o uso indiscriminado de antibióticos acarretou um dos maiores problemas de saúde pública recente, a resistência bacteriana. A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos ocorre devido a capacidade de evolução e adaptação das bactérias

às mudanças ambientais e à pressão seletiva, e com isso acabam desenvolvendo mecanismos para reduzir sua susceptibilidade ao agente em questão, levando a perda de eficácia de potentes antibióticos (HÖGBERG et al., 2010). Por exemplo, no caso da resistência do *S. aureus*, ela tem se desenvolvido por mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias (da mesma espécie ou não). Normalmente a resistência ocasionada por uma mutação gera uma alteração no sítio de ação do agente antimicrobiano. Em contrapartida, a resistência por aquisição de genes ocasiona a inativação ou destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos (SANTOS et al., 2007).

Em animais de estimação, cepas bacterianas multirresistentes têm sido isoladas frequentemente. Estudos com *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundas de cavidade bucal de gatos mostraram que estas bactérias estão se tornando resistentes a antimicrobianos de uso corriqueiro na rotina clínica veterinária (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013; FERREIRA et al., 2015). Nesse contexto, esses achados se tornam importantes uma vez que tem aumentado a população de gatos domésticos e o contato entre estes animais e os humanos, possibilitando a transmissão cruzada dessas bactérias. Adicionalmente, nos últimos anos, tem diminuído a síntese de novos antimicrobianos. Desta maneira, novas opções de tratamento são necessárias para superar o advento da resistência bacteriana, os produtos naturais possuem potencial para isso. Dentre estes, destaca-se os óleos essenciais de plantas.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais, voláteis e complexos, oriundos do metabolismo secundário das plantas, podendo ser encontrados em várias partes das mesmas, como folhas e caule. Esses compostos apresentam grande potencial terapêutico e farmacológico, possuem diferentes propriedades, sendo uma delas a ação antimicrobiana (BIZZO et al., 2009; CHINSEMBU, 2015). Devido ao seu grande uso, os OEs vêm sendo estudados, em busca da caracterização de seus componentes químicos e suas propriedades terapêuticas (HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A., 2016).

Tipicamente, OEs são constituídos de mistura complexa com cerca de 20 a 60 compostos químicos diferentes (THAPA et al., 2012). Os principais compostos químicos dos OEs incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, em que um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES; SPITZER, 2000). Ademais, os compostos químicos considerados

possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OEs são os terpenos. Os terpenos são oriundos do metabolismo secundário das plantas, originados do isopreno, que por sua vez origina-se do ácido mevalônico na via do mevalonato. A classificação dos terpenos é baseada na quantidade de unidades estruturais básicas formadas cada uma por cinco carbonos, denominadas de isopreno. De acordo com essa classificação, os terpenos são denominados como isoprenos ou hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), sesterpenos (25C), triterpenos (30C), tetraterpenos (35C) e polisoprenóides quando possuem mais de 35 carbonos (BAKKALI et al., 2008).

A produção dos OEs é realizada a partir da matéria prima vegetal (folhas, cascas, flores, rizomas e frutos) (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006) e são obtidos das plantas através do processo de destilação a vapor, utilizando vários solventes (HILI et al., 1997). Os óleos essenciais são fluidos e se diferem dos óleos graxos por serem altamente voláteis. São insolúveis em água, pouco solúveis em vinagre e altamente solúveis em álcool e podem ser misturados a ceras e óleos vegetais (LAVABRE, 2009). Eles têm como função a proteção da planta contra doenças e parasitas, além de atrair insetos que são fundamentais para sua polinização (LAVABRE, 2009). A região geográfica onde a planta se encontra, bem como as condições de cultivo da planta, podem influenciar na produção de seus metabólitos secundários, ambientes com baixas temperaturas e baixos níveis de oxigênio também contribuem para uma maior produção desses compostos, melhorando a ação dos OEs após sua extração, já que esses metabólitos são produzidos a fim de proteger a planta contra predadores (BURT, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; BIZZO et al., 2009).

Ao longo dos últimos anos, estudos *in vitro* demonstraram a atividade antimicrobiana dos OEs frente as bactérias Gram positivas e negativas isoladas de diferentes amostras de seres humanos e de animais domésticos e silvestres, além de bactérias oriundas de alimentos, fungos e vírus (HILI; EVANS; VENESS, 1997; PARANAGAMA et al., 2003; BURT, 2004; FISHER; PHILLIPS, 2006; MANDALARI et al., 2007; SANTURIO et al., 2007; ROTA et al., 2008; MAYAUD et al., 2008; TYAGI; MALIK, 2010; POZZO et al., 2011; THAPA et al., 2012; VALERIANO et al., 2012; FONSECA et al., 2015; LARA et al., 2016).

Devido à variedade de compostos químicos presentes nos OEs, é provável que sua atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim, um conjunto de compostos (BURT, 2004). Uma característica importante dos OEs é ser lipofílico, ou seja, possuir afinidade por compostos lipídicos, o que permite sua permeação na membrana celular

bacteriana, podendo causar desordens estruturais nas bactérias (BURT, 2004). Ao permear a membrana citoplasmática bacteriana, os OEs podem atuar na degradação da parede celular da bactéria, bem como causar danos na membrana celular e em suas proteínas, ocasionando o extravasamento de conteúdo celular e até mesmo a coagulação citoplasmática (LAMBERT, 2002).

2.2.1 Óleo Essencial de Bergamota

O OE de *Citrus bergamia* Risso ou bergamota como é conhecida popularmente, pertence a família Rutaceae, é uma fruta típica do sul da Itália, cultivada também na América do Sul (Argentina e Brasil) e África, seu óleo essencial é extraído da casca (COSTA et al., 2010). A bergamota, devido ao seu odor, é bastante utilizada na indústria de cosméticos e de perfumes, além de ser usada na indústria alimentícia. Seu óleo é constituído, quase que na totalidade de compostos voláteis (93-96%). Os compostos químicos preponderantes são os monoterpenos (acetato de linalilo, linalol, pineno, geranial) e os sesquiterpenos (limoneno (30 a 45% da composição), β bisaboleno e γ -terpineno) (COSTA et al., 2010). Os monoterpenos contidos em seu óleo essencial são capazes de depurar toxinas dos rins e do fígado; os sesquiterpenos tem ação antisséptica e anti-inflamatória e os ésteres e álcoois auxiliam na redução da depressão e ansiedade, pois atuam como calmante do sistema nervoso (FURNERI et al., 2012). A presença de flavonoides no OE de bergamota confere a sua eficácia em doenças inflamatórias e atividades antioxidante, pois os flavonoides são muito reativos com as espécies reativas de oxigênio (ROS), além de inibir de enzimas como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), e também a expressão de genes associados a doenças inflamatórias crônicas (GRAZIANO et al., 2012).

Além dessas propriedades supracitadas, a bergamota possui ação antimicrobiana contra diferentes microrganismos como demonstraram alguns trabalhos (ROMANO et al., 2005; FISHER; PHILLIPS, 2006; MANDALARI et al., 2007; FURNERI et al., 2012). Essa ação antimicrobiana tem sido imputada a presença de flavonoides. Nas plantas, esses compostos são associados a proteção contra patógenos, como bactérias, vírus e fungos (RODRIGUES DA SILVA et al., 2015). Estudo realizado por Fisher e Phillips (2006), os quais testaram ação antimicrobiana desse óleo frente a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, mostraram que ação antimicrobiana foi melhor frente as bactérias Gram positivas, quando comparadas as bactérias Gram negativas.

2.2.2 Óleo Essencial de camomila romana

A *Chamaemelum nobili* (L.), também conhecida como *Anthemis nobilis* L., falsa camomila, macela ou simplesmente camomila romana, pertence a família Asteraceae, é cultivada em diferentes países (AL-SNAFI, 2016). Tradicionalmente, a camomila romana, *Chamaemelum nobili* (L.), é usada como digestivo e antiespasmódico pela infusão de suas flores, e na indústria é utilizada como conservante (DUARTE et al., 2005). Entretanto, já foram apontadas várias outras atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hipotensora, broncodilatadora, anticoagulativa, hipoglicêmica, entre outras (KAZEMIAN et al., 2015; AL-SNAFI, 2016). Desse modo, o óleo essencial da camomila romana já foi testado contra diferentes microrganismos, como *Porphyromonas gingivalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *Salmonella* spp. e *Candida albicans*, e os resultados mostraram que ela possui ação antimicrobiana contra todos os microrganismos testados (KAZEMIAN et al., 2015; AL-SNAFI, 2016).

As substâncias ativas encontradas no óleo essencial de camomila romana são os monoterpenos: trans geraniol, acetato de geranil, terpin-4-ol, octen-4-ol, 1,8-cineol e chamazuleno, sesquiterpenos: β -farnesene, γ -murolene, β bisabolene, α -bisabolol bicyclogermacrene, dehidrosabine cetona, flavonoides: quercetina, apigenina e luteolina, estéres: ácido angélico e tíglico (DUARTE et al., 2005; SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010).

2.2.3 Óleo Essencial de capim limão

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf conhecido como capim limão, pertence a família Poaceae, tem sido popularmente utilizado para distúrbios gastrintestinais e nervosos (SANTIN et al., 2009). Entretanto, possui outras atividades biológicas já imputadas a esse OE, tais como antiespasmódica, antimicrobiana, analgésica, antipirética, anti-inflamatória, sedativa e diurética (GBENOV et al., 2013). Os principais compostos químicos identificados nesse OE são os monoterpenos: geranial (48,1%), neral (36,4%), mirceno (11%), geraniol (1,9%) e linalol (0,7%) (BASSOLÉ et al., 2011).

A ação antimicrobiana do *C. citratus* tem sido determinada em pesquisas desde a década de 90 (ADEGOKE; ODESOLA, 1996; MELO et al., 2001; PARANAGAMA et al., 2003; PEDROSO et al., 2006; SANTIN et al., 2009; NAIK et al., 2010; AIEMSAARD et al., 2011;

VALERIANO et al., 2012; SFEIR et al., 2013; BOUHKATEM et al., 2014; MOLINA-GARZA et al., 2014). A ação antibacteriana desse OE foi demonstrada contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *Actinobacter baumannii*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterobacter sakazakii*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Salmonella enteritidis* (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; MELO et al., 2001; PRABUSEENIVASA, JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; NAIK et al., 2010; AIEMSAARD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SFEIR et al., 2013). Os estudos apontam que o composto com atividade antimicrobiana principal e majoritário foi citral (NAIK et al., 2010; AIEMSAARD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.4 Óleo Essencial de Melaleuca

A *Melaleuca alternifolia*, chamada popularmente de melaleuca ou tea tree, pertence à família Myrtaceae, é uma planta nativa da Austrália, que há muito tempo é utilizada como antisséptico local (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Cientificamente, esse OE tem demonstrado ser útil na manutenção da higiene oral e prevenção de doenças periodontais (HAMMER et al., 2003). Além disso, sua ação antimicrobiana foi demonstrada contra bactérias Gram positivas e negativas, vírus e fungos (VAN- VUUREN; SULIMAN; VILJOEN, 2008; CATALAN et al., 2008; GAROZZO et al., 2009; KWIECINSKI; EICK; WOJCIK, 2009; THOMSEN et al., 2011), inclusive a melaleuca mostrou-se profícua contra bactérias multirresistentes a antibióticos, sendo uma alternativa em casos de infecções graves (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

O OE de melaleuca é obtido por meio da destilação a vapor das folhas da *Melaleuca alternifolia* e é composto por terpenos, principalmente monoterpenos, como terpinen-4-ol (mínimo de 30%), 1,8 cineol, γ -terpineol e γ -terpineno (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Nesse OE, o composto terpinen-4-ol é apontado como um dos principais componentes responsáveis pela ação antimicrobiana (THOMSEN et al., 2011; MERTAS et al., 2013). O terpin-4-ol atua diretamente na membrana celular, interferindo na integridade e fisiologia da bactéria, apresentando assim um amplo espectro de atividade antimicrobiana (HABA et al., 2014) e anti-inflamatória (NINOMIYA et al., 2013). Além desse composto, outra molécula monoterpênica com ação antimicrobiana é 1,8 cineol ou eucaliptol (HABA et al., 2014).

Dos OEs frequentemente utilizados em experimentos *in vitro* frente a diferentes microrganismos, a melaleuca é um dos óleos mais testados frente a bactérias e leveduras orais

(GROPPO et al., 2002; HAMMER et al., 2003; TAKARADA et al., 2004; CATALAN et al., 2008; MERTAS et al., 2013; THOSAR et al., 2013). Os resultados desses trabalhos mostram que esse OE é bastante eficaz como antisséptico bucal ou mesmo para o uso terapêutico.

2.2.5 Óleo Essencial de Copaíba

Desde o século XVI, o óleo de copaíba é usado pelos índios do norte e nordeste do Brasil e tem sido comercializado na forma de óleo ou cápsula (GOMES et al., 2007). No território brasileiro existem mais de vinte espécies de copaíba, sendo a espécie *C. officinalis*, a mais abundante (LEANDRO et al., 2012). A copaíba é conhecida por suas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitetânica, antitumoral e antisséptica das vias urinárias (GUIMARÃES et al., 2016). Além disso, tem sido usada para o tratamento de bronquite, úlceras, sífilis, doenças de pele, proteção gástrica, analgésico, cicatrizante, anti-helmíntico e repelente de insetos (SANTOS et al., 2008; LEANDRO et al., 2012). Também, na indústria cosmética, o óleo de copaíba é utilizado em xampus, loções capilares e espumas de banho (GOMES et al., 2007).

Os principais constituintes químicos do OE de copaíba são sesquiterpenos, como o β -carofileno, α -copaeno e α bergamoteno (JUNIOR et al., 2007). Já foi demonstrado que o óleo de copaíba apresenta atividade bactericida frente as bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* e atividade moderada contra os fungos *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* (SANTOS et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2016). Em um estudo (PIERI et al., 2012) verificou-se a atividade antimicrobiana da copaíba *in vitro* frente a cepas ATCC de *Streptococcus mutans*. Além disso, a copaíba mostrou-se mais efetiva quando comparada a clorexidina 0,12% (PIERI et al., 2012).

2.2.6 Óleo Essencial de Cravo

O óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* ou óleo de cravo, tem sido usado popularmente para diversos fins, tais como repelente, alívio de cólicas gastrointestinais, anti-helmíntico, antioxidante, antifúngico, antibacteriano, antialérgico, anticarcinogênico, anticonvulsivante e, na indústria cosmética e alimentícia, inclusive muito usado como aromatizante (MASTELIC et al., 2008; MAHMOUD; MINA; HASSAN, 2011; GULÇIN; ELMASTAS; ABOUL-ENEIN, 2012; IVANOVIC et al., 2013; HEMALATHA et al., 2016). Deve-se ressaltar que, ao longo dos anos, vem sendo utilizado na rotina odontológica, com o

intuito de aliviar a dor em casos de hipersensibilidade dentária (THOSAR et al., 2013). Além disso, é eficaz no tratamento de cáries e gengivites, pois tem ação contra as bactérias bucais associadas a doenças periodontais (HALDER et al., 2012).

A ação antibacteriana do OE de cravo é em decorrência da presença de altas concentrações de eugenol (85-95%) (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009). Sua composição química compreende também o acetil-eugenol, os sesquiterpenos (α e β cariofileno) e pequenas quantidades de ésteres, cetonas e álcoois (SINGH et al., 2009).

O óleo de cravo tem ação contra *E. coli*, *E. fecalis*, *C. albicans*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. jejuni* (LARHSINI et al., 2001; BURT; REINDERS, 2003; MYTLE et al., 2006; THOSAR et al., 2013). Em um estudo com cepas de *Haemophilus ducreyi*, o óleo essencial de cravo apresentou efeito antimicrobiano mais potente em relação aos OEs de canela e tomilho também testados no experimento apresentando uma MIC de $0,085 \pm 0,03$ mg/mL (média $\pm$ DP) (LINDEMAN et al., 2014). Com base nos resultados desse estudo, *C. verum* (canela), *T. satureioides* (tomilho), e particularmente *E. caryophyllus* (cravo) foram considerados alternativas excelentes para o tratamento de cancro mole.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a isolados de *Staphylococcus* spp. e de *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos saudáveis e com gengivite.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar cepas de *Staphylococcus* spp. e de *Pasteurella* spp. oriundas de cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com gengivite.
- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de *Citrus bergamia* (bergamota), *Anthemis nobile* (camomila romana), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Copaifera officinalis* (Copaíba), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree) frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. e de *Pasteurella* spp., pela técnica de microdiluição em tubos.
- Comparar os resultados dos testes de sensibilidade dos seis óleos essenciais frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. de amostras da cavidade bucal de gatos saudáveis com os isolados de animais com gengivite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição de origem (protocolo 14.1.1500.74.6). O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar, do Departamento de Medicina Veterinária e no Laboratório de Química Biológica, do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), USP, Campus de Pirassununga –SP.

4.1 Animais

Para este estudo, foram selecionados por amostragem de conveniência, 43 gatos domésticos, oriundos do município de Pirassununga, São Paulo. Os critérios para a inclusão dos animais na pesquisa foram: presença ou ausência de sinais clínicos de gengivite, ausência de tratamento com antimicrobianos e sem alteração alimentar nos últimos 30 dias. Os animais foram separados em dois grupos experimentais: Grupo I- animais saudáveis e Grupo II- animais apresentando sinais clínicos de gengivite.

Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica bucal pelo mesmo médico veterinário, visando o diagnóstico de gengivite e classificação do grau de gengivite. Foram considerados animais com gengivite que apresentaram os seguintes sinais clínicos: anorexia, halitose, dificuldade em apreender os alimentos, sangramento de gengiva, perda de peso, ptialismo, além de lesões eritematosas, ulcerativas e proliferativas em gengiva, mucosa oral, palato e língua (LYON, 2005; LOMMER, 2013). A gengivite foi classificada de acordo com grau de intensidade e os tipos de lesões observadas, a saber: 0 - ausência de gengivite; 1- Gengivite leve com hiperemia gengival discreta; 2- Gengivite moderada, com hiperemia evidente e ausência de ulcerações; 3- Gengivite severa, com hiperemia evidente, hiperplasia ou ulceração; e 4- Gengivite muito severa, com hiperemia muito evidente, hiperplasia e/ou ulceração gengival e com tecidos gengivais friáveis (WATERS et al., 1993).

Durante a avaliação clínica e a colheita do material foi preenchida uma ficha cadastral do animal, contendo todos os dados do mesmo, como raça, idade, sexo, origem, higiene, entre outros.

4.2 Colheita de amostras

A colheita das amostras bucais foi realizada com auxílio de swabs estéreis. Os swabs foram friccionados levemente nas gengivas, bochechas e dentes dos animais por cerca de 10-15 segundos. Após a colheita, as amostras foram acondicionadas em tubo estéril contendo dois

mL de tampão fosfato alcalino estéril (PBS) para transporte e mantido a temperatura de 4° a 8°C até seu processamento.

4.3 Isolamento e identificação bacteriana

4.3.1 Cultivo bacteriano

As amostras bucais foram semeadas pela técnica de esgotamento em ágar sangue (AS), ágar chocolate (AC), ágar MacConkey (MC) e ágar manitol (MN) e incubadas a 35° C (+/- 2°) por 24-48h. As colônias crescidas nesses meios foram submetidas a coloração de Gram, para avaliação de suas características morfo-tintoriais. Em seguida, as células bacterianas com características morfo-tintoriais dos gêneros *Staphylococcus* e *Pasteurella* foram submetidas aos testes bioquímicos para confirmação do gênero e espécies.

4.3.2 Identificação do gênero e espécies de *Staphylococcus*

As colônias suspeitas para gênero *Staphylococcus* foram submetidas a coloração de Gram para análise de suas características morfo-tintoriais e posteriormente foram submetidas aos testes bioquímicos (tabela 1). Os testes bioquímicos realizados foram catalase, coagulase, DNase, PYR (pyrrolidonilaminopeptidase), fermentação no ágar manitol, resistência a novobiocina e polimixina, Vogues Proskauer, oxidação e fermentação dos carboidratos xilose, maltose e sacarose (BRASIL, 2013; JORGENSEN et al., 2015). Como controles foram utilizadas cepas padrões de *S. aureus* ATCC 43300. Posteriormente, todos os isolados identificados foram armazenados em caldo cérebro coração (BHI) e glicerol a 30% sob congelamento a -20°C.

Tabela 1 - Principais provas bioquímicas utilizadas para a diferenciação das espécies do gênero *Staphylococcus*, segundo Jorgensen et al. (2015)

Espécies	Coagulase	Catalase	PYR	VP	Resistência novobiocina	Resistência polimixinaB	Xilose	Maltose	Sacarose	DNase
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. auricularis</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. delphini</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>S. lugdunensis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>S. massiliensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pseudointermedius</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>S. sciuri</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. simulans</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>S. warneri</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>S. xylosus</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-

[+] teste positivo; [-] teste negativo. PYR (Pyrrolidonilaminopeptidase); VP (Voges Proskauer) Fonte: Própria autoria.

4.3.3 Identificação do gênero e espécies de *Pasteurella*

As colônias que se multiplicaram em ágar sangue de equino a 5% e ágar chocolate, pequenas, acinzentadas, arredondadas ou esféricas, brilhantes, não hemolíticas, com características morfo-tintoriais Gram negativas e em forma de cocobacilos, foram submetidas as provas de identificação para o gênero *Pasteurella* (QUINN et al., 2005; BRASIL,2013;).

As provas realizadas para este gênero bacteriano foram: catalase, oxidase, fermentação do TSI, motilidade, indol, ornitina descarboxilase, oxidação e/ou fermentação da maltose, xilose e sacarose, como mostra a tabela 2 (QUINN et al., 2005; BRASIL, 2013; JORGENSEN et al., 2015).

Tabela 2 - Principais provas bioquímicas utilizadas para a diferenciação das espécies do gênero *Pasteurella*, segundo Jorgensen et al. (2015)

	<i>P. multocida</i>	<i>P. aerogenes</i>	<i>P. stomatis</i>
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
MacConkey	-	+	-
TSI	+	+	+
Indol	+	-	+
Ornitina	+	-	-
Motilidade	-	-	-
Maltose	-	+	-
Sacarose	+	+	+

[+] teste positivo; [-] teste negativo. TSI (Triple Sugar Iron) Fonte: Própria autoria

4.4 Avaliação da sensibilidade frente aos óleos essenciais (OEs)

4.4.1 Teste de Difusão em Ágar

Primeiramente, com intuito de se determinar as concentrações finais dos óleos essenciais a serem utilizados nos testes de concentração inibitória e bactericida mínima foi realizado o teste de difusão em ágar. As análises preliminares com os óleos essenciais foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Duarte et al. (2005) e Ostrosky et al. (2008), com pequenas modificações.

Os OEs utilizados neste estudo foram *Citrus bergamia* (bergamota), *Anthemis nobile* (camomila romana), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Copaifera officinalis* (Copaiba), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree). Todos os óleos foram obtidos comercialmente (Arte dos Aromas Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e os mesmos estavam acondicionados em frascos âmbar e lacrados. A tabela 3 apresenta a composição química dos OEs utilizados no presente trabalho, de acordo com fabricante.

Tabela 3 - Composição química dos seis óleos essenciais comerciais, da marca Arte dos Aromas Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil

Composição química	Camomila romana	Cravo	Melaleuca	Capim limão	Bergamota	Copaíba
Monoterpenos						
Geraniol	+	-	-	+	-	-
Limoneno	+	+	-	+	+	-
Citronelol	+	-	-	+	-	-
Linalol	+	+	-	+	+	-
terpin-4-ol	-	-	+	-	-	-
α e γ terpineno	-	-	+	-	-	-
Angelato de butila e iso-amila	+	-	-	-	-	-
Alfa e beta pineno	+	-	-	-	+	-
p-menta-1,3-dieno	-	-	+	-	-	-
1,8 cineol	+	-	+	-	-	-
Geranyl acetato	-	-	-	+	-	-
Pin-2(3)-eno	-	-	-	+	-	-
(R)-p-menta-1,8-dieno	-	-	-	+	-	-
Citral	-	-	-	+	-	-
Mirceno	-	-	-	+	-	-
Acetato de linalilo	-	-	-	-	+	-
Diterpeno						
Tocoferol	-	-	-	-	-	+
Sesquiterpenos						
α e β carofileno	-	-	-	-	-	+
Alfa humuleno	-	-	-	-	-	+
Compostos fenólicos						
Metil e iso eugenol	-	+	-	-	-	-
Eugenol	-	+	-	-	-	-

[+] componente químico presente; [-] componente químico ausente. Fonte: Própria autoria.

Para essa etapa, foram testados os 35 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos das amostras bucais e três espécies de *Pasteurella* isoladas da cavidade bucal dos gatos domésticos frente aos seis OEs. Além dessas, foi utilizada uma cepa padrão de *S. epidermidis* (ATCC 12228) e um isolado de *P. aerogenes*, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Fábio Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas, UFPel.

Para a preparação dos inóculos, as espécies de *Staphylococcus* e *Pasteurella* armazenadas em glicerol, foram incubadas em caldo Mueller Hinton (CMH) a 37°C (+/- 2°C) por 24 a 48 h. Em seguida, foram realizadas leituras com espectrofotômetro à 625 nm, com intuito de verificar a concentração bacteriana. Após a leitura, foi adicionado em cada inoculo CMH até atingir aproximadamente absorbância correspondente a concentração de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL ou 0,5 da escala de Mac Farland. Posteriormente, os inóculos foram adicionados ao ágar MH a 50°C e distribuídos em placas de Petri de 150 mm de diâmetro.

Após a solidificação do ágar MH, com o auxílio de uma ponteira estéril (1000 µL) furaram-se nove orifícios em cada placa. Em cada orifício foi adicionado o OE. Os OEs foram testados nas seguintes diluições: 1- OE puro; 2- OE 50% (diluído 1:1 com etanol 80%); 3- OE 25% (diluuição 1:3 com etanol 80%); 4- OE na concentração final de 3200 µg (diluuição p/v) e 5- OE na concentração final de 6400 µg (diluuição p/v). Ademais, como controle negativo do teste, utilizou-se etanol a 80% e como controle positivo, usou-se gentamicina (25 mg/mL). A concentração dos OEs de 3200 µg foi utilizada apenas para as espécies de *Pasteurella* spp, pois em ensaios prévios a concentração de 6400 µg não solubilizou completamente em caldo MH.

As placas permaneceram a temperatura ambiente por uma hora, para que o material se difundisse no meio, e após foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C (+/- 2°C) por 24h. Posteriormente, nos orifícios em que foram formados halos de inibição, mediu-se os diâmetros com o auxílio de uma régua (mm). Os testes foram realizados em duplicata.

4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos óleos essenciais de *Anthemis nobile* (camomila romana), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Eugenia caryophyllus* (cravo) e *Melaleuca alternifolia* (tea tree) foi realizada de acordo com a metodologia de macrodiluição em caldo descrita por Duarte et al. (2003) e Ostrosky et al. (2008) com algumas adaptações.

Para essa etapa, foram utilizados 31 isolados de *Staphylococcus* spp. e 14 de *Pasteurella* spp oriundas da cavidade bucal dos gatos saudáveis e com gengivite. Todos os inóculos foram

obtidos a partir dos isolados mantidos em glicerol. Para preparação dos mesmos, as células bacterianas foram ressuspensas em CMH e incubadas sob agitação a 37°C (+/- 2°C) por 24 h. Após o período de incubação, os inóculos foram submetidos a análise por espectrofotometria a 625 nm para ajustar a concentração final a 1 a 2×10^8 UFC/mL. Para tanto, os mesmos foram diluídos em CMH até se obter a concentração desejada. A partir dessa diluição, foi preparada uma solução de trabalho, cuja concentração final foi de 1×10^6 UFC/mL.

Após a diluição supracitada, em tubos de vidro com tampa rosca adicionaram-se 1950 µL do inóculo bacteriano mais 50 µL dos óleos essenciais diluídos nas seguintes concentrações 1600 µg/mL, 800 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. Em seguida, os tubos foram incubados sob agitação a 100 rpm por 18 a 24 h a 37°C (+/- 2°C).

Ao término do período de incubação, 300 µL de cada tubo foi transferido para placas de microtitulação com 96 poços, devidamente identificadas, com a finalidade de executar a leitura por absorbância (620 nm). As absorbâncias registradas foram anotadas. Além da leitura por espectrofotometria, em cada orifício foi adicionado 5,0 µL de resazurina (3mg/mL). Após adição da resazurina, as microplacas foram colocadas novamente sob agitação a 37°C (+/- 2°C), até que houvesse mudança da coloração inicial da resazurina de azul para rosa (30 minutos a uma hora), e no final desse período, realizou-se a leitura. A interpretação dos resultados foi baseada visualmente pela observação das cores azul e rosa em cada pocinho. A coloração azul indica ausência de multiplicação bacteriana, enquanto que a coloração rosa indica a multiplicação bacteriana (SARKER et al., 2007).

Para realização do teste CIM foram utilizados quatro controles internos. O primeiro controle foi realizado pela adição de gentamicina, na concentração de 25 mg/mL, ao inóculo bacteriano. O segundo controle foi realizado com adição de apenas etanol a 80% ao inóculo. O terceiro controle, controle positivo de multiplicação bacteriana, foi realizado pela incubação apenas do inóculo. Adicionalmente, como controle de esterilização foi utilizado apenas o CMH. As análises foram realizadas em duplicata.

4.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada de acordo com metodologia proposta por Duarte et al. (2003), com algumas modificações. A partir dos resultados obtidos na CIM, 100 µL de todos os inóculos, que apresentaram coloração azul pela resazurina e leitura inferior a 0,05 pela espectrofotometria, foram semeados com auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de Petri

de 90 mm de diâmetro contendo ágar MH. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C (+/- 2°C) por 24 h. Posteriormente, foi realizada inspeção visual das placas. A interpretação dos resultados foi baseada em Radaelli et al. (2016), os quais inferiram que a presença de colônias indicava, que OE possuía atividade bacteriostática, enquanto que ausência de colônias indicava uma ação bactericida do OE testado. O ensaio foi realizado em duplicada.

5 RESULTADOS

No presente estudo foram incluídos 43 gatos domésticos sem raça definida, os quais foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos de gengivite. No grupo dos animais sadios foram incluídos 22 gatos, sendo que 40,9% eram machos e 59,1% eram fêmeas, a idade desses animais variou entre 12 meses até 14 anos. Entre os animais do grupo II, com gengivite foram incluídos 21 gatos, 47,6% eram machos e 52,4% eram fêmeas. A idade variou entre 12 meses a 19 anos. Todos os animais foram avaliados clinicamente e a cavidade bucal inspecionada com intuito de classificar os graus de gengivite, sendo a classificação baseada em Waters et al. (1993). Dos 21 gatos com gengivite, 23,8% apresentaram grau I, 52,4% apresentaram grau II e 23,8% apresentaram grau III.

Nas 43 amostras da cavidade bucal obtidas de gatos domésticos, foram isolados diferentes grupos bacterianos. Porém, houve uma predominância de isolados de cocos Gram positivos e negativos, seguido pelos bacilos e cocobacilos Gram negativos, e o grupo de menor isolamento foi dos bacilos Gram positivos. Os resultados encontram-se na tabela 4.

O gênero bacteriano mais preponderante foi *Staphylococcus*, sendo identificado em 81,4% (35/43) das amostras. Independentemente do grupo experimental, foram identificadas 13 espécies diferentes de *Staphylococcus* a saber: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. delphini*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. massiliensis*, *S. pseudintermedius*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. warneri*. Porém, no que tange ao grupo I, composto por animais sadios, foram isoladas oito espécies diferentes de *Staphylococcus*, sendo isolada apenas uma espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva (CoPS) e sete espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS). Já no grupo II, constituído por gatos com gengivite, foram isoladas nove espécies, sendo duas delas CoPS e sete espécies de CoNS (tabela 4).

Ainda, nesse contexto, a frequência de espécies de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos sadios foram: *S. auricularis* (4/22; 18,2%), *S. massiliensis* (3/22; 13,6%), *S. simulans* (4/22; 18,2%), *S. warneri* (2/22; 9,1%), *S. sciuri* (1/22; 4,5%), *S. aureus* (1/22; 4,5%), *S. saprophyticus* (1/22; 4,5%) e *S. haemolyticus* (1/22; 4,5%). Em três animais sadios foram isoladas mais de uma espécie de *Staphylococcus*, por exemplo, *S. saprophyticus* junto com *S. simulans*, *S. auricularis* junto com *S. simulans* e *S. haemolyticus* junto com *S. auricularis*. Nos animais com gengivite foram: *S. simulans* (3/21; 14,3%), *S. warneri* (6/21; 28,6%), *S. massiliensis* (2/21; 9,5%), *S. epidermidis* (2/21; 9,5%), *S. lugdunensis* (2/21; 9,5%), *S. auricularis* (1/21; 4,8%), *S. delphini* (1/21; 4,8%), *S. pseudintermedius* (1/21; 4,8%) e *S.*

xylosus (1/21; 4,8%). Em dois animais, desse grupo, foram isoladas mais de uma espécie, por exemplo, *S. simulans* junto com *S. xylosus* e *S. pseudintermedius* junto com *S. delphini*.

O gênero *Pasteurella* foi isolado em 32,5% (14/43) de todas as amostras bucais pesquisadas, sendo que sete isolados foram encontrados em gatos saudáveis e sete isolados foram oriundos de gatos com gengivite. Contudo, houve pouca diferença entre as espécies isoladas e estado clínico dos animais (Tabela 4). Adicionalmente, outra espécie identificada foi *Pseudomonas aeruginosa*, a qual foi isolada em ambos os grupos experimentais, sendo um isolado por grupo.

Tabela 4 - Os principais microrganismos isolados de 43 amostras da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis e com diferentes graus de gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Espécies de patógenos	Gatos Saudáveis	Gatos com gengivite
<i>Pasteurella multocida</i>	0	4,8% (1/21)
<i>P. aerogenes</i>	4,5% (1/22)	0
<i>P. stomatis</i>	27,3% (6/22)	28,6% (6/21)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,5% (1/22)	0
<i>S. simulans</i>	18,2% (4/22)	14,3% (3/21)
<i>S. saprophyticus</i>	4,5% (1/22)	0
<i>S. sciuri</i>	4,5% (1/22)	0
<i>S. haemolyticus</i>	4,5% (1/22)	0
<i>S. massiliensis</i>	13,6% (3/22)	9,5% (2/21)
<i>S. auricularis</i>	18,2% (4/22)	4,8% (1/21)
<i>S. warneri</i>	9,1% (2/22)	28,6% (6/21)
<i>S. lugdunensis</i>	0	9,5% (2/21)
<i>S. pseudointermedius</i>	0	4,8% (1/21)
<i>S. delphini</i>	0	4,8% (1/21)
<i>S. xylosus</i>	0	4,8% (1/21)
<i>S. epidermidis</i>	0	9,5% (2/21)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,5% (1/22)	4,8% (1/21)
Outros bacilos Gram positivos	13,6% (3/22)	4,8% (1/21)
Outros cocos Gram positivos	31,8% (7/22)	19% (4/21)
Outros bacilos Gram negativos	31,8% (7/22)	52,4% (11/21)
Outros cocos Gram negativos	36,7% (8/22)	61,9% (13/21)
Outros cocobacilos Gram negativos	59,1% (13/22)	66,7% (14/21)

Fonte: Própria autoria.

No presente estudo, com intuito de se determinar a sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. da cavidade bucal de gatos domésticos, os mesmos foram submetidos ao teste de difusão em ágar frente aos seis OEs. Além disso, o ensaio foi padronizado com uma cepa padrão de *S. epidermidis* (ATCC 12228) e um isolado de *P.*

aerogenes, a fim de verificar se os OEs eram capazes de inibir a proliferação dessa bactéria em diversas concentrações.

Os resultados do teste de difusão em ágar da cepa padrão *S. epidermidis* podem ser observados na tabela 5 e nas figuras 1a, 1b, 1c e 1d. Pela observação dos resultados, foi possível aferir que os OEs de bergamota e copaíba não apresentaram nenhuma sensibilidade antimicrobiana frente a cepa padrão de *S. epidermidis*. Com relação ao OE de camomila romana, a cepa padrão só apresentou sensibilidade (halo de inibição de 15 mm) frente ao produto puro. Com os OEs de cravo, melaleuca e capim limão, a cepa padrão apresentou sensibilidade frente a todas as diluições testadas. Contudo, os melhores resultados foram observados frente ao cravo e ao capim limão, os quais obtiveram halos de inibição superiores a 15 mm em todas as diluições. O etanol usado como controle não foi capaz de inibir a cepa padrão de *S. epidermidis*, assim como nenhum isolado de *Staphylococcus* e *Pasteurella* oriundos dos gatos domésticos.

Tabela 5 - Resultados do teste de difusão em ágar da cepa padrão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) frente aos seis óleos essenciais e a gentamicina

Óleos essenciais	Halos de inibição (mm)			
	OE puro/placa	OE 50%/placa	OE 25%/placa	OE 6400 µg/ placa
Camomila romana	15	0	0	0
Capim limão	30	25	23	21
Cravo	25	24	19	18
Bergamota	0	0	0	0
Copaíba	0	0	0	0
Melaleuca	16	14	12	10
Etanol 80%	0	0	0	0
Gentamicina 25 mg/mL	34	35	34	34

Fonte: Própria autoria.

Figura 1 - Teste de difusão em ágar da cepa padrão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) frente aos seis óleos essenciais em diferentes concentrações

a- Óleo essencial puro; b- Óleo essencial diluído 50%; c- Óleo essencial diluído 25% e d- Óleo essencial diluído a 6400 µg. Orifícios: 1- camomila romana; 2- capim limão; 3- cravo; 4- bergamota; 5- copaíba; 6 – melaleuca; 7- etanol 80%; 8- gentamicina (25 mg/ml) e 9- Sem nada. Fonte: Própria autoria.

Os resultados dos testes de difusão em ágar frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos da cavidade bucal dos gatos domésticos saudáveis foram bastante semelhantes aos observados para cepa padrão de *S. epidermidis* (ATCC 12228). Nesse sentido, os OEs com ação antimicrobiana foram o cravo, capim limão, camomila romana e melaleuca. Porém, os melhores resultados obtidos foram frente aos OEs de cravo e capim limão, na concentração de 6400 µg, em que todas as espécies testadas foram sensíveis a esses OEs, com halo de inibição variando entre 15 a 23 mm e 13 a 30 mm, respectivamente. Deve-se ressaltar que três espécies de *Staphylococcus* (*S. saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. haemolyticus*) não apresentaram sensibilidade frente a camomila romana e a melaleuca, apesar de serem sensíveis ao cravo e ao capim limão, inclusive os isolados de *S. sciuri* e *S. saprophyticus* foram as duas espécies com os maiores halos de inibição (29 mm) frente ao capim limão.

As espécies de *Staphylococcus* isoladas de gatos saudáveis que apresentaram os maiores halos de inibição frente ao cravo foram *S. sciuri* e *S. saprophyticus* (com 23 mm), enquanto para o OE de capim limão foram *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* (com 29-30 mm).

Entretanto, ressalta-se que apenas um isolado do *S. warneri* apresentou um halo de inibição de 30 mm, os outros dois isolados da mesma espécie apresentaram halos em torno de 13 e 18 mm cada. Contudo, isso não ocorreu para três espécies (*S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*) frente aos OEs de melaleuca e camomila romana.

Diferindo da cepa padrão de *S. epidermidis*, que não apresentou nenhuma sensibilidade a copaíba, três espécies de *Staphylococcus* (*S. massiliensis*, *S. auricularis* e *S. warneri*) isoladas de gatos saudáveis apresentaram halo de inibição frente a esse OE (9, 10 e 13 mm, respectivamente). Ademais, nenhum isolado de *Staphylococcus* de gatos saudáveis apresentou sensibilidade frente a bergamota.

Adicionalmente, mesmo tendo-se um único isolado de *S. aureus*, deve-se ressaltar que o mesmo apresentou sensibilidade aos OEs de cravo, capim limão, melaleuca e camomila romana, sendo os maiores halos de inibição observados frente ao cravo (19 mm) e ao capim limão (18 mm). Os resultados do teste de difusão frente a diferentes espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras de gatos saudáveis se encontram na tabela 6 e nas figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e e 2f.

Tabela 6 - Resultados do teste de difusão em ágar das diferentes espécies de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos sadios, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Halos de inibição (mm) na concentração de 6.400 µg de OE									
Espécies de <i>Staphylococcus</i>	Amostras	Camomila romana	Cravo	Melaleuca	Capim limão	Bergamota	Copaíba	Etanol 80%	Gentamicina 25mg/mL
<i>S. aureus</i>	Am8	9	19	10	18	0	0	0	17
<i>S. simulans</i>	04	10	20	11	19	0	0	0	24
<i>S. saprophyticus</i>	11	0	23	0	29	0	0	0	46
<i>S. sciuri</i>	23	0	23	0	29	0	0	0	20
<i>S. haemolyticus</i>	25	0	20	0	23	0	0	0	24
<i>S. massiliensis</i>	20	18	22	10	27	0	0	0	32
<i>S. massiliensis</i>	81	12	20	11	23	0	9	0	28
<i>S. auricularis</i>	17	10	20	12	19	0	10	0	26
<i>S. auricularis</i>	86	12	18	9	17	0	0	0	19
<i>S. auricularis</i>	01	11	20	11	22	0	0	0	24
<i>S. warneri</i>	03	0	21	0	30	0	0	0	40
<i>S. warneri</i>	37	0	15	11	13	0	13	0	17
<i>S. warneri</i>	33	0	18	10	18	0	0	0	31

Fonte: Própria autoria.

Figura 2 - Teste de difusão em ágar de espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis frente aos seis óleos essenciais

a- amostra Am8- *S. aureus*; b- amostra 33- *S. warneri*; c- amostra 01- *S. auricularis*; d- amostra 20- *S. massiliensis*; e- amostra 25- *S. haemolyticus*; f- amostra 81- *S. massiliensis*. Óleo essencial diluído a 6400 µg. Orifícios: 1- camomila romana; 2- capim limão; 3- cravo; 4- bergamota; 5- copaíba; 6 – melaleuca; 7- etanol 80%; 8- gentamicina (25 mg/mL) e 9- Sem nada. Fonte: Própria autoria.

Com relação ao grupo II, gatos com gengivite, a análise do teste de difusão em ágar com 12 espécies de *Staphylococcus*, os melhores resultados foram obtidos com os OEs de capim limão (halos de inibição entre 14 a 29 mm) e de cravo (halos de inibição entre 13 a 25 mm), sendo as 12 espécies sensíveis a estes OEs. A espécie *S. massiliensis* foi a mais sensível frente ao capim limão (halo de inibição de 28-29 mm), enquanto para o cravo as espécies mais sensíveis foram *S. massiliensis* (halo=22 e 24 mm), *S. delphini* (halo=24 mm), *S. simulans* (halo=24 mm) e *S. xylosus* (halo= 25 mm). Para melaleuca e camomila romana, apenas cinco espécies apresentaram sensibilidade, com halos de inibição menores ao menor halo obtido frente ao cravo. Nenhum isolado de *Staphylococcus* apresentou sensibilidade a bergamota e para copaíba apenas o isolado de *S. auricularis* apresentou sensibilidade, porém foi observado a formação de um halo de inibição pequeno de 11 mm (tabela 7 e figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e e 3f).

Tabela 7 - Resultados do teste de difusão em ágar das diferentes espécies de *Staphylococcus* isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Halos de inibição (mm) na concentração de 6.400 µg de OE									
Espécies de <i>Staphylococcus</i>	Amostra	Camomila romana	Cravo	Melaleuca	Capim limão	Bergamota	Copaíba	Etanol 80%	Gentamicina 25mg/mL
<i>S. epidermidis</i>	32	0	13	0	14	0	0	0	20
<i>S. epidermidis</i>	40	0	19	0	25	0	0	0	16
<i>S. lugdunensis</i>	07	0	17	0	19	0	0	0	20
<i>S. massiliensis</i>	82	10	24	0	29	0	0	0	46
<i>S. massiliensis</i>	15	0	22	10	28	0	0	0	45
<i>S. pseudintermedius</i>	09	0	21	0	20	0	0	0	31
<i>S. auricularis</i>	24	11	21	12	23	0	11	0	25
<i>S. warneri</i>	29	0	15	0	15	0	0	0	18
<i>S. warneri</i>	84	0	17	0	15	0	0	0	20
<i>S. delphini</i>	13	10	24	12	20	0	0	0	34
<i>S. simulans</i>	19	10	24	10	20	0	0	0	30
<i>S. xylosus</i>	14	11	25	12	22	0	0	0	33

Fonte: Própria autoria.

Figura 3 - Teste de difusão em ágar de espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite frente aos seis óleos essenciais

a- amostra 15- *S. massiliensis*; b- amostra 13- *S. delphini*; c- amostra 14 - *S. xylosus*; d- amostra 19- *S. simulans*; e- amostra 40- *S. epidermidis*; f- amostra 24- *S. auricularis*. Óleos essenciais na concentração final de 6400 µg. Orifícios: 1- camomila romana; 2- capim limão; 3- cravo; 4- bergamota; 5- copaíba; 6 – melaleuca; 7- etanol 80%; 8- gentamicina (25 mg/mL) e 9- Sem nada. Fonte: Própria autoria.

Comparando os resultados das espécies de *Staphylococcus* isoladas em ambos os grupos, como *S. simulans*, *S. massiliensis*, *S. auricularis* e *S. warneri*, os resultados mostraram que os isolados de *S. simulans*, independentemente do grupo, foram sensíveis aos mesmos OEs, ou seja, em ordem decrescente do melhor para pior, cravo>capim limão>melaleuca>camomila romana. Os isolados de *S. auricularis* de ambos os grupos foram sensíveis também aos OEs de cravo, capim limão, melaleuca e camomila romana, com pequenas variações nos resultados frente ao cravo e capim limão. Apenas o isolado de *S. auricularis* oriundo dos gatos com gengivite foi sensível a copaíba. A espécie *S. warneri* apresentou variações de sensibilidade frente aos grupos experimentais, com os isolados dos gatos saudáveis sensíveis ao cravo, capim limão e a melaleuca, sendo que para este último óleo, um isolado não apresentou sensibilidade, enquanto que, os isolados de *S. warneri* oriundos dos gatos com gengivite foram sensíveis apenas ao cravo e ao capim limão. Os isolados de *S. massiliensis* apresentaram resultados semelhantes ao *S. warneri*, ou seja, os isolados a partir de gatos saudáveis foram sensíveis ao cravo, capim limão, melaleuca e camomila romana. Já os oriundos dos gatos com gengivite foram

sensíveis principalmente ao cravo e ao capim limão, porém um isolado foi sensível a estes dois óleos e mais a camomila romana e outro foi sensível ao cravo+capim limão+melaleuca.

Três espécies de *Pasteurella*, a *P. multocida*, a *P. aerogenes* e a *P. stomatis*, foram submetidas ao teste de difusão em ágar, com a finalidade de se determinar a que OEs elas eram sensíveis e para posterior avaliação pelo CIM e CBM. Os resultados mostraram que as três espécies de *Pasteurella* foram sensíveis aos OEs de cravo, capim limão, melaleuca e camomila romana, resultados estes semelhantes aos observados para cepa padrão de *S. epidermidis* e dos isolados de *Staphylococcus* dos gatos sadios e com gengivite, inclusive as *Pasteurella* não foram sensíveis a copaíba e nem a bergamota. Contudo, os maiores halos de inibição foram observados frente ao OE de cravo com a *P. aerogenes* (23 mm) e *P. stomatis* (20 mm). Ainda nesse sentido, apesar dos resultados serem semelhantes aos *Staphylococcus*, os halos de inibição (11 a 23 mm) dos quatros OEs frente as espécies de *Pasteurella*, de modo geral, foram bem abaixo dos obtidos para os *Staphylococcus* (tabela 8 e figuras 4a, 4b e 4c).

Tabela 8 - Resultados do teste de difusão em ágar para as espécies de *Pasteurella multocida*, *Pasteurella aerogenes* e *Pasteurella stomatis* isoladas da cavidade bucal de gatos domésticos, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Halos de inibição (mm) na concentração de 3.200 µg de OE			
Óleos Essenciais	<i>P. multocida</i>	<i>P. aerogenes</i>	<i>P. stomatis</i>
Camomila romana	14	11	13
Capim limão	12	16	14
Cravo	14	23	20
Bergamota	0	0	0
Copaíba	0	0	0
Melaleuca	13	11	14
Etanol 80°	0	0	0
Gentamicina 25 mg/mL	25	28	29

Fonte: Própria autoria.

Figura 4 - Teste de difusão em ágar de três espécies de *Pasteurella* isoladas de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos frente aos seis óleos essenciais

a- *Pasteurella multocida*; b- *P. stomatis* e c- *P. aerogenes*. OEs diluídos na concentração final de 3200 µg. Pocinhos: 1- camomila romana; 2- capim limão; 3- cravo; 4- bergamota; 5- copaíba; 6 – melaleuca; 7- etanol 80%; 8- gentamicina (25 mg/mL) e 9- Sem nada. Fonte: Própria autoria.

Dezesseis isolados de *Staphylococcus* oriundos do grupo I (sadios), 15 isolados de *Staphylococcus* do grupo II (gingivite), sete isolados de *Pasteurella* do grupo I e sete isolados de *Pasteurella* do grupo II foram avaliados pelo método da CIM e CBM, com a finalidade de se determinar a atividade antimicrobiana dos OEs camomila romana, cravo, melaleuca e capim limão. Nesse contexto, os OEs de bergamota e copaíba não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos isolados das espécies de *Staphylococcus* e *Pasteurella*.

Pela CIM, os resultados mostraram que o capim limão, o cravo, a melaleuca e a camomila romana apresentaram atividade antimicrobiana frente a 31 espécies isoladas de *Staphylococcus* oriundas de gatos domésticos, uma vez que os OEs foram capazes de diminuir a proliferação bacteriana. As faixas de concentrações dos OEs obtidas frente as diferentes espécies de *Staphylococcus* oriundas de gatos sadios OEs foram: 1- capim limão- 50 a 200 µg/mL; 2- melaleuca- 100 a 800 µg/mL; 3- cravo- 100 a 800 µg/mL e 4- camomila romana- 100 a 1600 µg/mL.

Analizando os resultados da CIM frente as diferentes espécies de *Staphylococcus* oriundas de gatos domésticos sadios, as espécies com maior sensibilidade aos quatro OEs foram *S. saprophyticus*, *S. aureus* e *S. sciuri*, com as concentrações da CIM abaixo da concentração obtidas para as outras espécies. Já, os isolados da espécie *S. warneri* e *S. auricularis* apresentaram menor sensibilidade aos quatro OEs. Entretanto, para o OE de capim limão, a concentração média de CIM frente a essas duas espécies foi similar a CIM das outras espécies avaliadas. Adicionalmente, as amostras de *S. massiliensis* isoladas e avaliadas apresentaram

discrepância entre os resultados da CIM. Por exemplo, um isolado dessa espécie, apresentou resultados da CIM para camomila romana e capim limão de 50 µg/mL, enquanto para o cravo, a CIM foi de 25 µg/mL e para melaleuca de 100 µg/mL, sendo esses resultados bem abaixo dos dois outros isolados da mesma espécie (tabela 9).

Pelos resultados da CIM frente as espécies de *Staphylococcus* oriundas de amostras bucais de gatos com gengivite, foi possível verificar similaridades entre elas, com os melhores resultados frente ao capim limão (faixa de concentração = 50 a 400 µg/mL), seguido pelo cravo (25 a 800 µg/mL), pela melaleuca (25 a 800 µg/mL) e pela camomila romana (100 a 1600 µg/mL) (tabela 9). O capim limão mostrou-se mais eficaz, que os outros OEs, pois em menores concentrações (50 a 100 µg/mL), foi capaz de diminuir a proliferação bacteriana da maioria das espécies, como *S. delphini*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, *S. xylosus* e *S. simulans*. Porém, para os isolados de *S. warneri* e *S. massiliensis*, a faixa de concentração da CIM desse óleo foi de 100 a 800 µg/mL.

Avaliando as espécies em separado foi observado que *S. delphini* apresentou CIM similar a *S. xylosus* frente aos OEs de camomila romana e melaleuca, com concentrações de 400 µg/mL e a concentração do capim limão foi de 100 µg/mL para ambas. Entretanto, houve discrepância entre elas frente ao cravo. Em contrapartida, o cravo apresentou CIM de 25 µg/mL para apenas um isolado de *S. epidermidis*, esta concentração também foi obtida frente a melaleuca. Deve-se ressaltar que, para as outras espécies de *Staphylococcus*, o cravo apresentou CIM de 200 a 800 µg/mL e a melaleuca 100 a 800 µg/mL. Adicionalmente, os isolados de *S. lugdunensis* foram mais sensíveis aos OEs de capim limão e camomila romana, quando comparados as outras espécies analisadas, com CIM variando entre 50 a 100 µg/mL.

Os resultados da CBM mostraram que o capim limão foi mais eficiente em inibir a proliferação de todos os isolados de *Staphylococcus* dos gatos sadios, com faixa de concentração de 100 a 800 µg/mL. Seguido ao capim limão, o OE com melhor eficiência foi a melaleuca, cujos valores de CBM foram de 100 a 1600 µg/mL. Já os OEs de cravo e camomila romana apresentaram valores de CBM de 200 a 1600 µg/mL e 100 a 1600 µg/mL, respectivamente. Fato relevante observado foi que a maioria dos OEs apresentaram principalmente ação bacteriostática, com exceção para os isolados de *S. aureus* e *S. saprophyticus*, em que o cravo apresentou ação bactericida na concentração de 400 µg/mL. Além disso, um isolado de *S. auricularis* foi resistente a camomila romana, enquanto um

isolado de *S. warneri* foi resistente tanto a camomila romana como a melaleuca (tabela 9 e figuras 5a, 5b, 5c, 5d, 5e e 5f).

Tabela 9 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Staphylococcus* spp. isolados de amostras bucais de gatos domésticos sadios, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Isolados de <i>Staphylococcus</i>	Atividade antimicrobiana							
	Óleos essenciais							
	Camomila Romana		Cravo		Melaleuca		Capim limão	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	400	800	400	400	400	1600	200	400
<i>S. simulans</i>	400	1600	400	800	200	800	100	200
<i>S. simulans</i>	800	800	400	400	400	1600	100	400
<i>S. simulans</i>	800	800	400	400	100	100	100	100
<i>S. saprophyticus</i>	200	400	400	400	400	800	100	200
<i>S. auricularis</i>	400	400	400	400	200	400	100	200
<i>S. auricularis</i>	1600	-	400	400	400	400	100	200
<i>S. auricularis</i>	100	100	200	200	400	-	100	400
<i>S. sciuri</i>	400	800	400	1600	400	800	100	200
<i>S. haemolyticus</i>	800	1600	400	1600	200	800	100	200
<i>S. massiliensis</i>	100	100	100	200	100	200	50	100
<i>S. massiliensis</i>	400	1600	400	800	400	1600	100	200
<i>S. massiliensis</i>	200	800	400	800	800	800	200	400
<i>S. warneri</i>	800	1600	400	1600	800	1600	100	800
<i>S. warneri</i>	800	-	400	400	400	-	50	100
<i>S. warneri</i>	800	-	800	1600	400	-	200	800

[-] sem atividade antimicrobiana. CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima. Resultados da média das duplicatas. Fonte: Própria autoria.

Figura 5 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de *Staphylococcus* spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos saudáveis

a- amostra Am8- *S. aureus*; b- amostra 33- *S. warneri*; c- amostra 01- *S. auricularis*; d- amostra 20- *S. massiliensis*; e- amostra 25- *S. haemolyticus*; f- amostra 81- *S. massiliensis*. As setas brancas indicam as CIM. Revelação pela resazurina, cor azul- indica a inibição da proliferação bacteriana e a cor rosa- indica a proliferação bacteriana. C=controle, CA= camomila romana, CR= cravo, M= melaleuca, CL=capim limão. Fonte: Própria autoria.

Para os isolados de *Staphylococcus* de amostras bucais de gatos com gengivite, os resultados obtidos pela CBM mostraram que os OEs de capim limão e cravo foram mais eficientes frente a todos os isolados, com faixas de concentração de 100 a 800 µg/mL e 200 a 1600 µg/mL, respectivamente. A melaleuca e camomila romana apresentaram faixas de concentração da CBM de 200 a 1600 µg/mL. Pelos resultados obtidos pela CBM frente aos isolados de gatos com gengivite pode-se concluir que, os quatros OEs apresentaram ação bacteriostática. Adicionalmente, dois isolados de *S. warneri* foram completamente resistentes a melaleuca e a camomila romana (tabela 10 e figuras 6a, 6b, 6c, 6d, 6e e 6f).

Tabela 10 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Staphylococcus* spp. isolados de amostras bucais de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Isolados de <i>Staphylococcus</i>	Atividade Antimicrobiana							
	Óleos essenciais							
	Camomila Romana		Cravo		Melaleuca		Capim limão	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. delphini</i>	400	800	400	400	400	400	100	200
<i>S. epidermidis</i>	400	1600	400	800	400	400	200	400
<i>S. epidermidis</i>	100	1600	25	200	25	400	50	100
<i>S. auricularis</i>	200	400	400	400	200	1600	100	800
<i>S. lugdunensis</i>	100	200	200	200	100	800	50	100
<i>S. lugdunensis</i>	100	800	400	400	200	800	100	200
<i>S. pseudintermedius</i>	200	1600	200	800	100	800	50	100
<i>S. xylosus</i>	400	800	200	200	400	800	100	200
<i>S. simulans</i>	400	1600	400	800	200	200	50	100
<i>S. simulans</i>	200	400	400	1600	400	800	100	400
<i>S. simulans</i>	400	800	400	400	200	400	50	100
<i>S. massiliensis</i>	1600	-	800	800	800	1600	200	400
<i>S. massiliensis</i>	200	800	200	800	400	400	200	800
<i>S. warneri</i>	200	1600	400	800	400	1600	400	400
<i>S. warneri</i>	400	1600	400	800	400	-	100	100

[-] sem atividade antimicrobiana. CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima. Resultados da média das duplicatas. Fonte: Própria autoria.

Figura 6 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de *Staphylococcus* spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos com gengivite

a- amostra 15- *S. massiliensis*; b- amostra 13- *S. delphini*; c- amostra 14- *S. xylosus*; d- amostra 19- *S. simulans*; e- amostra 40- *S. epidermidis*; f- amostra 24 - *S. auricularis*. As setas brancas indicam as CIM. Revelação pela resazurina, cor azul- indica a inibição da proliferação bacteriana e a cor rosa- indica a proliferação bacteriana. C=controle, CA= camomila romana, CR= cravo, M= melaleuca, CL=capim limão. Fonte: Própria autoria.

Os isolados de *Pasteurella* também foram submetidos aos testes de CIM e CBM, como descrito nas tabelas 11 e 12. Os resultados da CIM e CBM para os isolados de *Pasteurella* foram semelhantes aos *Staphylococcus*, com diferença entre as atividades antimicrobianas. Nesse sentido, para os isolados de *Pasteurella* do grupo I (sadios), a maior sensibilidade antimicrobiana foi observada frente ao capim limão (concentração da CIM= 50 a 200 µg/mL), a melaleuca (CIM= 100 a 400 µg/mL), o cravo (CIM= 200 a 800 µg/mL) e a camomila romana (CIM=50 a 400 µg/mL). Deve-se ressaltar que, apesar da CIM da camomila romana ser abaixo da observada para a melaleuca e o cravo, esse valor somente ocorreu, pelo fato de um isolado de *P. stomatis* ter sido resistente a este OE. Com relação ao isolado de *P. aerogenes*, a maior atividade antimicrobiana também foi observada frente ao capim limão (CIM= 50 µg/mL). Os valores da CBM para os quatro OEs mostraram resultados semelhantes a CIM, capim limão>melaleuca>cravo>camomila romana. Além disso, todos os OEs apresentaram ação bacteriostática, com exceção da melaleuca e camomila romana, que frente a *P. aerogenes*, apresentaram ação bactericida, na concentração de 200 µg/mL. Ademais, dois isolados de *P. stomatis* foram resistentes a camomila romana, inclusive um destes não apresentou valores de CIM e de CBM (figuras 7a, 7b e 7c).

Tabela 11 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Pasteurella* spp. isoladas de amostras bucais de gatos domésticos saudáveis, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Isolados de <i>Pasteurella</i>	Atividade antimicrobiana							
	Óleos essenciais							
	Camomila Romana		Cravo		Melaleuca		Capim limão	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)
<i>P. aerogenes</i>	200	200	400	400	200	200	50	100
<i>P. stomatis</i>	200	800	400	400	400	400	50	50
<i>P. stomatis</i>	400	-	400	400	400	400	100	100
<i>P. stomatis</i>	-	-	800	800	400	400	200	200
<i>P. stomatis</i>	200	400	400	400	100	100	50	50
<i>P. stomatis</i>	50	100	200	200	100	100	50	50
<i>P. stomatis</i>	200	200	200	400	200	200	50	100

[–] sem sensibilidade antimicrobiana. CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima. Resultados da média das duplicatas. Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de quatro óleos essenciais frente a *Pasteurella* spp. isoladas de amostras bucais de gatos domésticos com gengivite, no período de maio a setembro de 2016, Pirassununga, São Paulo

Isolados de <i>Pasteurella</i>	Atividade antimicrobiana							
	Óleos essenciais							
	Camomila Romana		Cravo		Melaleuca		Capim limão	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)	CIM($\mu\text{g/mL}$)	CBM($\mu\text{g/mL}$)
<i>P. multocida</i>	-	-	200	400	400	400	400	400
<i>P. stomatis</i>	1600	-	400	800	400	400	50	50
<i>P. stomatis</i>	800	800	400	400	400	400	50	100
<i>P. stomatis</i>	400	400	400	400	400	400	100	200
<i>P. stomatis</i>	800	800	200	200	400	400	200	200
<i>P. stomatis</i>	200	800	400	400	400	1600	50	100
<i>P. stomatis</i>	800	1600	400	400	400	400	50	200

[–]sem sensibilidade antimicrobiana. CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima. Resultados da média das duplicatas. Fonte: Própria autoria.

Figura 7 - Teste de Concentração inibitória mínima (CIM) frente a isolados de *Pasteurella* spp. de amostras da cavidade bucal de gatos domésticos

a- *Pasteurella multocida*; b- *P. stomatis* e c- *P. aerogenes*. As setas brancas indicam as CIM. Revelação pela resazurina, cor azul- indica a inibição da proliferação bacteriana e a cor rosa- indica a proliferação bacteriana. C=controle, CA= camomila romana, CR= cravo, M= melaleuca, CL=capim limão. Fonte: Própria autoria.

No grupo II, a análise dos resultados da CIM de todos os isolados de *Pasteurella*, mostrou que ação antimicrobiana foi melhor frente ao capim limão (CIM= 50 a 400 µg/mL), seguida do cravo (CIM= 200 a 400 µg/mL), da melaleuca (CIM=400 µg/mL) e por último da camomila romana (CIM= 200 a 1600 µg/mL). Entretanto, para a espécie de *P. multocida*, observou-se a ocorrência de resistência frente a camomila romana, fato esse visto, tanto na CIM como na CBM (tabela 11). Com relação a CBM, a melaleuca e o capim limão apresentaram ação bactericida apenas frente a *P. multocida* (400 µg/mL). Contudo, para os isolados de *P. stomatis*, todos os OEs apresentaram ação bacteriostática, com concentrações entre 50 µg/mL a 1600 µg/mL.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, os estudos mostraram que a saúde bucal, tanto de animais, como de humanos está diretamente relacionada com a saúde geral do indivíduo. Inclusive, quando a saúde bucal está em desarmonia, os microrganismos deste local, principalmente as bactérias, podem migrar e proliferar em outros órgãos e consequentemente comprometer a integridade fisiológica do animal. Na medicina humana, a associação entre afecções bucais e outras enfermidades sistêmicas, como diabetes mellitus, pneumonia e doenças cardíacas, já foram comprovadas (TENG et al., 2002). De modo recente, um estudo mostrou a associação positiva entre a doença periodontal primária e a insuficiência renal crônica em gatos (GREENE, 2014).

Além disso, as afecções bucais em gatos domésticos são causas frequentes de atendimento clínico. Nesse contexto, um estudo realizado na Finlândia, com objetivo de determinar as principais doenças que acometem os gatos, as afecções bucais e dentais foram as mais prevalentes entre os 5.415 animais de diversas raças e faixas etárias, sendo a taxa de prevalência de 28% (VAPALAHTI et al., 2016). Nesse sentido, o presente trabalho objetivou isolar e identificar dois gêneros frequentes na cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite e avaliar a sensibilidade antimicrobiana desses gêneros frente a seis óleos essenciais, com intuito de se verificar o potencial destes produtos naturais para uso preventivo e terapêutico em gatos.

Desta maneira, os resultados do isolamento e identificação bacteriana, podendo ser considerado uma etapa inicial do projeto, foram concernentes com outros estudos que buscaram identificar a microbiota bucal de gatos domésticos (LOVE et al., 1989; MALLONEE et al., 1988; HARVEY; THORNSBERRY; MILLER, 1995; GLAUS et al., 1997; ADDIE et al., 2003; GREENE, 2014), os quais mostraram uma preponderância de cocos Gram positivos e negativos, seguido por bacilos e cocobacilos Gram negativos, tanto em gatos sadios, como em animais com gengivite.

Os membros do gênero *Staphylococcus* são ubiqüitários da mucosa bucal e corporal e sabidamente são reconhecidos com membros da microbiota de animais, incluídos os gatos domésticos (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013). As proporções de isolamento desse gênero bacteriano em amostras bucais são altas, variando entre 66% a 100%, independente do estado fisiológico do animal pesquisado (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013).

Esse fato foi confirmado pelo presente estudo, no qual a porcentagem de isolamento foi de 81,4%. Ademais, houve uma predominância de isolamento de *Staphylococcus* coagulase

negativa nas amostras bucais de gatos, tal como foi observado por outros autores (LILENBAUM; NUNES; AZEREDO, 1998; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013).

Adicionalmente, a identificação das espécies de *Staphylococcus* nas amostras bucais dos gatos não foi surpresa, como *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. pseudintermedius*, *S. sciuri*, *S. warneri* e *S. simulans*, pois elas têm sido frequentemente identificadas na cavidade bucal de felinos e de material oriundo de feridas humanas ocasionadas por mordedura, como demonstraram alguns estudos (TALAN et al., 1999; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013; DEWHIRST et al., 2015). Há uma lacuna na literatura científica que limita fazer uma discussão mais aprofundada dos resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, os nossos achados reforçam os resultados dos poucos trabalhos publicados, os quais mostraram que *S. aureus* é pouco frequente na cavidade bucal de gatos (TALAN et al., 1999; MUNIZ; PENNA; LILENBAUM, 2013).

As espécies *S. lugdunensis* e *S. massiliensis* não foram identificadas, até o presente momento, em amostras bucais de gatos domésticos sadios e com gengivite. Entretanto, a *S. lugdunensis* já foi isolada de amostras da cavidade bucal de humanos com infecções orais agudas, inclusive foi demonstrado que está espécie é formadora de biofilme (YOU et al., 1999; FRANK et al., 2007). Já, a espécie *S. massiliensis*, foi há pouco tempo reconhecida (MASALMA; RAOULT; ROUX, 2010; ZONG, 2013) e sua importância clínica não foi ainda determinada, mas, provavelmente, é um constituinte da microbiota em humanos (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010; ZONG, 2013) e talvez também seja dos gatos domésticos, uma vez, que a mesma foi isolada de ambos os grupos experimentais. Contudo, devemos ter cautela e novos estudos devem ser efetuados para confirmar esses achados, principalmente, no que tange ao número de amostras.

Com relação aos isolados de *Pasteurella*, os resultados do presente trabalho foram similares a outras pesquisas, as quais mostraram que esse gênero é um dos mais abundantes na cavidade bucal dos gatos (MALLONEE et al., 1988; BIBERSTEIN et al., 1991; HOLST et al., 1992; STURGEON et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; DEWHIRST et al., 2015). Entretanto, quando analisadas as espécies identificadas no atual trabalho, os resultados obtidos foram discrepantes de outros estudos, em que a *P. multocida* foi a principal espécie isolada em amostras bucais de gatos sadios e com gengivite e em amostras oriundas de feridas humanas causadas por mordedura (MALLONEE et al., 1988; TALAN et al., 1999; DOLIESLAGER et al., 2011; FERREIRA et al., 2015; MORRISSEY et al., 2016;). A *P. stomatis* é considerada uma cepa atípica e pouco estudada. Num estudo realizado por Garniere et al. (1993), esta

espécie de *Pasteurella* foi isolada em 30 % (18/62) dos raspados de gengiva oriundos de gatos domésticos. Deve-se ressaltar que, esses resultados foram similares aos nossos, em que a *P. stomatis* foi isolada em 28% das amostras bucais analisadas. Desta maneira, fica dúvida o quanto essa espécie é atípica? Ou faltam estudos?

Estudos da ação antimicrobiana de óleos essenciais e seus compostos químicos contra diferentes espécies bacterianas isoladas de animais domésticos, humanos e de origem alimentar foram realizados nos últimos anos (HILI; EVANS; VENESS, 1997; PARANAGAMA et al., 2003; BURT, 2004; FISHER; PHILLIPS, 2006; SANTURIO et al., 2007; MANDALARI et al., 2007; MAYAUD et al., 2008; ROTA et al., 2008; TYAGI; MALIK, 2010; POZZO et al., 2011; THAPA et al., 2012; VALERIANO et al., 2012; FONSECA et al., 2015; LARA et al., 2016). Entretanto, o presente trabalho apresenta pela primeira vez resultados de estudos de sensibilidade de seis óleos essenciais em 31 isolados de *Staphylococcus* spp. e 14 isolados de *Pasteurella* spp. oriundos de amostras bucais de gatos domésticos.

Resultados insatisfatórios foram obtidos no teste de difusão em ágar para os OEs de copaíba e bergamota, os quais não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana frente aos isolados de *Staphylococcus* e *Pasteurella*. Com relação a copaíba frente aos *Staphylococcus*, esses resultados foram discordantes de outros estudos, os quais observaram atividade antimicrobiana deste produto frente principalmente a bactérias Gram positivas (SANTOS et al., 2008; GUIMARAES et al., 2016). Inclusive em ambos os trabalhos citados, cepas padrões de *S. aureus* foram testadas e apresentaram sensibilidade microbiana a esse OE. Santos et al. (2008), além do *S. aureus*, testaram cepas padrões de *S. epidermidis* (12228), as quais apresentaram sensibilidade à copaíba. Deve-se ressaltar que, essa cepa padrão de *S. epidermidis* foi a mesma utilizada no presente estudo. Entretanto, esta cepa, não apresentou sensibilidade a copaíba em nenhuma das diluições testadas. O presente trabalho sugere hipóteses importantes para novas pesquisas sobre os diferentes compostos nos OEs testados.

As discrepâncias dos resultados da copaíba frente aos outros autores podem ser explicadas pela diferença na composição química e nas concentrações dos diferentes compostos, os quais podem sofrer modificações de acordo com a origem fitogeográfica do OE (SANTOS et al., 2008). Nesse sentido, um trabalho realizado com copaíba procedente de diferentes regiões constatou essa disparidade entre os compostos químicos, tal como observado para os sesquiterpenos, mostrando, ademais, diferenças entre as concentrações desta substância, que podem interferir em suas ações biológicas (CASCON; GILBERT, 2000). O OE de copaíba utilizado nesse estudo possuía em sua composição química esse terpeno, como constatado no

laudo do fabricante. Contudo, não sabemos a porcentagem presente, que poderia nos sugerir se ausência de sensibilidade observada foi em decorrência de uma baixa concentração ou não.

Com relação aos isolados de *Pasteurella*, os resultados obtidos mostraram que a copaíba não teve nenhuma ação antimicrobiana, tal como foi observado frente as outras bactérias Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klesiella pneumoniae*, *Shigella flexinerii* e *Enterobacter cloacae*) avaliadas por Santos et al. (2008). Esses achados reforçam os obtidos em outros estudos com OEs, em que os autores retratam que as bactérias Gram negativas são menos sensíveis e/ou mesmo resistentes aos produtos naturais, inclusive aos antibióticos, devido, principalmente, a composição de sua parede celular (LAMBERT, 2002; NAIK et al., 2010). Fato relevante a ser descrito é que, até o presente momento, não existem trabalhos com espécies de *Pasteurella*, por isso, os resultados obtidos foram comparados aos estudos realizados com outros gêneros de bactérias Gram negativas frente a copaíba, a bergamota e a camomila romana.

Outro OE testado, no atual estudo, que não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana frente as bactérias isoladas de gatos foi a bergamota. Os achados neste estudo, foram discrepantes dos publicados (FISHER; PHILLIPS, 2006; MANDALARI et al., 2007), os quais observaram atividade antimicrobiana frente a diferentes gêneros de bactérias Gram positivas e negativas, até mesmo ao *Staphylococcus*. Acredita-se, que essa diferença de resultado possa ser em decorrência da composição química do óleo. Entretanto, entre os trabalhos publicados existem discordâncias sobre os principais compostos com ação antimicrobiana.

No trabalho de Fisher e Phillips (2006), os autores concluíram que a presença de altas concentrações de linalol (15%) na bergamota seja responsável pela atividade antimicrobiana. Porém, além desse composto, o OE de bergamota testado por esses autores, apresentava limoneno (45%) e citral (0,7%). Já a bergamota utilizada no presente estudo tinha como principais compostos químicos, o limoneno (45%), acetato linalilo (35%), linalol (15%), alfa-pineno (2%) e beta-pineno (9,5%), mas não havia nenhum traço de citral. Mesmo em baixas concentrações, o citral tem sido apontado como um composto químico com ação bacteriana (NAIK et al., 2010; AIEMSAARD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013)

Nesse contexto, como sugerido por outras pesquisas, as vezes a ação antimicrobiana de determinados OEs ocorre por meio de sinergismo de seus compostos químicos e não só pela concentração propriamente dita (FURTADO et al., 2005; FRANCO et al. 2007; SANTOS et al., 2012b), o que pode explicar a ausência de reatividade frente aos isolados deste trabalho,

uma vez que o OE de bergamota testado não possuía citral, mas a mesma concentração de limoneno (45%), outro composto com ação antimicrobiana (FURNERI et al., 2012). Entretanto, Mandalari et al (2007), concluíram que a atividade antimicrobiana da bergamota está relacionada a presença de flavonoides, como hesperetina e naringenina. Desta maneira, outra explicação para falta de atividade antimicrobiana observada frente aos isolados de *Staphylococcus* e *Pasteurella* possa ser pela ausência de flavonoides no OE de bergamota testado neste trabalho.

Além da composição química, das diferentes concentrações dos compostos presentes e pelo sinergismo entre as substâncias, outras possíveis explicações para os resultados discrepantes entre estudos de atividade antimicrobiana dos OEs são a origem fitogeográfica e forma de cultivo da planta, pois já foi demonstrado que estes fatores interferem na composição química dos óleos (BURT, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; BIZZO et al., 2009).

No estudo presente, o OE com maior efetividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de *Staphylococcus* e a *Pasteurella* foi o capim limão. Esse OE apresentou melhores resultados tanto no teste de difusão em ágar, como na CIM e na CBM frente a todos os isolados testados. Nesse sentido, trabalhos científicos anteriores apresentaram resultados semelhantes aos do presente trabalho, em que o capim limão mostrou ação antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e negativas (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; MELO et al., 2001; PRABUSEENIVASA, JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; MAYAUD et al., 2008; NAIK et al., 2010; AIEMSAARD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SFEIR et al., 2013).

Esse óleo tem sido utilizado para diversas finalidades, inclusive como antibiótico natural a bastante tempo. Em sua composição já foram identificados vários compostos químicos, como o citral, β mircenol, dipenteno, linalol, geranial, citroneol, entre outros (BASSOLÉ et al., 2011). Mas, a sua ação antimicrobiana tem sido dada a presença majoritária do citral, que pode ser subdividido em neral e geranial (BASSOLÉ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Nesse contexto, o presente estudo reforça esse fato, uma vez que na composição do capim limão testado, o composto químico com maior concentração era o citral (50 a 100%). Inclusive, no estudo de Mayaud et al. (2008), os autores demonstraram que o capim limão apresentou efetividade contra *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e contra a *P. multocida*. Na composição química do OE de capim limão testado por esses autores foi encontrado altas concentrações de citral, o que robustece a teoria supracitada.

Ao analisar os resultados obtidos por Silva e colaboradores (2010), observou-se que a CIM para o capim limão foi de 0,1% (v/v) frente a 15 isolados de *S. aureus* oriundos de amostras

clínicas de humanos e uma cepa padrão ATCC 25923 e 0,4% (v/v) frente a isolados de *E. coli* também provenientes humanos e uma cepa padrão ATCC 25922. Já no estudo de Mayaud et al. (2008), os valores da CIM para *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *P. multocida* foram de 0,38% (v/v), 0,34% e 0,12%. Adicionalmente, Hammer, Carson e Riley (1999) obtiveram CIM de 0,06% (v/v) frente a cepa padrão de *S. aureus* (NCTC 6571). No presente estudo, o valor da CIM frente aos *Staphylococcus* e *Pasteurella* obtidas da cavidade bucal de gatos saudáveis e com gengivite foi de 0,023% (v/v). Desta forma, os resultados do presente estudo mostraram uma ação bacteriana melhor do que os outros estudos realizados anteriormente. As possíveis explicações para essas discrepâncias podem ser a composição química, como foi supracitada, e também devido a característica hidrofóbica do OE como foi citado por Silva et al. (2010), os quais relatam que este aspecto interfere na solubilidade no meio de cultura.

Outro aspecto relevante foi que os isolados de *S. lugdunensis* foram sensíveis ao OE de capim limão (concentrações de 50 a 100 µg/mL), uma vez que esta espécie bacteriana apresentou resistência a penicilina, ampicilina, meticilina, cefalotina e clindamicina em um estudo realizado por You et al. (1999), no qual foi investigado a patogenicidade dessa espécie isolada de amostras bucais de humanos com afecções agudas bucais. Com isso, pode-se inferir a importância de mais estudos com o OE de capim limão, afim de traçar o perfil da atividade antimicrobiana deste óleo, para que possa ser uma saída à resistência bacteriana aos antibióticos.

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que a melaleuca teve eficácia antibacteriana frente aos isolados de *Staphylococcus* e *Pasteurella*. É importante salientar que a melaleuca tem sido utilizada comercialmente em antissépticos bucais. Thomsen et al. (2011) demonstraram que esse produto teve atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*. Nesse estudo, os autores utilizaram a melaleuca a 5% (v/v) e fizeram os testes de difusão em ágar, CIM e CBM. Para a cepa padrão de *S. aureus* (NCTC 6571), a melaleuca apresentou atividade antimicrobiana, com halo de inibição de 34 mm no teste de difusão em ágar, CIM de 0,75% (v/v) e CBM 1,5% (v/v). Esse resultado foi discrepante ao obtido no presente estudo, em que para *S. aureus* foi observado um halo de inibição de 10 mm, CIM e CBM de 0,09% (v/v), com a concentração inicial de melaleuca de 14,25% (v/v).

Frente aos isolados de *Pasteurella*, a melaleuca (14,25% [v/v]) apresentou halos de inibição com 13, 11 e 14 mm, para *P. multocida*, *P. aerogenes* e *P. stomatis*, respectivamente. Para os isolados de *P. multocida*, a CIM e CBM foram de 0,09% (v/v), para *P. aerogenes* foram de 0,045% (v/v), para *P. stomatis* isoladas de gatos saudáveis foram de 0,045% e para gatos com

gingivite foram de 0,09%. Esses achados foram superiores aos observados pelo estudo realizado por Mayaud et al. (2008), tanto frente aos *Staphylococcus*, como a *Pasteurella*. Porém, esses autores utilizaram cepas padrões e isolados clínicos com resistência a antibióticos.

A ação antimicrobiana da melaleuca tem sido atribuída ao terpinen-4-ol, que é o composto majoritário, compreendendo aproximadamente 40% da composição deste OE. (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). A melaleuca utilizada no presente estudo também apresentava elevada concentração de terpinen-4-ol (25 a 50%) em sua composição. Entretanto, foi observado que alguns isolados do gênero *Staphylococcus* não apresentaram sensibilidade a esse OE. Por exemplo, três isolados de *S. warneri* (dois isolados de gatos saudáveis e um isolado de gato com gingivite) e um isolado de *S. auricularis* de um gato saudável proliferaram frente a todas as diluições utilizadas de melaleuca. Esses resultados sugerem que talvez esses isolados oriundos de gatos sejam naturalmente resistentes a esse OE.

O óleo essencial de cravo apresentou efetividade antibacteriana em ambos os grupos experimentais frente aos *Staphylococcus* e *Pasteurella*. Com relação ao teste de disco difusão, Mahakittikun et al. (2014), testaram o OE de cravo (2%) frente a cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e observaram a formação de halo de inibição de 10 mm. Esse resultado, apesar do diâmetro do halo formado ter sido menor ao observado no presente estudo, a concentração testada por nós foi quase seis vezes superior.

Nesse mesmo estudo (MAHAKITTIKUN et al., 2014), o cravo também foi eficiente frente a *E. coli* (10 mm) e *P. aeruginosa* (10,5 mm). Quando comparados esses resultados com os obtidos pelo presente trabalho, os isolados de *Pasteurella* também apresentaram sensibilidade ao cravo, com halos variando entre 14 a 23 mm, sendo superior aos obtidos para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Porém, as concentrações e a técnica utilizada para a análise do OE de cravo foram diferentes desses autores, o que poderia explicar as discrepâncias entre resultados. Mas, mesmo assim, pode-se inferir que o cravo tem uma ação antibacteriana contra os isolados de amostras bucais de gatos.

Em relação aos testes da CIM, Prabuseenivasan e colaboradores (2006), observaram que cravo apresentou atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* com CIM de 6,4 mg/mL. Ademais, em outro estudo em que foi testado o cravo frente a *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa, os resultados da CIM foram 0,6% (v/v) e 0,62% (v/v), respectivamente (MAYAUD et al., 2008). Esses resultados foram inferiores aos observados pelo presente estudo, em que os valores da CIM para o *S. aureus* e para outras espécies de *Staphylococcus* foram de 0,4 mg/mL (0,09%, v/v), independentemente do grupo experimental. Infelizmente, os

achados obtidos no presente trabalho não podem ser comparados integralmente com os publicados anteriormente, pois há diferenças com relação a densidade dos OEs testados e com as concentrações. Contudo, é possível inferir que OE de cravo possui atividade antimicrobiana frente a diferentes isolados de *Staphylococcus*.

Em adição, em um estudo realizado com óleo puro de eugenol, um dos principais compostos químicos do OE de cravo, a CIM obtida frente ao *S. aureus* foi de 0,4 µL/mL (THOSAR et al., 2013). Esse resultado reforça a teoria que o principal composto químico com ação antimicrobiana do cravo seja realmente o eugenol. Nesse contexto, nossos achados fortalecem essa teoria, pois OE de cravo testado tinha como composto majoritário o eugenol (92%). Inclusive, os resultados obtidos por Mayaud et al. (2008) vêm somar esforços nesse sentido, pois o óleo de cravo utilizado por estes autores tinha 75,52% de eugenol em sua composição. Entretanto, ressalta-se que a dificuldade de padronização das técnicas utilizadas, bem como a forma de diluição e incorporação do OE ao meio de cultura podem também explicar as diferenças entre os resultados encontrados nesses estudos com outros anteriormente publicados.

Os isolados de *Pasteurella* oriundos dos gatos sadios e com gengivite também apresentaram sensibilidade frente ao óleo de cravo, com CIM e CBM de 0,09% (v/v). Enquanto, Mayaud et al. (2008) obtiveram valor da CIM para *P. multocida* de 0,47% (v/v). Não existem outros trabalhos disponíveis para comparar com os resultados dos testes de sensibilidade de OEs frente a isolados de *Pasteurella*. Todavia, os achados encontrados pelo presente estudo e por Mayaud et al. (2008) demonstraram que esse gênero bacteriano tem sensibilidade antimicrobiana ao cravo e provavelmente o eugenol seja responsável por esta ação.

Dentre os quatros OEs avaliados nos testes de CIM e CBM, a camomila romana foi o único óleo que não apresentou boa atividade antimicrobiana, uma vez que alguns isolados de *Staphylococcus* e *Pasteurella* foram resistentes. A composição química da camomila romana, de acordo com Duarte et al. (2005), compreende 1,8 cineol, terpinen-4-ol, geraniol, geranyl acetato, β farnesene, γ murolene, β bisabolene, biciclogermacrene e octen-4-ol, sendo que os principais compostos com atividade antimicrobiana são 1,8 cineol, limoneno, linalol, geraniol, germacrene e mentol. Saderi et al. (2005) demonstraram ação antimicrobiana da camomila frente a isolados de *Porphyromonas gingivalis*, com halo de inibição de 20,5 mm, sendo esse resultado acima do observado frente ao *S. aureus* (halo de 9 mm), aos isolados de *Staphylococcus* de gatos sadios (halos de 10 a 18 mm) e dos com gengivite (halos de 10 a 11 mm). Para as *Pasteurella* também houve uma variação nos resultados e estes foram inferiores

aos dos autores supracitados, com halos de inibição de 11 a 13 mm. Contudo, os autores não apresentaram a composição química do OE e nem a concentração utilizada, o que dificulta discutir e comparar os achados no presente trabalho.

Bail et al. (2009) testaram a camomila romana frente a diferentes gêneros bacterianos, inclusive *Staphylococcus*. Os resultados observados por esses autores mostraram que a camomila romana teve ação antimicrobiana, com halo de inibição para o *S. aureus* de 20 mm e CIM de 600 µg/mL e, para bactérias Gram negativas, halo de inibição variou entre 9 a 19 mm e CIM de 60 (*Salmonella* e *E. coli*) a 600 µg/mL (*P. aeruginosa*, *P. vulgaris* e *K. pneumoniae*). Esses autores concluíram que ação antimicrobiana da camomila romana é decorrente principalmente do isobutil e metilbutil angelato e isobutil isobutirato. Fato relevante observado e que pode explicar as diferenças entre os resultados do presente estudo e desses autores é que apenas o isobutil angelato estava presente na composição da camomila romana testada.

Em adição, deve-se ressaltar que alguns isolados de *Staphylococcus* e de *Pasteurella* oriundos da cavidade bucal dos gatos foram resistentes a camomila romana. Não foi possível a realização da caracterização e da concentração dos diferentes compostos químicos presentes na camomila romana utilizada em neste estudo e por isso, não se pode inferir sobre as possíveis razões para esses achados. Entretanto, os compostos de 1,8 cineol, geraniol, limoneno, citronelol, linalol, angelato, alfa e beta-pineno compunham o OE de camomila romana investigada nesse estudo, sendo que a maioria destes possui ação antimicrobiana.

Por fim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os OEs de capim limão, cravo e melaleuca possuem potencial para serem utilizados como dentifrício ou antisséptico bucal para gatos domésticos, podendo serem estudados futuramente o desenvolvimento de produtos para higiene bucal de gatos. Todavia, outras investigações são necessárias para demonstrar esse potencial, principalmente, no que tange aos testes de toxicidade *in vivo*. Inclusive, a própria aceitação por parte do animal, uma vez que os gatos tendem a sialorreia, quando estimulados ou quando ingerem substâncias com odores ou sabores desagradáveis ao seu paladar.

7 CONCLUSÕES

- Os *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. estão presentes na cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Os OEs de bergamota e copaiba não possuem ação antimicrobiana frente a isolados *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- O OE de capim limão possui melhor efetividade antimicrobiana, que os OEs de cravo, melaleuca e camomila romana frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.
- Entre os dois grupos experimentais, gatos sadios e com gengivite, não houve diferença numérica de sensibilidade antimicrobiana entre os OEs testados frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos sadios e com gengivite.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMIAN, F.M.; GOLDSTEIN, E.J.C. Microbiology of animal bite wound infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 231-246, 2011.
- ADDIE, D.D.; RADFORD, A.; YAM, P.S.; TAYLOR, D.J. Cessation of feline calicivirus shedding coincident with resolution of chronic gingivostomatitis in a cat. **J. Small Anim. Pract.**, v 44, p. 172-176, 2003.
- ADEGOKE, G.O.; ODESOLA, B.A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 37, p. 81–84, 1996.
- AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI, S.; AROMDEE, C.; TAWEECHASUPAPONG, S.; KHUNKITTI, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Res. Vet. Sci.**, v. 91, p. e31–e37, 2011.
- AL-SNAFI, A.E. Medical Importance of *Anthemis nobilis* (*Chamaemelum nobile*) – A Review. **Asian J. Pharm. Sci. Tech.**, v. 6, p. 89-95, 2016.
- BAIL, S.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; STOYANOVA, S.; SCHMIDT, E.; GEISLER, M. Antimicrobial activities of roman chamomile oil from France and its main compounds. **J. Essential Oil Res.**, v. 21, p. 283-286, 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMA, R. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; OBAME, L.C.; ILBOUDO, A.J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytom. Suppl.**, v. 18, p. 1070-1074, 2011.
- BELLEI, E.; DALLA, F.; MASETTI, L.; PISONI, L.; JOECHELER, M. Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). **Vet. Res. Commun.**, v. 32, p. S231-S234, 2008.
- BELLOWS, J. Feline Dentistry: Oral Assessment, Treatment, and Preventative Care. **Wiley-Blackwell**, 314 p., 2010.
- BIBERSTEIN, E.L.; JANG, S.S.; KASS, P.H.; HIRSH, D.C. Distribution of indole producing urease-negative *Pasteurella* in animals. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 3, p. 319-323, 1991.
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v.32, p. 588-594, 2009.
- BOOIJ-VRIELING, H.E.; REIJDEN, W.A.; HOUWERS, D.J.; WIT, W.E.A.J. de; BOSCH-TIJHOF, C.J.; PENNING, L.C.; WINKELHOFF, J.V.; HAZEWINKEL, H.A.W. Comparison of periodontal pathogens between cats and their owners. **Vet. Microbiol.**, v. 144, p. 147-152, 2010.

BOUKHATEM, M.N.; FERHAT, M.A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H.T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan J. Med.**, v. 9, p. 1-10, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013. 149p.

BURT, S.A.; Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 36, p. 162–167, 2003.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 50-62, 2006.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antim. Ag. Chemoth.**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.

CATALÁN, A.; PACHECO, J.G.; MARTÍNEZ, A.; MONDACA, M.A. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol.**, v. 105, p. 327-332, 2007.

CHINSEMBU, K.C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral healthy. **Acta Trop.**, v. 154, p. 6-18, 2005.

COSTA, R.; DUGO, P.; NAVARRA, M.; RAYMO, V.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Study on the chemical composition variability of some processed bergamot (*Citrus bergamia*) essential oils. **Flavour Fragr. J.**, v. 25, p. 4-12, 2010.

DIEHL, K.; ROSYCHUCK, R.A. W. Feline gingivitis-stomatitis-pharyngitis. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 23, p. 139-153, 1993.

DEWHIRST, F.E.; KLEIN, E.A.; BENNET, M.L.; CROFT, J. M.; HARRIS S.J.; MARSHALL-JONES Z. V. The feline oral microbiome: A provisional 16S rRNA gene based taxonomy with full-length reference sequences. **Vet. Microbiol.**, v. 175, p. 294-303, 2015.

DOLIESLAGER, S.M.J.; BENNETT, D.; JOHNSTON, N.; RIGGIO, M.P. Novel bacterial phylotypes associated with the healthy feline oral cavity and feline chronic gingivostomatitis. **Res. Vet. Sci.**, v. 94, p. 428-432, 2013.

- DOLIESLAGER, S.M. J.; RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; LAPPIN, D F.; JOHNSTON, N.; TAYLOR D.; BENNET, D. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. **Vet. Microbiol.**, v. 148, p. 93-98, 2011.
- DUARTE, S.; KOO, H. BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel tipe of propolis and it's chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans *Streptococci*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, p. 527-531, 2003.
- DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- ELLIOT, D.R.; WIOLSON, M.; BUCKLEY, C.M.F.; S'RATTI, A. Cultivable oral microbiota of domestics dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5470-5476, 2005.
- FERREIRA, T.S.P.; FELIZARDO, M.R.; GOBBI, D.D.S. de; MORENO, M.; MORENO A. M. Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in *P. multocida* strains isolated from cats. **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, p. 271-277, 2015.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **J. Antim. Ag. Chemoth.**, v. 101, p. 1232-1240, 2006.
- FONSECA, A.O.S.; PEREIRA, D.I.B.; JACOB, R.G.; MAIA FILHO, F.S.; OLIVEIRA, D.H.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.S.; OSÓRIO, L. G.; BOTTON, S.A.; MEIRELES, M. C.A. *In vitro* susceptibility of brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* family species. **Microbiology**, v. 179, p. 253-258, 2015.
- FRANCO, A.L.; OLIVEIRA, T.B.; FERRI, P.H.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (Alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (Alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafrão). **Rev. Elet. Farm.**, v. 4, p. 208-220, 2007.
- FRANK, K.L.; REICHERT, E.J.; PIPER, K.E.; PATEL, R. *In Vitro* Effects of Antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antim. Ag. Chemoth.**, v. 51, p. 888-895, 2007.
- FRESHWATER, A. Why your housecat's trite little bite could case you quite a fright: A study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*. **Zoon. Pub. Health**, v. 55, p. 507-513, 2008.
- FURNERI, P.M.; MONDELLO, L.; MADALARI, G.; BISIGNANO, G. *In vitro* antimycoplasmal activity of *citrus bergamia* essential oil and its mayor components. **Eur. J. Med. Chem.**, v 52, p. 66-69, 2012.

FURTADO, R.F.; LIMA, M.G.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; SILVA, M.G.V. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical. Entomol.**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GANIERE, J.P.; ESCANDE, F.; ANDRE, G.; LARRAT, M., Characterization of *Pasteurella* from gingival scrapings of dogs and cats. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 77-85, 1993.

GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. *In vitro* antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Lett. App. Microbiol.**, v. 49, p. 806-808, 2009.

GBENOV, J.D.; AHOUNOU, J.F.; AKAKPOH, B.; LALEYE, A.; YAYI, E.; GBAGUIDI, F.; MOUSSA, L.B.; DARKBOUX, R.; DANSOU, P.; MOUDACHIROU, M.; JOTCHONI S.O. Phytochemical composition of *Cytopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and they anti-inflammatory and analgesic properties on wistar rats. Springer **Sci. Mol. Biol. Rep.**, v. 40, p. 1127-1134, 2013.

GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GREENE, C.; GLAUS, B.; WOLFENSBERGER, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2883-2885, 1997.

GOLDSTEIN, E.J.C.; CITRON, D.M.; WIELD, B.; BLACHMAN, U.; SUTTER, V.L.; MILLER, T.A.; FINEGOLD, S.M.; Bacteriology of human and animal bite wounds. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, p. 667-672, 1978.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity amazonian copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 486-492, 2007.

GRAZIANO, A.C.E.; CARDILE, V.; CRASCI, L.; CAGGIA, S.; DUGO, P.; BONINA, F.; PANICO, A. Protective effects of a extract from *Citrus bergamia* against in inflammatory injury in interferon-gamma and histamine exposed human keratinocytes. **Life Sci.**, v. 90, p. 968-974, 2012.

GREENE, J.P. Risk factors associated with the development of chronic kidney disease in cats evaluated at primary care veterinary hospitals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 244, p. 320-327, 2014.

GROPPO, F.C.; RAMACCIATO, J.C.; SIMÕES, R.P.; FLÓRIO, F.M.; SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and clorhexidine against oral microorganisms. **Int. Dental J.**, v. 52, p. 433-437, 2002.

GUIMARÃES, A.L.A.; CUNHA, E.A.; GARCIA, P.G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V.A.; NOGUEIRA, R. J. L. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera officinalis*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) oils against *Staphylococcus aureus*: importance in compounding for wound care. **Int. J. Pharm. Comp.**, v. 20, p. 58-62, 2016.

GULÇIN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUT-ENEIN, H.Y. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. **Arabian J. Chem.**, v. 5, p. 489–499; 2012.

- GUSTAVSON, O.; JOHANSSON, A.H.; MONSTEIN, H.J.; NILSSON, L.E.; BREDBERG, A. A wide spectrum of fastidious and ampicillin-susceptible bacteria dominate in animal-caused wounds. **European J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, p. 1315-1321, 2016.
- HABA, E.; BOUHDID S.; TORREGO-SOLANA, N.; MARQUES, A.M.; ESPUNY, M.J.; GARCÍA-CELMA, M.J.; MANRESA, A. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Pharm.**, v. 476, p. 134-141, 2014.
- HALDER, S.; MEHTA, A.K.; MEDIRATTA, P.K.; SHARMA K.K. A cute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllus* on cognition and pain in mice. **Arch. Pharmacol.**, v 385, p. 587-593, 2012.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J. App. Microbiol.**, v. 86, p. 985-990, 1999.
- HAMMER, K.A.; DRY, L.; JOHNSON, M.; MICHALAK, E.M.; CARSON C. F.; RILEY, T. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, p. 389-392, 2003.
- HARPER, M.; BOYCE, J.D.; ADLER, B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 265, p. 1-10, 2006.
- HARVEY, C.E.; THORNBERRY, C.; MILLER, B.R. Subgingival bacteria comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis. **J. Vet. Dent.**, v. 12, p. 147-150, 1995.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16, p. 997–1005, 2009.
- HEMALATHA, R.; NIVETHA, P.; MOHANAPRIYA, C.; SHARMILA, G.; MUTHUKUMARAN, C. GOPINATH, M. Phytochemical composition, GC-MS analysis, *in vitro* antioxidant and antibacterial potential of clove flower bud (*Eugenia caryophyllus*) methanolic extract. **J Food Sci Technol**, v. 53, p. 1189-1198, 2016.
- HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool effects antimicrobial efficacy of essential oils. **Curr. Microbiol.**, v. 72, p. 165-172, 2016.
- HEY, P.; GOW, P.; TORRESI, J.; TESTRO, A. Cirrhosis, cellulitis and cats: a ‘purrfect’ combination for life threatening spontaneous bacterial peritonitis from *Pasteurella multocida*. **BMJ Case Reports**, v. 11, p. 1-3, 2012.
- HÖGBERG, L.D.; HEDDINI, A. CARSON, O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. **Pharmacol. Sci.**, v 31, p. 509-515, 2010.
- HOLST, E.; ROLLOF, J.; LARSSON, L.; NIELSEN, J.P. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2984–2987, 1992.

HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 269-275, 1997.

IVANOVIC, J.; DIMITRIJEVIC-BRANKKOVIC, S.; MISIC, D.; RISTIC, M.; ZIZOVIC, I. Evaluation and improvement of antioxidant and antibacterial activities of supercritical extracts from clove buds. **J. Fund. Foods**, v. 5, p. 416-423, 2013.

JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; LANDRY, M.L.; RICHTER, S.S.; WARNOCK, D.W. Manual of Clinical Microbiology, Eleven edition. **ASM Press**, v. 1, 2730 p., 2015.

JUNIOR, V.D.V.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Herber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 248-254, 2007.

KAZEMIAN, H.; GHAFOURIAN, S.; HEIDARI, H.; HOURI, H.; MALEKI, A.; SADEGHIFARD, N. Antibacterial, anti-swarmig and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, p. 432-436, 2015.

KIL, D.Y.; SWANSON, K.S. Companion animals symposium: role of microbes in canine and feline health. **J. Anim. Sci.**, v.89, p. 1498-1505, 2014.

KIM, I.; KIM, Y.W.; CHUNG, S.; YOON, H.E.; SHIN, S.J. Cat induced *Pasteurella multocida* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Kidney Res Clin Pract**, v. 33, p. 65-67, 2014.

KWIECINSKI J.; ERICK S.; WOJCIK, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **Int. J. Antim. Ag.**, v. 33, p. 343-347, 2009.

LAM, P.W.; PAGE, A.V. *Pasteurella multocida* non-native joint infection after a dog lick: A case report describing a complicated two-stage revision and a comprehensive review of the literature. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 212-217, 2015.

LAMBERT, P.A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, v. 92, p. 46-54, 2002.

LARA, V.M.; CARREGARO, A.B.; SANTURIO, D.F.; de SA, M.F.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from *Alouatta* spp. feces to essential oils. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2016:1643762. doi: 10.1155/2016/1643762. Epub 2016 May 30.

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K; JANA, M. Antibacterial activity of some moroccan medicinal plants. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 250–252, 2001.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: A cura pelos óleos essenciais**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Nova Era: 2009.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LINDEMAN, Z.; WAGGONER, M.; BATDORFF, A.; HUMPHREYS, T.L.; Assessing the antibiotic potential of essential oil against *Haemophilus ducreyi* . **BMC Comp. Alt. Med.**, v. 14, p. 1-4, 2014.

LIORÉ, A. EGBERINK, H.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MOSTL, K.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUVEN, U.; HORZINEK, M.C. *Pasteurella multocida* infection in cats. **J. Feline Med. Surg.**, v. 15, p. 570-572, 2013.

LILENBAUM, W.; NUNES, E.L.C.; AZEREDO, M.A.I. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from the skin surface of clinically normal cats. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 224-228, 1998.

LOMMER, M. Oral inflammation in small animals. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 43, p. 555-571, 2013.

LOVE, D.N.; JOHNSON, J.L.; MOORE, L.V.H. *Bacteroides* species from the oral cavity and oral-associated diseases of cats. **Vet. Microbiol.**, v. 19, p. 275-281, 1989.

LOVE, D.N., VEKSELSTEIN, R., COLLINGS, S. The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal feline gingival margin. **Vet. Microbiol.**, v. 22, p. 267-275, 1990.

LOVE, D.N.; MALIK, R.; NORRIS, J.M. Bacteriological warfare amongst cats: what have we learned about cat bite infections. **Vet. Microbiol.**, v. 74, p. 179-193, 2000.

LYON, K. F. Gingivostomatitis. **Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.**, v. 35, p. 891-911, 2005.

MAHAKITTIKUN, V.; SOONTHORNCHAREONNON, N. FOONGLADDA, S.; BOITANO, J.J.; WANGAPAI, T.; NINSANIT, P. A preliminary study of the acaricidal activity of clove oil, *Eugenia caryophyllus*. **Asian Pac. J. Allergy**, v. 32, p. 46-52, 2014.

MAHMOUD, H.; MINA, K.A.; HASSAN, R. Analgesic effect of clove essential oil in mice. **Asi J. Phytomed**, v. 1, p. 1–6, 2011.

MALLONEE, D.H.; HARVEY, C.E.; VENNER, M.; HAMMOND, B.F. Bacteriology of periodontal disease in the cat. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 667-683, 1988.

- MANDALARI, G.; BENNETT, R.N.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.B.; GASSON, M.J.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoides extracted from bergamot (*Citrus bergamia Risso*) pell, a by product of essential oil industry. **J. App. Microbiol.**, v. 103, p. 2053-2064, 2007.
- MASALMA, M.A; RAOULT, D.; ROUX, V. *Staphylococcus massiliensis* sp. isolated from a human brain abcess. **Inter. J. System. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 1066-1072, 2010.
- MASTELI, J.; JERKOVIC, I.; BLAZEVIC, I.; POLJAK-BLAZI, M.; BOROVIC, S.; IVANCIC-BACE, I.; SMVECKI, V.; ZOEKOVIC, N.; BRCIC-KOSTIC, K.; VIKIC-TOPIC, D.; MULLER, N. Comparative study on the antioxidante and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 3989-3996, 2008.
- MAYAUD, L.; CARRICAJÓ, A.; ZHIRIA, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Lett. App. Microbiol.**, v. 47, p. 167-173, 2008.
- MELO, S.F.; SOARES, S.F.; COSTA, R.F.; SILVA, C.R.; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutat. Res** , v. 496, p. 33–38, 2001.
- MERTAS, A.; GARBUNSINSKA, A.; SZLISZKA, E.; JURECZKO, A.; KOWALSKA M.; KROL, W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 1-9, 2013.
- MOLINA-GARZA J.; BAZALDÚA-RODRÍGUEZ, A.F.; QUINTANILLA-LICEA, R.; GALAVIZ-SILVA, L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Tropica**, v. 136, p. 14-18, 2014.
- MUNIZ, I.M.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Treating animal bites: susceptibility of *Staphylococci* from oral mucosa of cats. **Zoonoses Public Health.**, v. 60, p. 504-508, 2013.
- MYTLE, N.; ANDERSON, G.L.; DOYLE, M.P.; SMITH, M. A. Antimicrobial activity of clove (*Syzguim aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control.**, v. 17, p. 102-107, 2006.
- NAIK, M.I.; FOMDA, B.A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 3, p. 535-538, 2010.
- NINOMIYA, K.; HAYAMA, K.; ISHIJIMA, S.A.; MARUYAMA, N.; IRIE, H.; KURIHARA, J.; ABE, S. Suppression of inflammatory reactions by terpinen-4-ol, a main constituent of tea tree oil, in a murine model of oral candidiasis and its suppressive activity to cytokine production of macrophages *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36, p. 838-844, 2013.

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 óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, T.L.C.; SOARES, R.A.; PICCOLI, R.H.A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, p. 645–651, 2013.

O'NEILL, D.G.; CHURCH, D.B.; MCGREEVY, P.D.; THOMSON, P.C.; BRODBELT, D. C. Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. **Vet. J.**, v. 202, p. 286-291, 2014.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PARANAGMA, P.A.; ABEYSEKERA, K.H.T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADDE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. **Lett. App. Microbiol.**, v. 37, p. 86-90, 2003.

PEDROSO, R.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L.E.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V. Biological activities of essential oil obtained from *Cymbopogon citratus* on *Crithidia deanei*. **Acta Protozool.**, v. 45, p. 231-240, 2006.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.M.; FIORINI, J.E.; MOREIRA, M.A.S.; SCHEEDORE, J.M. Bacteriostatic Effect of Copaiba Oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz. Dent. J.**, v. 23, p. 36-38, 2012.

POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I.H.; ALVE, S S.H.; COSTA, M M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* ssp isolados de mastite caprina. **Cienc. Rural**, v. 41, p. 667 - 672, 2011.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement. Alternat. Med.**, v. 39, p. 1-8, 2006.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RAJKHOWA, S. Development of a novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* from pigs. **App. Microbiol.**, v 61, p.293 - 298, 2015.

RADAELLI, M.; PARRAGA DA SILVA, B.; WEIDLICH, L.; HOEHNE, L.; FLACH, A.; MENDONÇA, A.; COSTA, A.; ETHUR, E.M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, p. 424 - 430, 2016.

RODRIGUES DA SILVA, L.; MARTINS, L.V.; CALOU, I.B.F.; DEUS, M.S.M.; FERREIRA, P.M.P.; PERON A.P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicol. Argent.**, v. 23, p. 36 - 43, 2015.

ROMANO, L.; BATTAGLIA, F.; MASSUCI, L.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; PLOTTI, G.; ZANETTI, S.; FADDA, G. *In vitro* activity of bergamot natural essence and furocoumarinfree and distilled extracts, and their associations with boric acid. **J. Antimicrob. Chermother.**, v. 55, p. 110 - 114, 2005.

ROTA, M.C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R.M.; SOTOMAYOR, J.A.; JORDAN M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control.**, v. 19, p. 681-687, 2008.

SADERI, H.; OWLIA, P.; HOSSEINI, A.; SEMIYARI, H. Antimicrobial effects of chamomile extract and essential oil on clinically isolated *Porphyromonas gingivalis* from Periodontitis. **Acta Hortic.**, v. 6, p. 145-146, 2005.

SANTIN, M.R.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; FERREIRA, I.C.P.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 1489 - 1496, 2009.

SANTOS, A.D.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, p. 413 - 423, 2007.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; JUNIOR, V F.V.; PINTO, A.C.; KAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from diferente species of the *Copaifera* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v 3, p. 277 - 2008, 2008.

SANTOS, N.S.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Doença periodontal em cães e gatos. **MEDVEP- Revista Científica de Medicina Veterinária – pequenos animais e animais de estimação**, v. 10, p. 631-637, 2012a.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; CRUZ, A.B.; SCHIT, A.P. CRUZ, R.C.B; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Pipermalacophyllum* (C.PRESL.) C.DC. **Quim. Nova**, v. 35, p. 477-481, 2012b.

SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D.F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P.R.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmolla entérica* de origem avícola. **Cienc. Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-base antibacterial assay incorporating resazurin as na indicator of cell growth, ad its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

SCANNAPIECO, F.A. The Oral Microbiome: Its role in health and in oral systemic infections. **Clin. Microbiol. Newslett.**, v. 35, p. 163-169, 2013.

SINGH, A.K.; DHAMANIG, I S. S.; ASAD, M. Anti-stress activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). **Indian J. Pharmacol.** v. 41, p. 28-31, 2009.

SFEIR, J.; LEFRANÇOIS, C.; BAU, UX, D.; DERBRE, S.; LICZNAR, P. *In Vitro* Antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

SILVA, N.; IGREJAS, G.; FIGUEIREDO, N.; GONÇALVES, A.; RADHOUANI, H.; RODRIGUES, J.; POETA, P. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Sci. Total Env.**, v. 408, p. 4871-4876, 2010.

SIMOES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. 1104p.

SRIVASTAVA, J.K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: a herbal medicine of the past with bright future. **Mol. Med. Report.**, v. 1, p. 895-901, 2010.

SOL, P.M.; VAN DE KAR, N.C.A.J.; SCHREUDER, M.F. Cat induced *Pasteurella multocida* peritonitis in peritoneal dialysis: a case report and review of the literature. **Int. J. Hygiene Env. Health**, v. 216, p. 211-213, 2013.

STURGEON, A.; PINDER, S.L.; COSTA, M.C.; WEESE, J.S.; Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. **Vet. J.**, v. 201, p. 223-229, 2014.

TALAN, D.A.; CITRON, D.M.; ABRAHAMIAN, F.M.; MORAN, G. J.; GOLDSTEIN, E.J.C. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. **New England J. Med.**, v. 340, p. 85-92, 1999.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 61-64, 2004.

TANNOCK, G.W. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 270-274, 1997.

TENG, Y.A.; TAYLOR, G.W.; SCANNAPIECO, F.A.; KINANE, D.F.; CURTIS, M.; BECK, J.D.; KOGON, S. Periodontal health and systemic disorders. **J. Can. Dent. Assoc.**, v. 68, p. 188-192, 2002.

THAPA, D.; LOSA, R.; ZWEIFEL, B.; WALLACE, J. Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. **Microbiology**, v. 158, p. 2870-2977, 2012.

- THOMSEN, S.; JENSEN, T.M.; HAMMER, K.A.; CARSON, C. F.; MOLGAARD, P.; RILEY, T.V. Survey of the antimicrobial activity of commercially available australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products *in vitro*. **J. Alt. Comp. Med.**, v 17, p. 835-841, 2011.
- THOSAR, N.; BASAK, S.; BAHADURE, R.N.; RAJURKAR, M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. **European J. Dent.**, v. 7, p. 71-77, 2013.
- TYAGI, A.K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopi observations and chemical characterization of *cymbopogon citratus*. **BMC Complement Altern. Med.**, v. 10, p. 10-65, 2010.
- VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Vet. Bras. PI. Med.**, v.14, p. 57-67, 2012.
- VAN-VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VIJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 48, p. 440–446, 2009.
- VAPALAHTI, K.; VIRTALA, A.M.; JOENSUU, T.A.; TIIRA, K.; TAHTINEN, J.; LOHI, H. Health and behavioral survey of over 8000 finish cats. **Front Vet. Sci.**, v. 29, p. 1-16, 2016.
- VENTURINI, M.A.F.A.; FERRO, D.G.; CORREA, H.I.; GIOSO, M.A. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses – estudo retrospectivo. **Nosso Clínico**, v. 59, p. 6-14, 2007.
- WADE, W.G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol. Res.**, v. 69, p.137-143, 2013.
- WATERS, L.C.D.; HOPPER, C.D.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A. Chronic gingivitis in a colony of cats infected with feline immunodeficiency virus and feline calicivirus. **Vet. Rec.**, v. 132, p. 340-342, 1993.
- WEISS, G.A.; PANESAR, M. *Pasteurella multocida* peritonitis with bacteremia on initiation of peritoneal dialysis. **Perit. Dial. Int.**, v. 32, p. 363-364, 2012.
- WILSON, B.A; HO, M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. **Clin. Microbiol.. Rev**, v. 26, p. 631-655, 2013.
- YOU, Y.O.; KIM, K.J.; MIN, B.M.; CHUNG, C.P. *Staphylococcus lugdunensis* – a potential pathogen in oral infection. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol.**, v. 88, p. 297-302, 1999.

ZONG, Z. Characterization of a complex context containing *mecA* but lacking genes encoding cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus haemolyticus*. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 1-8, 2013.