

**ISOLAMENTO DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO DE
OUVIDO MÉDIO DE CÃES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE MELALEUCA E CANELA**

Ayslla Maria Freitas Pereira¹
Amanda de Oliveira Gonçalves²
Jaquellyne Garcia Rodrigues Tomé³
Udson Rangel Ribeiro⁴
Gustavo Lucas Costa Valente⁵

RESUMO

A otite canina, frequentemente associada a infecções por *Staphylococcus* spp., representa um desafio terapêutico devido ao aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais. Diante disso, os óleos essenciais têm se destacado como alternativas promissoras por sua atividade antimicrobiana. Este estudo teve como objetivos isolar e caracterizar *Staphylococcus* coagulase-positivo a partir de amostras do pavilhão auricular de cães e avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de melaleuca e canela contra os isolados. Foram coletadas amostras por *swab* de cães com otite, as quais foram plaqueadas em ágar Baird-Parker. As colônias suspeitas foram submetidas a coloração de Gram e testes bioquímicos (catalase e coagulase) para confirmação das cepas. A atividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada em concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4% (v/v), utilizando o método de difusão em ágar. Os resultados demonstraram que ambos os óleos apresentaram efeito antimicrobiano dose-dependente, com o óleo de canela exibindo maior eficácia em comparação à melaleuca. Em particular, a concentração de 3% do óleo de canela mostrou atividade equivalente à teicoplanina (controle positivo). Esses achados reforçam o potencial terapêutico desses óleos essenciais no manejo de otites caninas, embora estudos adicionais sejam necessários para avaliar sua eficácia e segurança *in vivo*.

Palavras-chave: otite, resistência bacteriana, tratamento alternativo

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Professor Edson Antônio Velano – Unifenas, Rodovia MG-179, Loteamento Trevo, 37132440 - Alfenas, MG, Brasil; ayslla.pereira@aluno.unifenas.br.

² Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Professor Edson Antônio Velano – Unifenas, Rodovia MG-179, Loteamento Trevo, 37132440 - Alfenas, MG, Brasil; amanda.ogoncalves@aluno.unifenas.br.

³ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Professor Edson Antônio Velano – Unifenas, Rodovia MG-179, Loteamento Trevo, 37132440 - Alfenas, MG, Brasil; jaquellyne.tome@aluno.unifenas.br.

⁴ Mestrando em Ciência Animal, Universidade Professor Edson Antônio Velano – Unifenas, Rodovia MG-179, Loteamento Trevo, 37132440 - Alfenas, MG, Brasil; udsonrangel70@gmail.com.

⁵ Doutor em Ciência Animal, Universidade Professor Edson Antônio Velano – Unifenas, Rodovia MG-179, Loteamento Trevo, 37132440 - Alfenas, MG, Brasil; gustlcv.vet@gmail.com.

ABSTRACT

Canine otitis, frequently associated with infections caused by *Staphylococcus* spp., represents a therapeutic challenge due to increasing bacterial resistance to conventional antimicrobials. In this context, essential oils have emerged as promising alternatives because of their antimicrobial activity. This study aimed to isolate and characterize coagulase-positive *Staphylococcus* from samples collected from the auricular pavilion of dogs and to evaluate the in vitro antimicrobial activity of tea tree and cinnamon essential oils against the isolates. Samples were collected using swabs from dogs with otitis and plated on Baird-Parker agar. Suspected colonies were subjected to Gram staining and biochemical tests (catalase and coagulase) to confirm the strains. The antimicrobial activity of the oils was assessed at concentrations of 0.5%, 1%, 2%, 3%, and 4% (v/v), using the agar diffusion method. The results demonstrated that both oils exhibited dose-dependent antimicrobial effects, with cinnamon oil showing greater efficacy compared to tea tree oil. Notably, the 3% concentration of cinnamon oil showed activity equivalent to teicoplanin (positive control). These findings support the therapeutic potential of these essential oils in the management of canine otitis, although further studies are needed to evaluate their efficacy and safety in vivo.

Keywords: Alternative treatment; Bacterial resistance; Otitis.

INTRODUÇÃO

A otite constitui uma das afecções dermatológicas mais prevalentes na clínica de pequenos animais, caracterizando-se por processos inflamatórios que acometem o conduto auditivo, podendo estender-se desde a orelha externa até o ouvido médio em cães (*Canis lupus familiaris*). Dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 20% da população canina atendida em unidades veterinárias apresenta manifestações clínicas de otite, condição patológica associada a desconforto, dor, prurido intenso e, em casos de evolução crônica, déficits auditivos irreversíveis (Ponn, Tipold, Volk, 2024).

Sua etiologia é reconhecidamente multifatorial, envolvendo fatores predisponentes anatômicos, ambientais (como elevada umidade e presença de corpos estranhos) e, sobretudo, agentes microbianos oportunistas. Dentre os microrganismos mais frequentemente isolados em casos de otite canina, destacam-se bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e

Proteus, além de leveduras do gênero *Malassezia*, particularmente *M. pachydermatis* (Martins et al., 2022).

Staphylococcus spp., com ênfase em *S. pseudintermedius* e *S. aureus*, emergem como patógenos oportunistas de relevância clínica em processos otíticos, tratando-se de micro-organismos comensais da microbiota cutânea e mucosa que, em condições de desequilíbrio homeostático, podem exibir comportamento patogênico invasivo. Esses agentes podem apresentar fatores de virulência, incluindo produção de enzimas (como a coagulase), exotoxinas e capacidade de formação de biofilmes, aliados a um perfil crescente de resistência antimicrobiana, fatores que dificultam significativamente a abordagem terapêutica (Chehida et al., 2024).

O emprego indiscriminado de antimicrobianos convencionais em regimes terapêuticos empíricos tem favorecido a seleção de cepas multirresistentes, resultando em redução da eficácia terapêutica e aumento na prevalência de recidivas infecciosas (Chehida et al., 2024). Neste contexto, fitoterápicos, particularmente óleos essenciais com propriedades antimicrobianas, vêm sendo investigados como alternativas terapêuticas promissoras. Estudos fitoquímicos demonstram que compostos bioativos presentes em *Melaleuca alternifolia* (*tea tree*) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) exibem atividade bacteriostática e bactericida frente a cepas bacterianas, incluindo linhagens resistentes a antimicrobianos convencionais, apresentando-se como potenciais adjuvantes no manejo de infecções otológicas (Lee et al., 2022; Iseppi, Condò & Messi, 2023).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos isolar e caracterizar bactérias do gênero *Staphylococcus* a partir de amostras de pavilhão auricular de cães e avaliar a atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de melaleuca e canela contra as amostras obtidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O presente estudo seguiu um delineamento experimental de natureza descritiva e exploratória, sem aplicação de tratamentos controlados ou aleatorização. As bactérias do gênero *Staphylococcus* utilizadas nos ensaios foram isoladas a partir de seis cães (identificados de 1 a 6) sem raça definida provenientes do canil do Hospital Veterinário da Universidade Professor

Edson Antônio Velano - UNIFENAS, selecionados intencionalmente por apresentarem histórico clínico de otites e/ou dermatopatias.

As unidades experimentais consistiram nas cepas bacterianas selecionadas, que foram posteriormente submetidas à análise microbiológica e à avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*. Para essa etapa, foi adotado um delineamento fatorial, considerando cinco concentrações distintas (0,5%, 1%, 2%, 3% e 4% v/v) e dois tipos de óleos essenciais (melaleuca e canela), com análise estatística dos halos de inibição gerados.

Coleta de amostras e plaqueamento

Para a coleta das amostras, um *swab* estéril foi embebido em solução salina estéril (0,85% m/v cloreto de sódio e 0,1% m/m de peptona bacteriológica) e friccionado na parte interna do pavilhão auricular dos cães. O experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFENAS, sob o parecer nº 08A-2024.

Em seguida, o *swab* foi inserido no tubo contendo a solução salina e imediatamente transportado ao Laboratório de Microbiologia da UNIFENAS, onde foi realizado o plaqueamento pelo método de espalhamento superficial (*spread plate*) em placas contendo ágar Baird-Parker (Kasvi, Pinhais, Brasil) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C ±1 °C por 48 horas, sob condições de aerobiose (Lancette e Tatini, 2001).

Avaliação fenotípicas das amostras microbianas

Após a incubação das placas, foram selecionadas colônias típicas de *Staphylococcus* spp., caracterizadas por coloração preta e presença de dois halos (um opaco e outro claro), com diferentes morfotipos (variações de tamanho e forma), para a realização dos testes fenotípicos, seguindo metodologias descritas por Moraes, Cordeiro e Andrade Júnior (2021). As colônias suspeitas de cada placa foram nomeadas com letras em sequência alfabética (A, B, C, etc.).

A confirmação preliminar do gênero foi feita por coloração de Gram. Para isso, uma alíquota da colônia foi transferida para uma lâmina, fixada por secagem e submetida aos seguintes passos: cristal violeta (Newprov, Pinhais, Brasil) por 1 minuto, solução de Lugol 1% (Newprov, Pinhais, Brasil) por 1 minuto, álcool etílico descorante (Newprov, Pinhais, Brasil)

por 10 segundos e fucsina fenicada (Newprov, Pinhais, Brasil) por 30 segundos. A lâmina foi então lavada, seca e observada em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), para verificação da presença de cocos Gram-positivo em agrupamentos.

Em seguida, foi realizado o teste da catalase sobre as colônias confirmadas pela avaliação microscópica, para diferenciar *Staphylococcus* spp. de possíveis *Streptococcus* spp.. Para isso, volumes iguais do caldo *brain heart infusion* (BHI) (Kasvi, Pinhais, Brasil) contendo a amostra bacteriana e de peróxido de hidrogênio PA (Cromoline, Diadema, Brasil) foram misturados. A produção instantânea de bolhas indicou a degradação do peróxido pela enzima catalase, confirmando a positividade do teste.

As amostras catalase-positivas foram então submetidas ao teste de coagulase. Para isso, foram misturados 300 µL do caldo BHI com a bactéria e 300 µL de plasma de coelho (Newprov, Pinhais, Brasil) reconstituído em solução salina (0,85% cloreto de sódio m/v), em tubos estéreis. A mistura foi incubada a 37 °C sob aerobiose, com leituras realizadas após 6 e 24 horas para verificação da formação de coágulo.

As amostras positivas no teste de coagulase foram selecionadas para o ensaio de susceptibilidade aos óleos essenciais.

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais

O ensaio de inibição foi realizado pelo método de antibiograma em poços, conforme descrito por Balouiri, Sadiki & Ibensouda (2016). As bactérias previamente identificadas foram cultivadas em ágar BHI (Kasvi, Pinhais, Brasil) por 48 horas, sob aerobiose, a 37 °C. Em seguida, as colônias foram coletadas e ressuspensas em solução salina (0,85% m/v cloreto de sódio) até atingirem a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (Probac do Brasil, Piracicaba, Brasil), o que corresponde a uma concentração estimada de 1×10^8 UFC/mL.

Cada suspensão bacteriana foi então semeada por espalhamento na superfície de três placas de Petri estéreis (140 × 15 mm) contendo ágar Mueller Hinton (Neogen, Lansing, Michigan). Após secagem da superfície, foram perfurados 11 poços equidistantes nas placas, com capacidade para 50 µL cada. Neles foram aplicadas emulsões dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) (Alkymia di Grandha, Taboão da Serra, Brasil) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) (Musgo, Alfenas, Brasil), nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4% (v/v), previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema,

Brasil). Um dos poços recebeu apenas DMSO puro, utilizado como controle negativo, com o objetivo de verificar se o diluente apresentava atividade antimicrobiana.

Adicionalmente, um disco de teicoplanina (30 µg) (Sensifar, São Paulo, Brasil) foi aplicado em ponto equidistante dos poços, como controle positivo, por se tratar de um antimicrobiano com baixa frequência de resistência por parte de *Staphylococcus* spp., segundo dados da literatura científica (Chehida et al., 2024).

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas, sob aerobiose. Após esse período, os halos de inibição foram mensurados com auxílio de paquímetro, em milímetros.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da identificação fenotípica (colônias, Gram, catalase e coagulase) foram analisados de forma descritiva, por se tratarem de testes qualitativos voltados à triagem e caracterização das colônias bacterianas isoladas.

Os dados referentes aos halos de inibição foram submetidos inicialmente ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição. Em seguida, foi aplicado o teste não paramétrico de Friedman, com o objetivo de avaliar diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados e entre as cepas bacterianas testadas. Quando identificadas diferenças significativas, utilizou-se o pós-teste de Conover com ajuste de valor de p pelo teste de Holm, para comparações múltiplas entre os grupos.

Adicionalmente, a relação dose-resposta foi avaliada mediante o coeficiente de correlação de Spearman, para quantificar a associação monotônica entre as concentrações dos óleos essenciais e os diâmetros dos halos de inibição. A magnitude dos coeficientes de correlação (rho) foi classificada segundo Dancey & Reidy (2020) como: fraca (0,10-0,29); moderada (0,30-0,49); e forte (0,50-1,00).

As análises foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel 2019 e JASP (versão 0.19.3.0), adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme exposto na tabela 1, o uso do ágar Baird-Parker demonstrou-se eficaz para o isolamento seletivo de colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp., uma vez que, das 16 colônias inicialmente consideradas suspeitas com base na morfologia (coloração preta com dupla halo), 13 (81,2%) foram confirmadas como cocos Gram-positivo em agrupamentos e catalase-positivo, características típicas do gênero.

Tabela 1 – Identificação fenotípica de colônias suspeitas de *Staphylococcus* spp. isoladas do pavilhão auricular de cães.

Cães	Colônias	Gram	Catalase	Coagulase
01	A	Cocos		
		Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	-
		Cocos		
01	B	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Positivo
		Bastonetes		
02	C	Gram-positivo	-	-
		Sem crescimento	-	-
03	A	Cocos		
		Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
	B	Cocos		
		Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
03	C	Cocos		
		Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
03	D	Bastonetes		
		Gram-positivo	-	-
04	A	Cocos		
		Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Positivo

		Cocos		
	B	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
		Cocos		
		Cocos		
	C	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Positivo
		Cocos		
		Cocos		
	D	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
05		Cocos		
	A	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
		Cocos		
		Cocos		
	B	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
		Cocos		
	A	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Negativo
		Cocos		
06		Cocos		
	B	Gram-positivo em agrupamentos	Positivo	Positivo
		Bastonetes		
		C		
		Gram-positivo	-	-

A presença de *Staphylococcus* spp. no conduto auditivo de cães é um achado esperado, uma vez que este gênero bacteriano constitui um componente natural da microbiota desta região anatômica, mesmo em animais clinicamente saudáveis. Este fato foi corroborado por Kasai et al. (2021) em estudo que avaliou a composição microbiana por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA. Os autores demonstraram que *Staphylococcus* spp. pode representar até 43,3% da microbiota auricular em cães com otite externa, enquanto em indivíduos saudáveis esta proporção foi de 14,7%, evidenciando um desequilíbrio microbiano característico nos casos de otopatia.

A presença de colônias com morfologia atípica (bastonentes Gram-positivo) nas amostras 01-C, 03-D e 06-C podem ser atribuídas à diversidade natural da microbiota auricular canina, que pode incluir outros micro-organismos comensais ou oportunistas. O estudo de Kasai et al. (2021) identificou o bastonete Gram-positivo *Corynebacterium* como um dos gêneros mais abundantes tanto em cães saudáveis quanto naqueles com otite, sugerindo um possível papel na manutenção da homeostase microbiana. Embora o ágar Baird-Parker favoreça o crescimento de *Staphylococcus* spp., ele não apresenta seletividade absoluta, podendo permitir o desenvolvimento de outras bactérias. Nesse contexto, Woudstra et al. (2023) relataram a identificação de colônias isoladas nesse meio como pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, por meio de espectrometria de massas MALDI-TOF, evidenciando a necessidade de testes fenotípicos complementares para a correta identificação microbiana.

Na placa correspondente à amostra do cão 02, a ausência de crescimento bacteriano pode indicar a presença de microrganismos com baixa capacidade de multiplicação no meio de cultura utilizado. Um exemplo é *Malassezia pachydermatis*, levedura comumente encontrada no conduto auditivo de cães, mas cujo crescimento *in vitro* requer suplementação lipídica específica (Berlanda et al., 2022). Além disso, conforme descrito na própria ficha técnica do ágar Baird-Parker (Merck, 2025), esse meio inibe totalmente ou dificulta o crescimento de bactérias Gram-negativas. Dessa forma, microbiotas auriculares com predomínio de bastonetes Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp., podem não ser recuperadas, o que limita a detecção de parte dos micro-organismos presentes na amostra.

Apesar da frequente presença de *Staphylococcus* spp. no pavilhão auricular dos cães, apenas 4 (25%) das cepas apresentaram resultado positivo para o teste de coagulase (01-B, 04-A, 04-C e 06-B), enzima cuja presença está associada ao maior potencial patogênico (Palomino-Farfán et al., 2021). Embora o gênero *Staphylococcus* compreenda mais de 40 espécies, apenas um número restrito tem a capacidade de produzir a enzima coagulase, como *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (Becker et al., 2020). A maioria das espécies é naturalmente coagulase-negativa, o que justifica a baixa frequência de cepas positivas observadas em diversos estudos microbiológicos, incluindo o presente trabalho.

A presença da enzima coagulase está relacionada à capacidade de conversão do fibrinogênio em fibrina, favorecendo a evasão de mecanismos imunes e formação de abscessos, o que a torna um importante fator de virulência. No entanto, embora sua produção seja classicamente associada à patogenicidade, estudos recentes indicam que a coagulase não deve ser considerada isoladamente como marcador de virulência, uma vez que cepas coagulase-

negativas também podem estar envolvidas em processos infecciosos, especialmente quando associadas à formação de biofilme ou à presença de resistência antimicrobiana (Horsman et al., 2025). Apesar dessas controvérsias, a positividade para coagulase ainda é amplamente utilizada como critério indicativo de maior potencial patogênico (Miszczak et al., 2025).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a relevância da triagem fenotípica para a seleção criteriosa de colônias destinadas a análises subsequentes, assegurando a confiabilidade dos dados microbiológicos e farmacológicos gerados. Nesse contexto, as amostras 01-B, 04-A, 04-C e 06-B, fenotipicamente identificadas como *Staphylococcus* coagulase-positivo foram selecionadas para os ensaios de atividade antimicrobiana in vitro com óleos essenciais, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Mediana dos halos de inibição (mm) das cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo submetidas a tratamentos com óleos melaleuca e canela

Tratamento	Cepas			
	01-B	04-A	04-C	06-B
OM (0,5%)	0 ^{Aa}	6 ^{Aa}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ab}
OM (1,0%)	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ab}
OM (2,0%)	0 ^{Aa}	8 ^{Aa}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ab}
OM (3,0%)	0 ^{Aa}	14 ^{Bb}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ac}
OM (4,0%)	6 ^{Aa}	>60 ^{Cb}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ab}
OC (0,5%)	0 ^{Aa}	>60 ^{Cb}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ab}
OC (1,0%)	0 ^{Aa}	>60 ^{Cb}	0 ^{Aa}	>60 ^{Ac}
OC (2,0%)	20 ^{Ba}	>60 ^{Cb}	22 ^{Ba}	>60 ^{Ab}
OC (3,0%)	32 ^{Ba}	>60 ^{Cb}	36 ^{Ca}	>60 ^{Ab}
OC (4,0%)	34 ^{Ba}	>60 ^{Cb}	40 ^{Ca}	>60 ^{Ab}
TEI (30 µg)	25 ^{Ba}	31 ^{Ba}	26 ^{Ca}	>60 ^{Ab}
DMSO (100%)	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Aa}	0 ^{Ba}

OM: óleo de melaleuca; OC: óleo de canela; DMSO: dimetilsulfóxido; TEI: teicoplanina

Medianas seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo pós-teste de Conover com ajuste de valor de p pelo método de Holm ($p < 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos na mesma coluna (cepa); minúsculas comparam cepas na mesma linha (tratamento)

Em alguns casos, observou-se que os halos de inibição ultrapassaram a distância máxima mensurável entre os tratamentos na placa, devido à sua extensão e à proximidade entre os poços ou discos. Considerando que os tratamentos foram distribuídos de forma equidistante, com espaçamento médio de 30 mm entre os centros dos poços, o diâmetro máximo possível de mensuração individual foi de aproximadamente 60 mm. Quando os halos ultrapassaram esse limite e houve sobreposição entre zonas de inibição, impossibilitando a determinação precisa de suas bordas, os resultados foram expressos como “>60 mm”, indicando que o efeito inibitório excedeu a área mensurável no ensaio. Essa abordagem foi adotada para garantir a padronização da leitura e a integridade dos dados interpretativos.

O teste de Shapiro-Wilk indicou um desvio significativo da normalidade ($p < 0,001$), motivo pelo qual os dados foram tratados de forma não paramétrica. Subsequentemente, o teste de Friedman indicou a existência de diferenças significativas ($p < 0,001$) nas comparações pareadas entre os halos de inibição, considerando as diferentes cepas e tratamentos. Em seguida, a aplicação do pós-teste de Conover evidenciou diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$), as quais foram discriminadas na tabela por meio de letras distintas, sendo letras maiúsculas utilizadas para indicar diferenças entre os tratamentos (colunas) e letras minúsculas para indicar diferenças entre as cepas (linhas).

A análise dos resultados demonstrou que o DMSO, utilizado como diluente dos óleos essenciais, não exerceu qualquer efeito inibitório sobre as cepas testadas, uma vez que não foram observados halos de inibição em nenhuma das amostras. Embora esse resultado fosse esperado, a inclusão do controle negativo é essencial para assegurar que o diluente não interfira na atividade antimicrobiana observada, garantindo que os efeitos inibitórios sejam exclusivamente atribuídos aos princípios ativos dos óleos testados (Lalouckova et al., 2021).

A análise das letras minúsculas indicadas na Tabela 2 evidencia que diferentes cepas apresentaram perfis distintos de sensibilidade aos tratamentos. As cepas 01-B e 04-C demonstraram comportamentos semelhantes entre si ($p > 0,05$), sendo classificadas como mais resistentes, uma vez que todas as emulsões oleosas testadas resultaram em halos de inibição significativamente menores ($p < 0,05$). Em contraste, a cepa 06-B destacou-se por sua elevada

sensibilidade, apresentando halos significativamente maiores ($p < 0,05$) em todos os tratamentos com óleos essenciais, quando comparada às demais. No estudo conduzido por Meléndez-Carmona et al. (2022), foi demonstrado que diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram respostas heterogêneas à exposição *in vitro* à levofloxacino e rifampicina. Em consonância com esse achado, Lord et al. (2022) avaliaram mais de 7.800 cepas de diferentes espécies do gênero *Staphylococcus* e observaram diferenças significativas entre os perfis fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos, como cloranfenicol e oxacilina. Esses achados corroboram os resultados observados no presente trabalho, nos quais as cepas testadas exibiram respostas distintas frente ao mesmo antimicrobiano convencional, a teicoplanina.

Quando analisadas as diferenças entre os tratamentos, observou-se que as cepas de *Staphylococcus* foram mais sensíveis ao óleo essencial de canela do que ao de melaleuca, com exceção da cepa 06-B, que apresentou elevada sensibilidade a todas as emulsões testadas. Essa tendência é evidenciada pelas letras maiúsculas distintas dentro de cada coluna da Tabela 2, indicativas de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os óleos, conforme determinado pelo teste pós-hoc. Esses achados sugerem que o óleo de canela possui maior potencial antimicrobiano frente às cepas testadas, sendo uma alternativa promissora no controle de *Staphylococcus* spp. resistentes. A atividade antimicrobiana do óleo de canela é atribuída principalmente ao cinamaldeído. Este composto fenólico exerce um efeito membranotóxico e inibição da síntese proteica ribossômica. Além disso, estudos moleculares demonstram que o cinamaldeído é capaz de suprimir a expressão de genes associados à formação de biofilmes em *Staphylococcus* spp. (Didehdar et al., 2022). Em contraste, o óleo essencial de melaleuca, cujo principal componente ativo é o terpinen-4-ol, atua por meio de mecanismos distintos, incluindo a desnaturação de proteínas estruturais, inibição da respiração celular e interferência na homeostase iônica bacteriana. No entanto, a eficácia antimicrobiana desse óleo pode variar de acordo com sua origem botânica e concentração, o que pode justificar a ausência de efeitos pronunciados como os observados com o óleo de canela (Badr et al, 2023).

Os resultados demonstraram uma relação dose-resposta significativa ($p < 0,05$) na atividade antimicrobiana de ambos os óleos essenciais testados. Para o óleo de canela, observou-se que o aumento da concentração resultou em halos de inibição progressivamente maiores contra as cepas 01-B e 04-C. A análise de correlação de Spearman confirmou esse padrão, revelando uma associação monotônica estatisticamente significativa ($p = 0,008$), embora de magnitude moderada ($\rho = 0,34$), sugerindo uma dependência consistente, porém não linear,

entre concentração e efeito antimicrobiano. No caso do óleo de melaleuca, também foi identificado um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro dos halos de inibição em função da concentração frente à cepa 04-A. Contudo, a correlação de Spearman indicou uma associação positiva fraca ($\rho = 0,183$) e estatisticamente não significativa ($p = 0,162$), sugerindo que o padrão de resposta foi menos uniforme entre as cepas. Os achados corroboram dados da literatura científica, que indicam Concentração Inibitória Mínima (CIM) na faixa de 0,25-1% (v/v) do óleo de canela contra *S. aureus*, enquanto o óleo de melaleuca requer concentrações de 0,1-0,2% (v/v) em testes de diluição em caldo e até 1-2,5% em ensaios com discos de difusão (Falci et al., 2015; Altun, & Yapiic, 2022).

A análise comparativa revelou que o óleo de canela a 3% (v/v) apresentou efeito antimicrobiano estatisticamente equivalente ($p > 0,05$) ao da teicoplanina. Tal achado é particularmente relevante, pois indica que, em concentrações adequadas, compostos naturais podem alcançar eficácia comparável à de antimicrobianos convencionais (Chehida et al., 2024). No caso do óleo de melaleuca, observou-se um perfil mais heterogêneo: enquanto para a cepa 06-B todas as concentrações testadas apresentaram atividade equivalente à teicoplanina, para a cepa 04-A esse efeito só foi alcançado a partir de 3%. Essa variação pode estar relacionada a diferenças intrínsecas na sensibilidade das cepas aos componentes do óleo (Badr et al, 2023). Os achados se alinham com evidências na literatura que demonstram a capacidade de óleos essenciais de canela e melaleuca em superar ou igualar a eficácia de antimicrobianos convencionais, como vancomicina, ampicilina e cloranfenicol (El Atki et al., 2019; Tosun Taylan & Demirel Zorba, 2022).

Os resultados do presente estudo destacam o óleo de canela como um agente antimicrobiano promissor no tratamento de otites caninas, demonstrando eficácia comparável à teicoplanina contra cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo. No entanto, embora os achados *in vitro* sejam encorajadores, sua aplicação clínica requer investigações adicionais para garantir eficácia e segurança na sua praticidade.

CONCLUSÃO

O estudo isolou e caracterizou bactérias do gênero *Staphylococcus* a partir de amostras de pavilhão auricular canino, identificando cepas clinicamente relevantes. Os óleos essenciais de canela e melaleuca demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* contra os isolados, com o óleo de canela apresentando particular eficácia em concentrações específicas. Esses achados

evidenciam o potencial antimicrobiano desses compostos naturais contra agentes causadores de otite canina.

REFERÊNCIAS

Altun, M., & Yapici, B. M. (2022). Determination of chemical compositions and antibacterial effects of selected essential oils against human pathogenic strains. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(1), e20210074.

Badr, M. M., Taktak, N. E., & Badawy, M. E. (2023). Comparison of the antimicrobial and antioxidant activities of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its main component terpinen-4-ol with their nanoemulsions. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(2), 111-120.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

Becker, K., Both, A., Weißelberg, S., Heilmann, C., & Rohde, H. (2020). Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 18(4), 349-366.

Berlanda, M., Valente, C., Guglielmini, C., Danesi, P., Contiero, B., & Poser, H. (2022). *Malassezia* overgrowth in dogs in northern Italy: frequency, body distribution, clinical signs and effects of pharmacologic treatments. *Veterinaria italiana*, 58(1), 103-109.

Chehida, F. B., Tombari, W., Gharsa, H., Rabia, Y., Ferhi, S., Jrad, M., & Messadi, L. (2024). New Insights into Molecular Characterization, Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of Methicillin-Sensitive Coagulase-Positive *Staphylococcus* spp. from Dogs with Pyoderma and Otitis Externa. *Microbiology Research*, 15(3), 1208.

DANCEY, Christine; REIDY, John. *Estatística Sem Matemática para Psicologia-7*. Penso Editora, 2018.

Didehdar, M., Chegini, Z., Tabaeian, S. P., Razavi, S., & Shariati, A. (2022). Cinnamomum: The new therapeutic agents for inhibition of bacterial and fungal biofilm-associated infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 930624.

El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., ... & Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic

potential with antibiotics. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 10(2), 63-67.

Falci, S. P. P., Teixeira, M. A., Chagas, P. F. D., Martinez, B. B., Loyola, A. B. A. T., Ferreira, L. M., & Veiga, D. F. (2015). Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta cirurgica brasileira*, 30(6), 401-406.

Horsman, S., Zaugg, J., Meler, E., Mikkelsen, D., Soares Magalhães, R. J., & Gibson, J. S. (2025). Molecular Epidemiological Characteristics of *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus coagulans*, and Coagulase-Negative *Staphylococci* Cultured from Clinical Canine Skin and Ear Samples in Queensland. *Antibiotics*, 14(1), 80.

Iseppi, R., Condò, C., & Messi, P. (2023). Synergistic inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils in association with oxacillin. *Antibiotics*, 12(5), 846.

Kasai, T., Fukui, Y., Aoki, K., Ishii, Y., & Tateda, K. (2021). Changes in the ear canal microbiota of dogs with otitis externa. *Journal of applied microbiology*, 130(4), 1084-1091.

Lee, D. U., Park, Y. J., Kang, C. E., Cui, C. H., Lee, D. H., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2022). Synergistic antimicrobial activity of ϵ -polylysine, chestnut extract, and cinnamon extract against *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Biotechnology*, 31(5), 607-615.

Lalouckova, K., Mala, L., Marsik, P., & Skrivanova, E. (2021). In vitro antibacterial effect of the methanolic extract of the Korean soybean fermented product doenjang against *Staphylococcus aureus*. *Animals*, 11(8), 2319.

Lancette, G.A.; Tatini, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: Downes, F.P.; Ito, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. p.387-400.

Lord, J., Millis, N., Jones, R. D., Johnson, B., Kania, S. A., & Odoi, A. (2022). Patterns of antimicrobial, multidrug and methicillin resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from canine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Tennessee, USA: A descriptive study. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 91.

Martins, E., Maboni, G., Battisti, R., da Costa, L., Selva, H. L., Levitzki, E. D., & Gressler, L. T. (2022). High rates of multidrug resistance in bacteria associated with small

animal otitis: A study of cumulative microbiological culture and antimicrobial susceptibility. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105399.

Meléndez-Carmona, M. Á., Mancheño-Losa, M., Ruiz-Sorribas, A., Muñoz-Gallego, I., Viedma, E., Chaves, F., ... & Lora-Tamayo, J. (2022). Strain-to-strain variability among *Staphylococcus aureus* causing prosthetic joint infection drives heterogeneity in response to levofloxacin and rifampicin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(12), 3265-3269.

Miszcza, M., Korzeniowska-Kowal, A., Wzorek, A., Prorok, P., Szenborn, L., Rypuła, K., & Bierowiec, K. (2025). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from humans and pets—a comparison of drug resistance and risk factors associated with colonisation. *Journal of Veterinary Research*, 69(2), 199-211.

MORAES, Gustavo F. Q.; CORDEIRO, Laísa Vilar; ANDRADE JÚNIOR, Francisco Patricio. Main laboratory methods used for the isolation and identification of *Staphylococcus* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, v. 50, n. 1, p. 5-28, 2021.

Palomino-Farfán, J. A., Vega, L. G. A., Espinoza, S. Y. C., Magallanes, S. G., & Moreno, J. J. S. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* associated with otitis externa and pyoderma in dogs. *Open veterinary journal*, 11(3), 364-369.

PONN, Peter Christian; TIPOLD, Andrea; VOLK, Andrea Vanessa. Can We Minimize the Risk of Dogs Developing Canine Otitis Externa?—A Retrospective Study on 321 Dogs. *Animals*, v. 14, n. 17, p. 2537, 2024.

Tosun, M. N., Taylan, G., & Demirel Zorba, N. N. (2022). Antibacterial and antibiofilm activities of some plant essential oils and synergistic effects of cinnamon essential oil with vancomycin against *Clostridioides difficile*: in vitro study. *Letters in Applied Microbiology*, 75(3), 598-606.