

Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães¹

Rosângela E. Ziech², Luana D. Farias², Cláudia Balzan², Magnos F. Ziech³,
Berta M. Heinzmann⁴, Osmar A. Lameira⁵ e Agueda C. de Vargas^{2*}

ABSTRACT.- Ziech R.E., Farias L.D., Balzan C., Ziech M.F., Heinzmann B.M., Lameira O.A. & Vargas A.C. 2013. [Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera reticulata*) against coagulase positive *Staphylococcus* of canine otitis.] Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(7):909-913. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: agueda.vargas@gmail.com

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of the oleoresin *Copaifera reticulata* Ducke against *Staphylococcus* coagulase positive (SCP) isolated from otitis externa in dogs. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the oleoresin were determined by broth microdilution method. In addition, we verified the antimicrobial susceptibility profile of the isolates of SCP by agar diffusion method. Eight classes of antimicrobial were used to calculate the multidrug resistance. The chemical composition of the oleoresin was performed by gas chromatography coupled to the mass spectrometry (GC/MS), and β -caryophyllene, β -bisabolene, and (*E*)- α -bergamotene were the main compounds found. The copaiba oleoresin showed a MIC₉₀ of 0.164mg/mL and a CBM₉₀ of 1.3mg/mL. The multidrug resistance was found in 27% of the strains tested. The results suggest that copaiba oleoresin has bacteriostatic and bactericidal activity even in multidrug-resistant coagulase-positive strains.

INDEX TERMS: Phytotherapy, copaiba oil, *Copaifera reticulata*, *Staphylococcus*, canine otitis treatment, antimicrobial resistance, multiresistant strains.

RESUMO.- O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial antimicrobiano do oleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) provenientes de casos de otite externa em

cães. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de oleorresina de copaíba. Em adição, foi determinado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de SCP pelo método de difusão em ágar. Oito classes de antimicrobianos foram usadas para o cálculo de multirresistência antimicrobiana. A determinação da composição química do oleorresina de copaíba foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), sendo que β -cariofileno, β -bisaboleno e (*E*)- α -bergamoteno foram os compostos majoritários. O oleorresina de copaíba demonstrou CIM₉₀ de 0,164mg/mL e CBM₉₀ de 1,31mg/mL. A multirresistência foi verificada em 27% das cepas testadas. Os resultados sugerem que o oleorresina de copaíba exerceu atividade bacteriostática e bactericida mesmo em cepas multirresistentes de *Staphylococcus* coagulase-positiva.

¹ Recebido em 6 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 15 de abril de 2013.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1000, prédio 44, sala 5137, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: agueda.vargas@gmail.com

³ Universidade de Tecnologia Federal do Paraná, Estrada Para Boa Esperança, Km 4, Bairro UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, 85660-000.

⁴ Departamento de Farmácia Industrial, UFSM, Av. Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900.

⁵ Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Amazônia Oriental, Cx. Postal 48, Belém, PA 66095-100, Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Fitoterapia, oleorresina de copaíba, *Copaifera reticulata*, *Staphylococcus*, tratamento da otite canina, resistência antimicrobiana, cepas multirresistentes.

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são componentes da microbiota cutânea e da mucosa dos animais de sangue quente, no entanto algumas espécies também podem se comportar como patógenos oportunistas (Scott et al. 2001), como é o caso das espécies coagulase-positiva (Frank et al. 2003, Morris et al. 2006). Espécies de *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) são consideradas patógenos primários em cães e um dos agentes etiológicos da otite canina externa (Kiss et al. 1997, Oliveira et al. 2006), que, estima-se, acomete 5 a 20% dos cães (Rougier et al. 2005).

A etiologia da otite em cães é multifatorial e a maioria dos casos evolui para um tipo crônico recidivante, ou seja, os fatores ligados aos quadros de fundo da otite, como a atopia, acabam ocasionando tratamentos antimicrobianos repetidos e continuados, o que contribui para a seleção de cepas resistentes. Por isso as altas taxas de recidiva acabam resultando um número clinicamente significativo de *Staphylococcus* spp. com algum grau de resistência aos antimicrobianos (Werckenthin et al. 2001, Malik et al. 2005, Morris et al. 2006). Estudos apontam um padrão na correlação entre a resistência aos antibióticos observada em bactérias isoladas, inclusive de cães e a quantidade e frequência de utilização de certos antibióticos (Prescott et al. 2002, Malik et al. 2005). A possibilidade de transferência de *Staphylococcus* resistentes à meticilina dos cães para os humanos tem sido identificada como um potencial risco à saúde pública (Malik et al. 2005). O aumento de tolerância de vários micro-organismos contra antimicrobianos comumente usados representam um desafio aos cientistas para encontrar meios alternativos de tratar tais infecções. Estas medidas incluem a prudência no uso de antibióticos e, principalmente, a condução de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, tanto sintéticos como naturais (Nascimento et al. 2000).

No Brasil há uma enorme gama de fitoterápicos com grande aceitação pela população, entretanto com poucas evidências científicas sobre a real eficácia. Dentre estes fitoterápicos destaca-se o oleorresina de copaíba, um exsudato vegetal constituído por ácidos resinosos e rico em diterpenos e sesquiterpenos, com potencial atividade farmacológica, principalmente propriedades anti-inflamatória e cicatrizante testadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Veiga et al. 2007), atividade antimicrobiana e antisséptica também são citadas na literatura, embora com menor frequência (Veiga & Pinto, 2002, Rigamonte-Azevedo et al. 2004, Pieri et al. 2009).

Apesar da constante busca na medicina veterinária por terapias alternativas e efetivas, até o momento não existem publicações disponíveis na literatura sobre o uso do oleorresina de copaíba no tratamento de otite externa em cães. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade antimicrobiana *in vitro* do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) contra *Staphylococcus* coagulase positiva isolado de casos clínicos de otite externa.

MATERIAL E MÉTODOS

O oleorresina de copaíba, extraído em maio de 2011, foi fornecido pela Embrapa Amazônia Oriental. Para a coleta do exsudato foram utilizadas plantas adultas de *Copaifera reticulata*, nativas, dispersas e com mais de trinta anos de idade, localizadas no km 67 da Floresta Nacional do Tapajós, município de Belterra, Pará. O orifício aberto no tronco das árvores, após o completo escoamento do oleorresina, foi vedado com cano do tipo PVC, visando facilitar coletas posteriores. Um exemplar da espécie vegetal foi depositado no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental (Exsicata: 183939). As amostras de oleorresina foram armazenadas em recipientes plásticos em alíquotas de 2000 mL por árvore e protegidas da ação da luz com papel alumínio. Posteriormente, foram transferidas para frascos de vidro (20 mL) para a condução das análises cromatográficas.

Os componentes voláteis do oleorresina de *C. reticulata* foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em sistema Finnigan Mat INCOS XL, equipado com coluna capilar de sílica DB-5MS (30m x 0,25mm; espessura do filme: 0,25µm). As condições operacionais foram: gás carreador Hélio (32 cm/s); injeção splitless, (solução do produto a ser caracterizado a 0,2% em hexano); temperatura do injetor e do detector a 250°C; programa de temperatura: 60°C-240°C (3°C/min); energia de ionização de 70eV; temperatura da interface a 180°C. Os componentes do oleorresina foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com o banco de dados do sistema e com a literatura (Adams 2001). A quantificação dos componentes foi obtida através de equipamento de CG, HP5890-II, equipado com detector de ionização de chama (FIDIC), acoplado a um integrador HP 3396-II, nas mesmas condições operacionais descritas acima, exceto o gás de arraste que foi o hidrogênio.

Foram utilizados 26 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) provenientes de diferentes casos clínicos de otite canina tratados no hospital de clínicas veterinárias entre os anos de 1990 e 2011. As amostras foram semeadas em ágar sangue (Himedia Laboratories®) com 5% de sangue ovino desfibrinado e os cultivos foram incubados a 37°C por 24 horas. Os isolados foram fenotipicamente identificados de acordo com Quinn et al. (1994), o procedimento de identificação dos isolados foi realizado por meio da morfologia da colônia e das provas de Gram e catalase e posterior seleção dos isolados positivos na prova da coagulase (Coagu-plasma, Laborclin®).

Para a obtenção da concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, conforme descrito no protocolo M31-A3 (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*, 2008). A densidade do oleorresina de copaíba foi determinada em 1,05g/mL, este foi emulsificado em metanol p.a. (Nuclear®) (1:100), logo as concentrações testadas variaram de 10,5mg/mL (oleorresina de copaíba emulsificado em metanol) até 0,041mg/mL em uma diluição seriada (1:2) em caldo Mueller Hinton (Himedia® Laboratories). Para a comparação dos resultados com outras publicações as concentrações apresentadas anteriormente correspondem aos percentuais de 1% a 0,003% do oleorresina e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os inóculos foram preparados com as bactérias em suspensão salina na concentração de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e o tempo de contato entre o micro-organismo e as diferentes concentrações do oleorresina de copaíba foi de 24 horas de incubação à 37°C. Também foram realizados em caldo Mueller Hinton controles da

viabilidade do inóculo, do inóculo em metanol puro e da ausência de contaminação do oleorresina diluído em metanol. Após 24 horas de incubação uma alíquota 10µL do conteúdo de cada poço foi semeada em ágar Mueller Hinton para a estimativa da CBM. O valor da CIM foi definido como a menor concentração de oleorresina de copaíba que inibiu completamente o crescimento bacteriano após 24 horas de incubação. Para facilitar a leitura foram adicionados 20µL de solução do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Vetec®) a 1% em cada poço. Já o valor da CBM foi definido

Quadro 1. Susceptibilidade dos 26 isolados de *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP) frente às diferentes concentrações do oleorresina de copaíba, utilizando a técnica de microdiluição em caldo

Concentração do oleorresina de copaíba		Susceptibilidade dos isolados de SCP (n)	
%	mg/mL	CIM	CBM
0,004	0,041	7	0
0,007	0,082	17*	3
0,015	0,164	24**	7
0,031	0,328	25	19*
0,062	0,65	26	21
0,125	1,31	26	25**
0,25	2,62	26	26

CIM = concentração inibitória mínima, CBM= concentração bactericida mínima. *CIM50 e CBM50, **CIM90 e CBM90.

Quadro 2. Perfil de resistência frente aos antimicrobianos testados e o comportamento de inibição frente ao oleorresina das 26 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva

Ano	Isolado Número de registro	Oleorresina de copaíba		Perfil de resistência
		CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	
1990	83/90	0,041	0,328	S
1990	178/90	0,082	0,328	Pen
1990	201/90	0,041	0,328	Pen/Amp
1990	214/90	0,082	0,328	Tet
1990	261/90	0,328	0,125	S
1991	31/91	0,041	0,65	Pen/Cfe/Est/Tet
1991	66/91	0,082	0,164	S
1991	76/91	0,164	0,328	S
1991	81/91	0,082	0,328	S
1991	99/91	0,041	0,328	Pen/Tet
1991	138/91	0,041	0,082	Tet
1991	151/91	0,164	0,328	S
1992	107/92	0,164	0,65	S
1992	122/92	0,082	0,125	Tet/Clo
1992	126/92	0,164	0,328	Pen/Sut/Tet
1992	227/92	0,082	0,164	Pen/Amp/Est/Sut/Tet
1994	93/94	0,164	0,164	Clo
1994	94/94	0,082	0,164	Tet/Clo
1994	183/94	0,164	0,328	Pen/Tet
1994	197/94	0,328	2,62	Pen/Amp/Gen/Sut/Tet
1995	33/95	0,082	0,125	Clo
1995	93/95	0,041	0,082	Amp/Sut
1995	189/95	0,164	0,328	Pen/Amp/Tet
2008	107/08	0,082	0,328	Pen/Cfe/Est/Cip
2011	44/11	0,082	0,082	Amp/Est/Gen/Neo/Eri/Pol/Sut
2011	SPB 09/11	0,041	1,31	Pol
Cepa padrão	ATCC 25923	0,164	0,125	Est/Eri/Pol

S = Isolado sensível a todos os antimicrobianos testados, Amp+ Cla = ampicilina associada ao ácido clavulânico, Pen = penicilina, Amp = ampicilina, Cfe = cefalexina, Est = estreptomicina, Gen = gentamicina, Neo = neomicina, Enr = enrofloxacin, Cip = ciprofloxacina, Clo = cloranfenicol, Eri = eritromicina, Pol = polimixina B, Sut = sulfazotrim, Tet = tetraciclina.

como a menor concentração de copaíba em que não se evidenciou crescimento bacteriano após a semeadura.

Para efeito comparativo do grau de suscetibilidade das amostras de SCP, foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por meio do método de disco-difusão em ágar Mueller Hinton (Himedia Laboratories®) seguindo a técnica de Kirby-Bauer modificado (Bauer et al., 1966). Foram utilizados os seguintes antimicrobianos (Laborclin®) pertencentes às classes: (1) beta-lactâmicos - ampicilina associada ao ácido clavulânico (30µg), penicilina (10UI), ampicilina (10µg) e cefalexina (30µg), (2) aminoglicosídeos - estreptomicina (10µg), gentamicina (10µg) e neomicina (30µg), (3) fluoroquinolonas - enrofloxacin (05µg) e ciprofloxacina (05µg), (4) fenicóis- cloranfenicol (30µg), (5) macrolídeos - eritromicina (15µg), (6) polimixinas - polimixina B (300UI), (7) sulfamidas - sulfazotrim (25µg) e (8) tetraciclina (30µg). A leitura do método de difusão em disco foi realizada por meio da medição dos halos inibitórios de cada disco e comparação com os valores apresentados em uma tabela apropriada, conforme o fabricante dos discos (Laborclin®), determinando assim a sensibilidade ou resistência da bactéria aos antimicrobianos testados. A multirresistência foi calculada conforme Youn et al. (2011), os quais definiram a multirresistência aos antimicrobianos como a resistência a mais de três antimicrobianos de classes diferentes. Amostra de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade dos discos.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* demonstraram que houve ação inibitória do oleorresina de *Copaiba reticulata* sobre os 26 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva. O controle utilizando somente o metanol não inibiu o crescimento bacteriano.

Conforme os resultados encontrados na técnica de microdiluição em caldo, a atividade inibitória bacteriana de 50% dos isolados ocorreu a partir de 0,082mg/mL do oleorresina de copaíba, enquanto a CBM₅₀ ocorreu a partir da concentração de 0,328mg/mL (Quadro 1). A CIM com atividade em 90% dos isolados analisados ocorreu a partir da concentração de 0,164mg/mL, enquanto a CBM₉₀ ocorreu na concentração de 1,31mg/mL (Quadro 1).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos 26 isolados de SCP observado por meio do método de disco-difusão em ágar mostrou que 42% dos isolados foram resistentes à tetraciclina e 38,5% à penicilina, sendo que o cálculo da multirresistência aos antimicrobianos, realizado segundo Youn et al. (2011), apontou resistência a pelo menos um componente de três ou mais classes de antimicrobianos em 27% dos isolados testados (Quadro 2).

Por meio da CG/EM foi possível detectar 24 compostos voláteis no oleorresina de *C. reticulata*, os principais constituintes foram os sesquiterpenos β-cariofileno (37,6%), β-bisaboleno (14%) e (E)-α-bergamoteno (9,3%) (Quadro 3).

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste estudo com o oleorresina de copaíba ratificam a atividade antibacteriana encontrada em outros estudos realizados com oleorresina de copaíba. Mendonça & Onofre (2009), embora tenham utilizado a técnica de difusão em ágar, tida como menos precisa (Nascimento et al. 2007b), encontraram uma CIM de 3,12% do

Quadro 3. Ordem decrescente em porcentagem de compostos voláteis do oleorresina de *Copaifera reticulata*

Constituintes	%	Constituintes	%
β -cariofileno	37,6	β -chamigreno	0,9
β -bisaboleno	13,9	Ciclosativeno	0,9
(E)- α -bergamoteno	9,3	γ -curcumeno	0,6
α -humuleno + (E)- β -farneseno	5,3	γ -gurjuneno	0,6
β -selineno	4,9	α -copaeno	0,5
β -elemeno	3,3	α -gurjuneno	0,4
α -selineno	3,1	β -curcumeno	0,4
α -bulneseno	2,1	β -bisabolol	0,2
(Z)- α -bisaboleno	1,8	δ -elemeno	0,2
(E)- γ -bisaboleno	1,3	Óxido de cariofileno	0,2
β -sesquifelandreno	1,1	epi- β -bisabolol	0,1
Aromadendreno	0,9	epi- β -santaleno	0,1

oleorresina de *Copaifera multijuga* frente a cepa do gênero *Staphylococcus* (ATCC 25923). Santos et al. (2008) confirmam a atividade bactericida do oleorresina de *C. reticulata* frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *S. aureus* metilina resistente (MRSA) (ATCC 33591), utilizando a técnica de microdiluição em caldo, e apontam uma CIM e CBM de 62,5 μ g/mL. No presente trabalho, embora também tenha sido usada a técnica de microdiluição em caldo, a CIM e a CBM de oleorresina para 100% dos SCP testados foram respectivamente de 0,65 e 2,62mg/mL (Quadro 1), ou seja, foi necessária uma maior concentração do oleorresina para exercer atividade antimicrobiana. No entanto, autores como Hood et al. (2003) sustentam a impossibilidade da comparação direta entre pesquisas de atividade antimicrobiana de óleos essenciais devido à falta de padronização dos métodos.

Quanto ao perfil de susceptibilidade dos 26 isolados de SCP observado no método de disco-difusão, os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Prescott et al. (2002) que indicam uma resistência mais comum dos isolados de cães à penicilina, tetraciclina e eritromicina. No entanto uma porcentagem relativamente alta de isolados foi resistente a outros antimicrobianos, destacando a estreptomicina, o cloranfenicol e o sulfazotrim.

O cálculo da multirresistência aos antimicrobianos ressaltou que 27% dos isolados foram resistentes a pelo menos um componente de três ou mais classes de antimicrobianos conforme Youn et al. (2011). De acordo com Malik et al. (2005), este resultado é um alerta para a emergência de cepas multirresistentes em animais de companhia. Estes achados justificam a importância da pesquisa de novos fármacos com atividade antimicrobiana para uso na medicina veterinária. Não houve relação significativa entre multirresistência aos antimicrobianos e resistência ao oleorresina de copaíba (Quadro 2).

Os principais compostos voláteis constituintes do oleorresina de *C. reticulata* foram os sesquiterpenos que, segundo Gershenzon & Dudareva (2007), a grande classe dos terpenos, dentre outras funções, são comumente reconhecidos como metabólitos antimicrobianos. Compilações de estudos realizados especificamente com o gênero *Copaifera* citam o seu potencial anti-inflamatório e antimicrobiano (Veiga Junior & Pinto 2002, Ramos 2006, Santos et al. 2008). A atividade antimicrobiana do β -bisaboleno frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e a sinergia com β -lactâmicos

em cepas β -lactamase positivas foram demonstradas por Nascimento et al. (2007a). O β -cariofileno mostrou previamente atividade direta na inibição do crescimento de bactérias como descrito por Huang et al. (2012). Embora não existam relatos sobre a atividade do (E)- α -bergamoteno na sua forma isolada, a literatura apresenta evidências de que este composto também contribui para a atividade antibacteriana detectada. Diferentes óleos essenciais, contendo (E)- α -bergamoteno como um dos constituintes principais, apresentam atividade frente bactérias Gram-positivas, entre elas *Staphylococcus aureus* (Arif et al. 2008). Também merecem crédito outros constituintes deste oleorresina de copaíba presentes em menor quantidade, mas que também podem desempenhar função na atividade antibacteriana como é o caso do α -humuleno (Pichette et al. 2006).

De maneira geral, o efeito antimicrobiano de misturas terpênicas, a exemplo do oleorresina de copaíba, é atribuído a sua interação com componentes estruturais da célula bacteriana (Belletti et al. 2004) como a camada fosfolipídica da membrana celular, aumentando a permeabilidade e ligando-se a constituintes de vital importância para a bactéria (Singh et al. 2002). Segundo Sikkema et al. (1994) os terpenóides podem atravessar a membrana, inchando a célula bacteriana, interferindo com os gradientes de pH e com os potenciais de ação. Danos causados à membrana da célula bacteriana, bem como prejuízos causados à proliferação celular de *S. aureus* por terpenóides de óleos essenciais foram descritos por Togashi et al. (2008).

Além das atividades anti-inflamatórias, cicatrizantes e antimicrobianas, dentre outras, o oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) também pode ser considerado com potencial farmacológico por não demonstrar ação de toxicidade e neurotoxicidade em dose oral até 2000mg/kg, e apresenta uma relativa margem de segurança para a utilização como agente terapêutico conforme trabalho de Sachetti et al. (2009).

CONCLUSÕES

O oleorresina de copaíba (*Copaiba reticulata*) exerce atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus coagulase-positiva* multirresistentes isolados de otite canina externa.

A atividade antimicrobiana foi evidenciada nos resultados de CIM e CBM, com eficácia demonstrada em concentrações inferiores a 2,62mg/mL.

REFERÊNCIAS

- Adams R.P. 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois. 456p.
- Arif M.M. Raj S.M., Jirovetz L. & Shafi M.P. 2008. Composition and antimicrobial analysis of the essential oil of *Litsea laevigata* Nees. (Lauraceae). Nat. Prod. Commun. 3(7):1069-1072.
- Bauer A.W. Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
- Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R. & Gardini F. 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food Chem. 52(23):6932-6938.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): 2008, Performance Stan-

- dards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: approved standard. 3rd ed. M31-A3, Vol. 28, no. 8. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Gershenzon J. & Dudareva N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3(7):408-414.
- Frank L.A., Kania S.A., Hnilica K.A., Wilkes R.P. & Bemis D.A. 2003. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222(4):451-454.
- Hood J.R., Wilkinson J.M. & Cavanagh H.M.A. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *J. Essent. Oil Res.* 15:428-433.
- Huang M.M., Sanchez-Moreiras, A.M.A.M., Abel C.C., Sohrabi R.R. Lee S.S., Gershenzon J.J. & Tholl D.D. 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phyt.* 193(4):997-1008.
- Kiss G., Radványi S.Z. & Szigeti G. 1997. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. *J. Small Anim. Pract.* 38(2):51-56.
- Malik S., Peng H. & Barton M.D. 2005. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. *J. Appl. Microbiol.* 99(6):1283-1293.
- Mendonça D.E. & Onofre S.B. 2009. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba-*Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Revta Bras. Farmacogn.* 19(2):577-581.
- Morris D.O., Rook K.A., Shofer F.S. & Rankin S.C. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-2004). *ESVD* 17(5):332-337.
- Nascimento A.M.A., Brandão M.G.L., Oliveira G.B., Fortes I.C.P. & Chartone-Souza E. 2007a. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 92(1):95-100.
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C. & Silva G.L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31(2):247-256.
- Nascimento P.F.C., Nascimento A.C., Rodrigues C.S., Antonioli A.R., Santos P.O., Barbosa Júnior A.M. & Trindade R.C. 2007b. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revta Bras. Farmacogn.* 17(1):108-113.
- Oliveira L.C., Brilhante R.S.N., Cunha A.M.S. & Carvalho C.B.M. 2006. Profile of microorganisms isolated from dogs with associated media and external otitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6):1009-1017.
- Pichette A., Larouche P.L., Lebrun M. & Legault J. 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytother. Res.* 20:371-373.
- Pieri F.A., Mussi M.C. & Moreira M.A.S. 2009. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revta Bras. Plantas Medic.* 11(4):465-472.
- Prescott J.F., Hanna W.J.B., Richard R.S. & Drost K. 2002. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can. Vet. J.* 43(2):107-116.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Staphylococcus* species, p.1118-126. In: Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. (Eds), *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, London.
- Ramos M.F.S. 2006. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por *spray-drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 132p.
- Rigamonte-Azevedo O.C., Wadt P.G.S. & Wadt L.H.O. 2004. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Embrapa Acre, Rio Branco. 28p. Disponível em <<http://catuaba.cpfac.embrapa.br/pdf/doc91.pdf>>
- Rougier S., Borell D., Pheulpin S., Woehrlé F. & Boisramé B. 2005. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. *Vet. Dermatol.* 16(5):299-307.
- Sachetti C.G., Fascineli M.L., Sampaio J.A., Lameira O.A. & Caldas E.D. 2009. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Revta Bras. Farmacogn.* 19(4):937-941.
- Santos A.O., Ueda-Nakamura T., Dias B.P.F., Veiga V.F.J., Pinto A.C. & Nakamura C.V. 2008. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103(3):277-281.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. & Griffin C. 2001. Bacterial skin diseases, p.274-335. In: Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. & Griffin C. (Eds), *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. 6th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Singh N., Singh R.K. & Bhunia A.K. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *E. coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensm.-Wissensch. Technol.* 35:720-729.
- Sikkema J., Weber F.J., Heipieper H.J. & De Bont J.A.M. 1994. Cellular toxicity of lipophilic compounds: Mechanisms, implications, and adaptations. *Biocat. Biotransform.* 10(1/4):113-122.
- Togashi N., Inoue Y., Hamashima H. & Takano A. 2008. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 13:3069-3076.
- Veiga Junior V.F. & Pinto A.C.O. 2002. Gênero *Copaifera* L. *Quím. Nova* 25(2):273-286.
- Veiga Junior V.F., Rosas E.C., Carvalho M.V., Henriques M.G.M.O. & Pinto A.C. 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 112(2):248-254.
- Werckenthin C., Cardoso M., Martel J.L. & Schwarz S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *S. aureus*, porcine *S. hyicus*, and canine *S. intermedius*. *Vet. Res.* 32(3/4):341-346.
- Youn J., Yoon J.W., Koo H.C., Lim S.K. & Park Y.H. 2011. Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:268-274.