

LIZANDRA DAS NEVES QUARESMA

**SUSCETIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE DERMOPATIAS CANINAS A
EXTRATOS FOLIARES DE *Eugenia astringens* (CAMBESS) E FORMULAÇÕES
TÓPICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon

Coorientadores: João Paulo Viana Leite
Ciro César Rossi

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Q1s
2023

Quaresma, Lizandra das Neves, 1996-
Suscetibilidade de bactérias isoladas de dermatopatias
caninasa extratos foliares de *Eugenia astringens* (Cambess) e
formulações tópicas / Lizandra das Neves Quaresma. –Viçosa,
MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (53 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.

Dissertação(mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.407>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças - Tratamento. 2. Pele - Doenças -
Tratamento. 3. Fitoterapia. I. Ribon, Andréa de Oliveira Barros,
1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 636.7089692


LIZANDRA DAS NEVES QUARESMA

**SUSCETIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE DERMOPATIAS CANINAS A
EXTRATOS FOLIARES DE *Eugenia astringens* (CAMBESS) E FORMULAÇÕES
TÓPICAS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LIZANDRA DAS NEVES QUARESMA
Data: 10/07/2023 14:06:12-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Lizandra das Neves Quaresma
Autora

Documento assinado digitalmente
 ANDREA DE OLIVEIRA BARROS RIBON
Data: 17/07/2023 11:50:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Andrea de Oliveira Barros Ribon
Orientadora

*A Deus, meus pais, irmãos, sobrinho, namorado e
todos que se fizeram e se fazem presentes na
minha trajetória, com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, sobre todas as coisas, hoje e sempre.

A Universidade Federal de Viçosa e a PPGBA- Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade em aprimorar meus conhecimentos e realizar o mestrado tão sonhado e esperado.

À minha orientadora, Andréa de Oliveira Barros Ribon pelo acolhimento, orientação, ensinamentos e paciência que tanto auxiliaram na realização e conclusão do trabalho.

Aos meus coorientadores, João Paulo Viana Leite e Ciro César Rossi pelos ensinamentos e parceria no decorrer do percurso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que foi essencial para realização e conclusão do trabalho.

Ao professor Tiago Antonio de Oliveira Mendes, pelo acolhimento, preocupação desde o momento da seleção, amizade, incentivo e boa vontade.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) pela amizade, paciência, ensinamentos, momentos de descontração e troca de experiências, em especial a Ananda, João Pedro e Jeany.

À equipe do Biopros pelo suporte na produção dos extratos e fração hexânica, em especial à Laís, Milena, Samila e Luana.

Ao Departamento de Química, em especial ao professor Eduardo Varejão e Jodieh pela disponibilidade e auxílio na realização da análise CG-EM dos extratos.

A Universidade Estadual de Uberaba, em especial a professora Joely Ferreira Figueiredo Bittar pela colaboração e envio de todos os isolados usados no trabalho.

À Ana Paula Agrizzi, pela gentileza e prontidão na coleta do material vegetal do trabalho. Aos meus pais: Édila e Genival por todo sacrifício, força espiritual, amor e incentivo.

Aos meus irmãos Lílian, Zidane e Bernardo pelo amor e paciência. Ao meu amado sobrinho Henry, meu raio de luz e força diária.

A meu namorado Pedro Antônio, pela parceria, paciência, amor e motivação todo santo dia. Obrigada, meu amor.

A todos meus amigos pela força, incentivo e amor, em especial a Luis, Cláudio, Ednilson, Armanda e Nath. Sou muito grata e orgulhosa da nossa amizade, meus melhores.



“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

(Chico Xavier)

BIOGRAFIA

Lizandra das Neves Quaresma, segunda filha de Édila Santana das Neves e Genival Quaresma, nasceu em 17 de fevereiro de 1996 em Ipiaú, Bahia. Iniciou a graduação no ano 2014 na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – *Campus Jequié*, no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, concluindo o curso em janeiro de 2020. Em março de 2021, ingressou no Programa de mestrado da Pós- Graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa – *Campus Viçosa*, defendendo sua dissertação em março de 2023.

RESUMO

QUARESMA, Lizandra das Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Suscetibilidade de bactérias isoladas de dermatopatias caninas a extratos foliares de *Eugenia astringens* (Cambess) e formulações tópicas.** Orientadora: Andrea de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: João Paulo Viana Leite e Ciro César Rossi.

Bactérias patogênicas são frequentemente associadas a infecções de pele em cães, podendo agravar o quadro do animal e levar ao aumento da mortalidade. Algumas dessas bactérias desenvolveram resistência a antibióticos comumente utilizados em terapias para o tratamento de dermatopatias em cães, dificultando o processo de tratamento e reabilitação do animal. O uso de fitoterápicos vem sendo integrado ao tratamento dessas doenças devido ao seu potencial terapêutico e baixos efeitos colaterais. Este trabalho teve por objetivo caracterizar extrato bruto e fração hexânica preparada de folhas de *Eugenia astringens* (Cambess) e avaliar a atividade antimicrobiana do material vegetal sobre bactérias de dermatopatias caninas. Foi detectada por cromatografia gasosa a presença de compostos sesquiterpenos (cariofileno e α -amorfenos) no extrato bruto e uma mistura de compostos hidrocarbonetos na fração hexânica. Das bactérias isoladas de cães assistidos pelo Hospital Veterinário de Uberaba, Minas Gerais, oito foram Gram-positivas e 17 Gram-negativas. Entre as bactérias identificadas estão *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Kosakonia cowani*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella pneumoniae*. As bactérias Gram-positivas mostraram-se sensíveis a todos os antibióticos testados enquanto que uma maior taxa de resistência foi vista entre as Gram-negativas, muitas das quais foram multirresistentes. O extrato bruto e fração hexânica de *E. astringens* foi efetivo contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, porém não tiveram efeito sobre as bactérias Gram-negativas. Duas formulações tópicas antibacterianas foram produzidas a partir da fração hexânica de *E. astringens* que tiveram forte potencial de inibição de crescimento nas bactérias Gram-positivas. Em conclusão, o extrato bruto e a fração hexânica de *E. astringens* apresentaram forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas revelando o potencial de *E. astringens* como fonte de metabólitos que podem ser utilizados na preparação de pomadas fitoterápicas tópicas, tornando-se fortes aliadas no tratamento de problemas de pele em cães.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Fração hexânica. Formulação tópica.

ABSTRACT

QUARESMA, Lizandra das Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2023. **Susceptibility of bacteria isolated from canine dermatopathies to *Eugenia astringens* (Cambess) foliar extracts and formulations.** Advisor: Andrea de Oliveira Barros Ribon. Co-advisors: João Paulo Viana Leite and Ciro César Rossi.

Pathogenic bacteria are often associated with skin infections in dogs, which can aggravate the animal's condition and lead to increased morbidity and mortality. Some of these bacteria have developed resistance to antibiotics commonly used in therapies for the treatment of dermatopathies in dogs, making the process of treatment and rehabilitation of the animal more difficult. The use of herbal medicines has been integrated into the treatment of these diseases due to their therapeutic potential and low side effects. The objective of this work was to characterize the crude extract and hexane fraction prepared from *Eugenia astringens* (Cambess) leaves and to evaluate the antimicrobial activity of the plant material on canine dermatopathies bacteria. Gas chromatography detected the presence of sesquiterpene compounds (caryophyllene and α -amorphine) in the crude extract and a mixture of hydrocarbon compounds in the hexane fraction. Of the bacteria isolated from dogs assisted by the Veterinary Hospital of Uberaba, Minas Gerais, eight were Gram-positive and 17 Gram-negative. Among the identified bacteria are *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Kosakonia cowani*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Klebsiella pneumoniae*. Gram-positive bacteria were sensitive to all antibiotics tested while a higher rate of resistance was seen among Gram-negative bacteria, many of which were multi-resistant. The crude extract and hexane fraction of *E. astringens* was effective against all Gram-positive bacteria tested, but had no effect on Gram-negative bacteria. Two topical antibacterial formulations were produced from the hexane fraction of *E. astringens* that had strong potential to inhibit the growth of Gram-positive bacteria. In conclusion, the crude extract and the hexane fraction of *E. astringens* showed strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria, revealing the potential of *E. astringens* as a source of metabolites that can be used in the preparation of topical herbal ointments, becoming strong allies in the treatment of skin problems in dogs.

Keywords: Antibacterial activity. Hexane fraction. Topical formulation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Patógenos bacterianos	10
1.2 Dermopatias em cães.....	12
1.3 Resistência antimicrobiana	12
1.4 Fitoterapia.....	14
1.5 <i>Eugenia astringens</i> (Cambess)	16
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
3. OBJETIVO GERAL	22
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO 1: SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA ISOLATED FROM CANINE DERMATOPATHIES TO <i>Eugenia astringens</i> FOLIAR EXTRACTS AND FORMULATIONS	23
Abstract	23
Introduction	24
Material and Methods	26
Plant Material	26
Preparation of the Crude Extract	26
Fractionation of the Crude Extract and Characterization of the Hexane Fraction.....	26
Bacterial Isolation, Reference Strains and Culture Conditions	27
Identification of Bacterial Isolates From Skin Infections.....	27
Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).....	28
Agar Diffusion Assay and Antimicrobial Activity of the Topical Formulation	28
Results	29
Discussion	39
References	42
Supplementary Material	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

A microbiota dos cães é composta por uma variedade de microrganismos, entre os quais se encontram bactérias que podem se tornar patógenos oportunistas capazes de causar doenças nos animais e em seus donos. As infecções de peles são um dos problemas mais recorrentes em hospitais veterinários associados aos cães e o tratamento geralmente é realizado pela administração de antibióticos orais e tópicos. Porém, o uso recorrente de antibióticos na terapia propiciou a seleção de cepas resistentes a tais drogas. A grande proximidade dos pets com seus donos abre caminho para que essas bactérias possam ser transmitidas, e junto a elas, os genes de resistência, onde estudos recentes demonstram que a relação e interação de animais de companhia e humanos pode favorecer a troca dessas cepas resistentes (Drougka, *et al.*, 2016).

Um grande aliado para o tratamento de infecções bacterianas é o uso de fitoterápicos, que vêm sendo amplamente utilizados nas medicinas humana e veterinária. Os medicamentos fitoterápicos vêm ganhando maior aceitação no mercado por conta de algumas vantagens como menores efeitos colaterais e melhor tolerância do paciente quando utilizados adequadamente e em doses prescritas por um profissional de saúde. No Brasil, por exemplo, existe o medicamento Acheflan, que é um fitoterápico desenvolvido a partir do princípio ativo da espécie vegetal *Cordia verbenacea*, utilizado amplamente para tratar de processos inflamatórios em humanos.

Estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa identificaram a espécie vegetal *Eugenia astrigens* Cambess (Myrtaceae) como produtora de compostos bioativos com forte potencial de inibição sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*. Uma caracterização química preliminar identificou a presença de compostos sesquiterpenos que possivelmente podem estar associados à atividade antibacteriana, atuando sobre a membrana celular da bactéria.

1.1 Patógenos bacterianos

Staphylococcus aureus é a bactéria mais estudada da família Staphylococaceae e um dos patógenos frequentemente associados a infecções em humanos e animais, embora cause também intoxicações alimentares, infecções de pele, osteomielite e endocardite. As espécies *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, assim como *S. aureus*, são bactérias coagulase-positivas que possuem características semelhantes como o crescimento em altas concentrações de sal, capacidade de fermentar manitol (*S. intermedius*), produzindo as colônias amarelas

sugestivas de *S. aureus*, embora produzam um duplo halo de hemólise em meio ágar sangue. Pelas características bioquímicas muito semelhantes é difícil diferenciá-las, sendo necessário o uso de técnicas complementares, como Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) ou testes moleculares que se baseiam na amplificação e sequenciamento parcial de genes como *sodA*, *rpoB* e *nuc* (Cheng, *et al.*, 2018; Blaiotta, *et al.*, 2005; Zulfiana, *et al.*, 2021). Essas três espécies são conhecidas pela alta virulência e grande capacidade de adquirir resistência a diversas classes de antibióticos (Rincón, *et al.* 2014; Oteo, *et al.* 2017).

Entre os *Staphylococcus* coagulase–negativos (CoNS) podem ser citados *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. felis* e *S. carnosus*, que são bactérias que colonizam a pele e a membrana mucosa dos seres vivos, consideradas menos virulentas e que causam infecções oportunistas quando há queda de imunidade do hospedeiro (Argemi, *et al.*, 2019; Becker, *et al.*, 2014). *S. epidermidis* é responsável por mais de 50% das infecções causadas pelos CoNS sendo um importante agente causador de bacteremia hospitalar e infecções relacionadas a catéter (Piette e Verschraegen, 2009; Severn, *et al.*, 2023). Embora as infecções sejam menos severas que as causadas pelos coagulase-positivos, vêm se observando um aumento no número de registros de CoNS em amostras clínicas e as suas altas taxas de resistência a uma gama de antibióticos, o que torna o tratamento um desafio (Michels, *et al.*, 2021).

As bactérias do grupo Staphylococci causam diferentes doenças em animais. *S. hyicus* causa epidermite exsudativa e artrite em porcos, *S. coagulans* é responsável por otite externa em cães, *S. delphini* causa lesões cutâneas supurativas em golfinhos e *S. intermedius* muitas vezes está associada a infecções de pele de animais domésticos, como cães, gatos e cavalos, estando também relacionada a outras infecções como cistite e otite (Rich, 2005). Finalmente, *S. agnetis* está associada às mastites bovinas subclínica e clínica e *S. caprae* está envolvida com infecções intramamárias em cabras leiteiras (Rossi, *et al.*, 2020).

Grande parte da transmissão de bactérias entre indivíduos é facilitada pela proximidade entre homem-animal de companhia e homem-animal de produção. Segundo Haag *et al.* (2019) os eventos de troca de hospedeiros, tanto entre humanos e animais quanto entre animais se tornaram bastante acentuados com a domesticação e comercialização de espécies animais, o que possibilitou uma maior disseminação de muitas bactérias. Indivíduos assintomáticos colonizados por cepas bacterianas podem disseminar o patógeno ao contaminar as próprias mãos e estabelecer contato com animais domesticados, em especial

pets (Cole *et al.*, 2018; Ondusko e Nolt, 2018).

1.2 Dermopatias em cães

Atualmente as infecções bacterianas em cães são um problema muito comum, geralmente controlado por terapia a base de antibióticos orais e tópicos. As lesões cutâneas ou dermatopatias variam em gravidade devido a fatores relacionados à profundidade da infecção e sua extensão, estado clínico do cão e histórico de doenças de pele, podendo ser do tipo superficial leve como em pápulas ou pústulas, ou mais graves e profundas como os furúnculos, agravando para hemorragia de eritema e pele edematosa (Layne, 2019). Geralmente as espécies mais associadas a infecções em cães são *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *S. schleiferi*, porém estudos recentes relatam que bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* pode também ser os agentes causais (Menezes, *et al.*, 2021).

S. pseudintermedius é a espécie colonizadora mais comum na pele do cão podendo causar infecções bacterianas como dermatite, situação ocasionalmente passada do cão para o seu dono (González-Domínguez *et al.*, 2020). Um estudo com 116 cães atendidos em duas diferentes clínicas veterinárias de Belo Horizonte, Brasil, identificou *S. pseudintermedius* como o principal causador de piodermite canina, presente em 77,6% das amostras (Viegas, *et al.*, 2022). Outra espécie frequentemente associada a infecções caninas é *P. aeruginosa*, onde estudos apontam que grande parte genes envolvidos no processo de resistência a antibióticos em humanos foi encontrada em isolados de *P. aeruginosa* de cães, mostrando novamente a possibilidade de transmissão entre donos e seus animais de estimação (Arais, *et al.*, 2016). Em outro estudo realizado com 43 cães com infecções superficiais de pioderma no Complexo Clínico Veterinário na Índia foi reportada a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* e *E. coli*, *Klebsiella ssp.* e *Pseudomonas ssp.*, porém com prevalência de *Staphylococcus spp* (Khinch, *et al.*, 2022).

1.3 Resistência antimicrobiana

Evolutivamente, bactérias desenvolvem adaptações para superar os desafios ambientais. Associado a isso, o uso excessivo de antimicrobianos no combate aos patógenos promoveu a emergência de resistência a essas drogas (Michael *et al.*, 2014). Atualmente, a resistência antimicrobiana é um grande problema para as medicinas humana e veterinária. Aproximadamente 25.000 mortes por ano na União Europeia e 700.000 em todo o mundo

são devido a infecções causadas por patógenos resistentes a antibióticos (Álvarez *et al.*, 2019). Frente a esse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem trabalhando consideravelmente para desenvolver e instalar um plano de ação global para combater a resistência antimicrobiana, estabelecendo metas estratégicas, que incluem conscientização, vigilância e pesquisa da resistência antimicrobiana.

Em 1928 Alexander Fleming descobriu a forte atividade de penicilina sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*, uma descoberta fantástica para época gerando grande impacto positivo no campo da medicina. A penicilina foi o antibiótico usado a partir de então para o tratamento de muitas infecções e doenças. Com o desenvolvimento de resistência à penicilina, a meticilina, beta-lactâmico que pertence ao grupo das penicilinas passou a ser usado. Ela se liga às proteínas envolvidas na síntese da parede celular, conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PLP), que impedem a formação da parede celular promovendo a lise bacteriana. Bactérias que possuem o gene *mecA* produzem uma proteína adicional, a PLP 2a, que tem baixa afinidade a beta- lactâmicos, tornando a bactéria resistente a essa classe de antibióticos (Chambers, 1997). Esse mecanismo de resistência é observado não somente em isolados de *S. aureus*, mas também em *S. pseudintermedius* e *S. intermedius* o que causa um problema urgente de saúde, considerando a possibilidade de transmissão de isolados entre animais e humanos (Hassoun *et al.*, 2017). A análise de sequências espaçadoras de CRISPRs localizadas em elementos SCC*mec* revelou a presença de elementos genéticos móveis transferidos entre *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* isolados de cães, e depois para cepas de *S. capitis* e *S. aureus* isoladas de humanos (Rossi., *et al.*, 2020).

S. aureus é um patógeno bem-sucedido, que foi capaz de se adaptar aos agentes antimicrobianos desenvolvidos como a penicilina, meticilina e vancomicina (Gajdács, 2019). Clinicamente a cepa *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi constatada na década de 1960 (Jevons, 1961). A evolução e disseminação de MRSA são constatadas em todo o mundo, sendo relatada como grande perigo por fatores relacionados à constante prevalência e tendência a crescente resistência (King, *et al.*, 2006). O uso de antibióticos tem um papel fundamental no tratamento de infecções bacterianas, porém estudos recentes demonstram que a vancomicina, que é o antibiótico comumente usado para tratar infecções por MRSA, isoladamente ou em combinação, as cefalosporinas de primeira e segunda geração e carbapenêmicos têm sido ineficazes em para tratar de infecções causadas por bactérias que já apresentaram resistência a meticilina (Nandhini, *et al.*, 2022).

Um estudo reportou a alta frequência (94%) de isolados de *S. pseudintermedius*

mecA positivos em cães, sendo 12 resistentes à oxacilina e 29 resistentes a outras classes (Bourguignon *et al.* 2016). Em outro trabalho realizado no Sul do Brasil, a presença de *S. pseudintermedius* foi detectada em 11,6% das amostras anais e nasais de cães domésticos e cães de abrigo com maior prevalência do patógeno em cães domésticos (Machado *et al.* 2017). Outro trabalho epidemiológico realizado em animais de estimação com dermatopatias entre 2009 e 2011 identificou a presença majoritária de *S. pseudintermedius*, seguida por *S. aureus*. (Ruiz-Ripa *et al.* 2021). Entre os isolados de *S. pseudintermedius*, 27% se mostraram resistentes à metilicina e 55% dos isolados das duas espécies eram multirresistentes.

Nesse mesmo panorama é observada a resistência antimicrobiana em hospitais veterinários do Brasil. Em um estudo mais recente, realizado no estado de São Paulo encontrou-se um alto percentual (76,92%) de resistência a antibióticos em todos isolados analisados (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.) entre eles as classes dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, lincosamidas, sulfonamida e anfenicol (Menezes, *et al.*, 2022).

1.4 Fitoterapia

As plantas produzem compostos ativos que possuem grande atividade contra uma ampla variedade de microrganismos sendo usadas por centenas de anos para combater patógenos como bactérias, fungos e vírus (Vasconcelos, *et al.* 2018). O Brasil é o país que apresenta a maior biodiversidade do mundo, com mais de 50.000 espécies de plantas superiores. Nos últimos anos foram apresentados muitos pedidos de patentes baseados em plantas nativas brasileiras, a maioria relacionada a doenças inflamatórias, alérgicas, parasitárias, infecciosas ou digestivas, incluindo extratos de *Carapa guianensis*, do gênero *Copaifera*, *Cordia verbenacea*, *Erythrina mulungu*, *Physalis angulata* e outras composições farmacêuticas com antileishmania, atividade antimalárica ou tripanocida (Balbani, *et al.* 2009). O banco de dados de patentes do Espacenet e do INPI informou que entre os anos de 1995 a 2017 houve 876 pedidos brasileiros de patentes de fitoterápicos, sendo 377 de inventores independentes, 257 de universidades e centros de educação tecnológica e, 147 realizados por empresas (França e Vasconcellos, 2018). Produtos naturais são excelentes estratégias, com propriedades únicas, no ramo da medicina, sendo utilizados como alternativa terapêutica, no combate a problemas como resistência a biofilmes bacterianos (Borges, *et al.* 2016). Em especial, as plantas medicinais são utilizadas pela população, em forma de chás e

sumos, como alternativa terapêutica apoiada por políticas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (Zeni, *et al.* 2017). Os fitoterápicos possuem popularidade principalmente entre o público idoso e feminino por conta de várias vantagens, tais como menor efeito colateral, melhor tolerância, menor custo e maior aceitabilidade devido a um longo histórico de uso e percepção de segurança (Tabassum e Hamdani, 2014).

O mercado mundial de medicamentos comercializa cerca de US\$ 1,1 trilhão anualmente, e dessa quantia, 35% têm origem em produtos naturais (Calixto, 2019). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alterou suas normas legais para medicamentos fitoterápicos, com base na harmonização com os requisitos praticados internacionalmente e as características do mercado brasileiro, facilitando o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos pela população brasileira (Carvalho, *et al.* 2014). Dentre os medicamentos fitoterápicos utilizados mais conhecidos no Brasil, encontra-se o Acheflan, oriundo da espécie *Cordia verbenace*, um anti-inflamatório de uso local que age no alívio de dores associadas à inflamação dos músculos e tendões, desenvolvido e produzido pela empresa Aché Laboratórios. Esse foi o primeiro fitoterápico desenvolvido e produzido nacionalmente (Aché, 2022). Entre os fitoterápicos de uso animal encontra-se o Fitofix Gel produzido pela empresa Organnact, composto por uma combinação de plantas (*Calendula officinalis* L. (calêndula); *Stryphnodendron barbatiman* Mart. (barbatimão); *Symphyntum officinalis* L. (confrey); *Aloe vera* (aloe); *Matricaria chamomilla* L. (camomila); *Echinacea angustifolia* DC. (equinacea) que promove rápida cicatrização e regeneração dos tecidos, em cortes e ferimentos de qualquer natureza, contendo um componente antisséptico que previne infecções nos casos de ferimentos muito contaminados (Organnact, 2022).

A lista de estudos que demonstra o potencial terapêutico de plantas é grande e muitos poderiam ser explorados para o desenvolvimento de fitoterápicos. *Tibouchina granulosa*, conhecida vulgarmente como quaresmeira, possui atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória, e infusões preparadas a partir dessa espécie reduziram a migração celular e produção de citocinas (Sobrinho, *et al.* 2017). A casca da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) apresentou atividade antibacteriana com concentrações mínimas de inibição (CIMs) de óleo essencial e cinamaldeído de 6,25 µg/mL e 2,5 mM, respectivamente, para *Porphyromonas gingivalis*, além de forte atividade antibiofilme. Recentemente, um estudo conseguiu demonstrar a atividade antimicrobiana do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) em *S. aureus* e *pseudintermedius* resistentes à metilicina (Nocera, *et al.*, 2020). Outra pesquisa relata forte atividade antibacteriana da espécie *Hypericum perforatum* sobre bactérias envolvidas com

infecções de pele, como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium spp.* e *Clostridium histiolyticum* (Tresch, *et al.*, 2019). Em outro estudo foi reforçado as propriedades naturais com forte atividade antibacteriana nas espécies *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla*, *Salvia officinalis* sobre agentes envolvidos com infecções de pele, revelando potencial antibacteriano para tratamentos tópicos de infecções cutâneas primárias e secundárias em cães (Fitzi, *et al.*, 2002).

1.5 *Eugenia astringens* (Cambess)

O gênero *Eugenia* destaca-se por apresentar propriedades medicinais que podem ser usadas para o tratamento de feridas e infecções. Dentro do gênero encontra-se a espécie *Eugenia astringens*, planta endêmica do Brasil de ocorrência na Mata Atlântica, que pode ser encontrada em forma de arbusto ou árvore de 1-10m de altura, sendo vulgarmente conhecida como "bagaçu", -arapongall, -guapêll ou -guaramirimll. Sua distribuição geográfica tem ocorrência confirmada no nordeste (Bahia e Sergipe), sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo), na região do sul (Paraná e Santa Catarina) e no arquipélago Fernando de Noronha, em vegetação de floresta pluvial e restinga (SIBBr, 2023).

Trabalhos feitos com os óleos essenciais de algumas de suas espécies, entre elas *E. astringens*, relataram a atividade biológica contra cepas de *S. aureus* com CIM variando de 119,2 a 56 µg/MI, porém sem ou pouco efeito sobre bactérias Gram-negativas (Costa, *et al.* 2020). Recentemente, outro estudo constatou que a fração hexânica de *E. astringens* inibiu o crescimento de cepas de micobactérias tanto em cultura bacteriana quanto em macrófagos infectados, demonstrando o potencial farmacológico dos compostos identificados para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir dessa espécie (Santiago-Carvalho, *et al.*, 2022).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS S.A. Acheflan. Disponível em: <<https://www.ache.com.br/produto/sob-prescricao/acheflan-creme/>>. Acesso em 27-05-2022.
- Álvarez A., Fernández L., Gutiérrez D., Iglesias B., Rodríguez A. (2019). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals: Latest Trends and Treatments Based on Bacteriophages. *J Clin Microbiol*, [https://doi: 10.1128/JCM.01006-19](https://doi.org/10.1128/JCM.01006-19).
- Arais L.R., Barbosa A.V., Carvalho C.A., Cerqueira A.M. (2016). Resistência Antimicrobiana, Transporte De Integrins E Mutações Giro E Giro Em *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas De Cães Com Otite Externa E Pioderma No Brasil. *Vet Dermatol*, [https://doi: 10.1111/vde.12290](https://doi.org/10.1111/vde.12290).
- Argemi X., Hansmann Y., Prola K., Prévost G. (2019). Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *Int J Mol Sci*, [https://doi: 10.3390/ijms20051215](https://doi.org/10.3390/ijms20051215). PMID: 30862021; PMCID: PMC6429511.
- Balbani A.P., Silva D.H., Montovani J.C. (2009). Patents Of Drugs Extracted From Brazilian Medicinal Plants. *Expert Opin Ther Pat*, [https://doi: 10.1517/13543770902824180](https://doi.org/10.1517/13543770902824180).
- Becker K., Heilmann C., Peters G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, [https://doi: 10.1128/CMR.00109-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13).
- Blaiotta G, Casaburi A, Villani F. (2005). Identification And Differentiation Of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* By Species-Specific PCR Assays Of sodA Genes. *Syst Appl Microbiol*, [http://doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.007](http://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.007).
- Borges A., Abreu A.C., Dias C., Saavedra M.J, Borges F, Simões M. (2016). New Perspectives On The Use Of Phytochemicals As An Emergent Strategy To Control Bacterial Infections Including Biofilms. *Molecules*, [https://doi: 10.3390/molecules21070877](https://doi.org/10.3390/molecules21070877).
- Bourguignon E., Viçosa G.N., Corsini C.M.M., Moreira M.A.S., Nero L.A., Conceição L.G. (2016). Description of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* From Canine Pyoderma In Minas Gerais State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*, [https://doi:10.1590/1678-4162-8150](https://doi.org/10.1590/1678-4162-8150).

- Calixto J.B. (2019). The Role Of Natural Products In Modern Drug Discovery. An Acad Bras Cienc, <https://doi:10.1590/0001-3765201920190105>.
- Carvalho A.C., Ramalho L.S., Marques R.F., Perfeito J.P. (2014). Regulation Of Herbal Medicines In Brazil. J Ethnopharmacol, <https://doi:10.1016/j.jep.2014.08.019>.
- Chambers H.F. (1997). Methicillin Resistance In Staphylococci: Molecular And Biochemical Basis And Clinical Implications. Clin Microbiol Rev, <https://doi:10.1128/CMR.10.4.781>.
- Cheng D., Qiao L., Horvatovich P. (2018). Toward Spectral Library-Free Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Bacterial Identification. J Proteome Res, <http://doi:10.1021/acs.jproteome.8b00065>.
- Cole A.L., Cosgrove Sweeney Y., Lassetter A.G., Gray J.M., Beavis A.C., Chong C.F., Hajheidari S.V., Beyene A., Patton D.L., Cole A.M. (2018). Avaliação do Macaco-rabo-deporco (*Macaca nemestrina*) Como Modelo De Transporte Nasal Humano De *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, <https://doi:10.1128/IAI.00043-18>. PMID: 29555678; PMCID: PMC5964513.
- Costa J.S., Cruz E.N.S., Setzer W.N., Silva J.K.R., Maia J.G.S., Figueiredo P.L.B. (2020). "Óleos Essenciais das Espécies Brasileiras de *Eugenia* e *Syzygium* e Suas Atividades Biológicas". Biomol, <https://doi.org/10.3390/biom10081155>.
- de Menezes M.P., Borzi M.M., Ruaro M.A., Cardozo M.V., Rabelo R.C., Verbisck N.V., Moraes P.C. (2022). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated From Surgical Site of Dogs, Surgeon's Hands and Operating Room in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil. Top Companion Anim Med, <https://doi:10.1016/j.tcam.2022.100638>.
- de Menezes M.P., Facin A.C., Cardozo M.V., Costa M.T., Moraes P.C. (2021). Evaluation of the Resistance Profile of Bacteria Obtained From Infected Sites of Dogs in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil: A Retrospective Study. Top Companion Anim Med, <https://doi:10.1016/j.tcam.2020.100489>.
- Drougka E., Foka A., Koutinas C.K., Jelastopulu E., Giormezis N., Farmaki O., Sarrou S., Anastassiou E.D., Petinaki E., Spiliopoulou I. (2016). Interspecies Spread Of *Staphylococcus aureus* clones Among Companion Animals And Human Close Contacts In A Veterinary Teaching Hospital. A Cross-Sectional Study In Greece. Prev. Vet. Med, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.02.004>.
- Fitzi J, Fürst-Jucker J, Wegener T, Saller R, Reichling J. (2002). Phytotherapy of chronic dermatitis and pruritus of dogs with a topical preparation containing tea tree oil (Bogaskin). Schweiz Arch Tierheilkd. <http://doi:10.1024/0036-7281.144.5.223>.

- França E., Vasconcellos A.G. (2018). Patentes De Fitoterápicos No Brasil: Uma Análise Do Andamento Dos Pedidos No Período De 1995-2017. CC&T, <http://doi.org/10.35977/0104-1096.cct2018.v35.26367>.
- Gajdács M. 2019. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics Basel, <http://doi: 10.3390/antibiotics8020052>.
- González-Martín M., Corbera J.A., Suárez-Bonnet A., Tejedor-Junco M.T. (2020). Virulence Factors In Coagulase-Positive Staphylococci Of Veterinary Interest Other Than *Staphylococcus aureus*. Vet Q, <https://doi: 10.1080/01652176.2020.1748253>.
- Haag A.F., Fitzgerald J.R., Penadés J.R. (2019). *Staphylococcus aureus* In Animals. Microbiol Spectrum, <https://doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>.
- Jevons M.P. (1961). -Celbeninll - resistant Staphylococci. Br Med J. PMID: PMC1952888.
- Khinchi R.K., Gaurav A., Manju, Sharma S.K., Solanki S. (2022). Padrão De Suscetibilidade A Antibióticos De Patógenos Bacterianos Isolados De Pioderma Superficial Canino. Current J of Applied Sci and Technol, <https://doi.org/10.9734/cjast/2022/v41i434004>.
- King M.D., Humphrey B.J., Wang Y.F., Kourbatova E.V., Ray S.M., Blumberg H.M. (2006). Emergence Of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone As The Predominant Cause Of Skin And Soft-Tissue Infections. Ann Intern Med, <http://doi: 10.7326/0003-4819-144-5-200603070- 00005>.
- Layne E.A. (2019). Can Pyoderma In Dogs Be Treated With Fewer Antibiotics? Vet Rec, <https://doi: 10.1136/vr.l4018>.
- Machado B.A., Machado R.F.M., Picoli U.S. (2017). An Investigation Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) In Domestic And Shelter Dogs In Montenegro. Rev Bras Saúde Prod Anim, <https://doi:10.1590/s1519-99402017000400005>.
- Michels R., Last K., Becker S.L., Papan C. (2021). Update on Coagulase-Negative Staphylococci—What the Clinician Should Know. Microorganisms, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040830>.
- Nandhini P., Kumar P., Mickymaray S., Alothaim A.S., Somasundaram J., Rajan M. (2022). Recent Developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Treatment: A Review. Antibiotics, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050606>.
- Nocera F.P., Mancini S., Najar B., Bertelloni F., Pistelli L., De Filippis A., Fiorito F., De

- Martino L., Fratini F. (2020). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils against Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*-Associated Pyoderma in Dogs. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani10101782>.
- Ondusko D.S., Nolt D. (2018) *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Ver*, <https://doi:10.1542/pir.2017-0224>. PMID: 29858291.
- ORGANNACT. Fitofix gel. Disponível em: < <https://www.organnact.com.br/produto/para-seu-pet/fitofix-gel/> >. Acesso em 27-05-2022.
- Oteo J., Bou G., Chaves F., Oliver A. (2017). Microbiological Methods For Surveillance Of Carrier Status Of Multiresistant Bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, <http://doi:10.1016/j.eimc.2015.12.013>. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26869070.
- Piette A., Verschraegen G. (2009). Role Of Coagulase-Negative Staphylococci In Human Disease. *Vet Microbiol*, <https://doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.009>.
- Rich M. (2005). Staphylococci In Animals: Prevalence, Identification And Antimicrobial Susceptibility, With An Emphasis On Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Brit J Biomed Sci*, <https://doi:10.1080/09674845.2005.11732694>.
- Rincón S., Panesso D., Díaz L., Carvajal L.P., Reyes J., Munita J.M., Arias C.A. Resistencia A Antibióticos De Última Línea En Cocos Gram Positivos: La Era Posterior A La Vancomicina [Resistance To "Last Resort" Antibiotics In Gram-Positive Cocci: The Post-Vancomycin Era]. *Biomed*, <http://doi:10.1590/S0120-41572014000500022>.
- Rossi C.C., Pereira M.F., Giambiagi-deMarval M. (2020). Underrated *Staphylococcus* Species And Their Role In Antimicrobial Resistance Spreading. *Genet Mol Biol*, <https://doi:10.1590/1678-4685-GMB-2019-0065>.
- Ruiz-Ripa L., Simón C., Ceballos S., Ortega C., Zarazaga M., Torres C., Gómez-Sanz E. (2021). *S. pseudintermedius* and *S. aureus* Lineages With Transmission Ability Circulate As Causative Agents Of Infections In Pets For Years. *BMC Vet Res*, <https://doi:10.1186/s12917-020-02726-4>.
- Santiago-Carvalho I., Simão V. B. L. T., Calixto D. S., Albuquerque C. T., Konno P. U. T., Salgado M. R., Muzitano F. M., Pinto C. S., Lasunskaja E. (2022). Antitubercular And Immunomodulatory Activities Of *Eugenia astringens* n-Hexane Fraction. *Phyt*, <https://doi:10.1016/j.phyflu.2022.100236>.
- Severn M.M., Horswill A.R. *Staphylococcus epidermidis* And Its Dual Lifestyle In Skin

- Health And Infection. Nat Rev Microbiol, <https://doi: 10.1038/s41579-022-00780-3>.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SiBBR).
Eugenia astringens in Ficha de Espécies. Disponível em: https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/eugenia_astringens>. Acesso em 11-03-2023.
- Sobral M., Proença C., Souza M., Mazine F., Lucas E. (2015). Myrtaceae In Lista De Espécies Da Flora Do Brasil. Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. Disponível em:< <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25824>>. Acessado em 02 novembro de 2021.
- Sobrinho A.P., Minho A.S., Ferreira L.L.C., Martins G.R., Boylan F., Fernandes P.D. (2017). Characterization of Anti-Inflammatory Effect And Possible Mechanism of Action of *Tibouchina granulosa*. J Pharm Pharmacol, <http://doi: 10.1111/jphp.12712>.
- Tabassum N., Hamdani M. (2014). Plants Used To Treat Skin Diseases. Pharmaco Rev, <http://doi 10.4103/0973-7847.125531>.
- Tresch M., Mevissen M., Ayrle H., Melzig M., Roosje P., Walkenhorst M. (2019). Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review. BMC Vet Res. <http://doi: 10.1186/s12917-019-1854-4>.
- Vasconcelos N.G., Croda J., Simionatto S. (2018). Antibacterial Mechanisms Of Cinnamon And Its Constituents: A Review. Microb Pathog, <http://doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.036>.
- Viegas F.M., Santana J.A., Silva B.A., Xavier R.G.C., Bonisson C.T., Câmara J.L.S., Rennó M.C., Cunha J.L.R., Figueiredo H.C.P., Lobato F.C.F., Silva R.O.S. (2022). Ocorrência E Caracterização De *Staphylococcus spp.* Resistente À Meticilina Em Cães Doentes No Brasil. PloS, <https://doi: 10.1371/journal.pone.0269422>.
- Zeni A.L.B., Parisotto A.V., Mattos G., Helena E.T.S. (2017). Utilização De Plantas Medicinais Como Remédio Caseiro Na Atenção Primária Em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Cien Saude Colet, <http://doi: 10.1590/1413-81232017228.18892015>.
- Zulfiana R., Suharjono, Kuntaman. (2021). Genetic Profile Mutation RpoB In Clinical Isolate Of Rifampicin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, <https://doi: 10.1515/jbcpp-2020-0444>. PMID: 34214301.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana da fração hexânica de *Eugenia astringens* sobre bactérias isoladas de dermatopatias caninas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar quanto à suscetibilidade a bactérias isoladas de cães;
- Avaliar o efeito do extrato e da fração hexânica sobre as bactérias;
- Identificar os compostos químicos presentes na fração hexânica de *E. astringens*;
- Avaliar a atividade antibacteriana de formulações fitoterápicas.

CAPÍTULO 1: SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA ISOLATED FROM CANINE DERMATOPATHIES TO *Eugenia astringens* (CAMBESS) FOLIAR EXTRACTS AND FORMULATIONS

Lizandra das Neves Quaresma¹, Ana Paula Agrizzi¹, Joely Ferreira Figueiredo Bittar², Ciro César Rossi¹, Eduardo Vinícius Vieira Varejão³, João Paulo Viana Leite¹, Andréa de Oliveira Barros Ribon¹

¹ – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais.

² – Universidade de Uberaba, Instituto Avançado de Veterinária, Medicina Veterinária 38055-500, Uberaba, Minas Gerais.

³ – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais.

Prepared according to Veterinary Microbiology Instructions

Abstract

Bacteria are part of the microbiota of dogs, but they can become pathogenic with the breakdown of the bacterial barrier, which can cause anything from simple complications to more serious and worrying diseases for veterinary medicine. Clinically the treatment for tolerating skin in dogs is carried out using oral and exhibited antibiotics, however over the years pathogenic bacteria have managed to develop resistance to some classes of antibiotics, many of them used in the treatment of dermopathies in dogs. Currently multidrug resistance is a worldwide problem, which in some cases has been circumvented using the active principle of some plant species.

Aiming at the development of strategies to combat pathogenic bacteria through phytotherapy, this work characterized a crude extract and hexanic fraction prepared from leaves of *Eugenia astringens* and evaluated its activity against bacteria associated with skin infections in dogs. Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) revealed

the presence of sesquiterpene compounds in the crude extract and acids stearic, hexadecanoic acid (palmitic acid), polyunsaturated linoleic, palmitic acid in the hexane fraction of *E. astringens*. A total of 25 bacteria was isolated from dogs that were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Times of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) as *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Kosakonia cowani*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Klebsiella pneumoniae*. The bioactive compounds present in *Eugenia astringens* strongly inhibited the growth of Gram-positive bacteria with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.9 µg/mL to 31.2 µg/mL. No activity was observed on Gram-negative isolates. Two topical formulations were produced from hexane extraction (0.5% and 5%) with their antibacterial activity showing good performance. This is the first work that demonstrates the antibacterial activity of *Eugenia astringens* in an in vitro topical formulation for canine dermatopathies isolates.

Keywords: Antibacterial activity. Hexane fraction. *Eugenia astringens*. Topical formulation. Canine dermatopathies.

Introduction

Despite belonging to the natural microbiota of animals, some bacteria can become pathogenic causing skin infections in dogs, which can evolve into more serious cases, such as ulcers, bleeding, erythema, abscesses, and lacerating wounds. The skin is one of the most sensitive parts of the animal's body, as it is a region subjected to various dermatological diseases (Sakina and Mandial, 2011). The species most associated with canine skin disorders are *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*, however, other works describe that this process can also be caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* (Menezes, *et al.*, 2021; Fouda, *et al.*, 2021). Clinically, skin infections

in dogs vary in severity and are related to factors such as the depth of infection and its extension, also taking into account the animal's history of skin diseases. According to the severity they are classified in superficial lesions, such as papules or pustules, or more serious and deep ones, such as boils, aggravating to hemorrhage, erythema, and edematous skin (Layne, 2019), that can quickly spread throughout the animal's body. In Brazil, superficial pyoderma is one of the common skin infections in dogs (Loeffler, *et al.*, 2018). *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* are common causative agents, although other Staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Proteus sp.* have also been reported mainly from deep pyoderma (Viegas, *et al.*, 2022).

Another major problem found in veterinary hospitals are skin infections affected by multiresistant bacteria, leading to high morbidity and mortality rates in dogs (Farghali, *et al.*, 2019). The proximity of pets to their owners opens the way for these bacteria to be transmitted, and along with them, resistance genes, where recent studies show that the relationship and interaction of companion animals and humans can favor the exchange of these resistant strains between them (Drougka, *et al.*, 2016).

The use of botanical medicines (medicines based on plant products and derivatives) is a valuable alternative for treating bacterial infections mainly because it has advantages such as low side effects and low financial cost. Brazil is a world leader in biodiversity which can support the sustainable development of many economic sectors such as the pharmaceutical industry (Ellwanger, *et al.*, 2023). Natural products extracted from fauna and flora can serve as lead compounds for the development of medicines or herbal agents with several biological activities. However, no phytotherapy options for the treatment of skin infection in dogs have been launched until now. Currently in the Brazilian market there is Fitofix gel Organact®, which is an herbal medicine produced from *Calendula officinalis* L., *Stryphnodendron barbatiman* Mart., *Symphytum officinalis* L., *Aloe vera*, *Matricaria chamomilla* L., *Echinacea angustifolia* DC.

Previous studies have shown strong antibacterial activity of leaves extracts prepared from *Eugenia astringens* Cambess (Myrtaceae), a shrub that occurs along the entire coast of Espírito Santo, in the states of Sergipe, southwestern Bahia and southern Brazil. Fractionation of this extract showed that biological activity was present in the hexane fraction (Agrizzi, 2021). Based on these precedents, this work seeks to characterize the crude extract and hexanic fraction prepared from leaves of *E. astringens*, to evaluate their activity on bacteria isolated from skin infection of dogs and to develop a topical antibacterial formulation for veterinary use.

Material and Methods

Plant Material

The collection of plant material, authorized by the Instituto Estadual de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (IEMA), was held in November 2021 at the Parque Estadual de Itaúnas (PEI), located in the state of Espírito Santo that belongs to the System National Nature Conservation Units. The collection of plant material was authorized under the number 031-2017 by the State Institute for the Environment and Water Resources (IEMA) and was carried out in November 2021 from a single shrub of approximately 1.2 m located on the Tamandaré trail. The leaves were packed in raffia bags to facilitate aeration and conducted to the laboratory where they were dried at room temperature. The collection of the plant material was registered under the number. A381FA0 in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen).

Preparation of the Crude Extract

A crude plant extract (CE) was made from the leaves of *Eugenia astringens*, previously dehydrated at room temperature on the bench for a period of seven days. The dry material was pulverized with the use of a knife mill weighed and deposited in a stainless-steel percolator along with dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) in the proportion of 1:1 (v/v) for maceration. After 72h the liquid was placed in the rotary evaporator in a continuous process until a considerable amount of extract was obtained, then kept for lyophilization and storage in a freezer at -20°C.

Fractionation of the Crude Extract and Characterization of the Hexane Fraction

Approximately 2g of the CE was solubilized in 100 mL of ultrapure water (Milli-Q) with the aid of an ultrasonic bath (30°C for 15 min). The suspension was transferred to the separatory funnel and partitioned using the 100 mL of hexane solvent a process carried out in triplicate, resulting in a final volume of 300 mL. The fraction was then concentrated on a rotary evaporator and then lyophilized for complete drying.

The chemical composition of the extracts was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) using a Shimadzu GCMS-QP5050A equipment using a Rtx®-5 capillary column (30 m x 0.25 mm, 0.25 mm), helium as carrier gas at 1.6 mL min⁻¹, 1.0 µL sample volume, scan mode (30.00 to 700.00 m/z) and electron impact

ionization at 70 eV. The extract in hexane was analyzed using the following operating conditions: split ratio 1:5; injector temperature 290 °C; detector temperature 290 °C; oven temperature 40°C for 4 min, increase by 20°C min⁻¹ to 300°C and hold for 65 min. The crude extract was previously subjected to derivatization by silylation to improve the chromatographic properties of the extract, according to the following procedure: 3.0 mg of oil, 100 µL of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and 60 µL of anhydrous pyridine were transferred into a conical reaction flask, the mixture was held at 70°C for 30 min and then subjected to GC-ES analysis. The derivatized extract was analyzed using the following operational conditions: split ratio 1:10; injector temperature 300 °C; detector temperature 300°C; oven temperature 80°C for 5 min, increase by 4°C min⁻¹ to 300°C and hold for 45 min. The relative concentration of each component was calculated as the percentage of the corresponding peak area in relation to the total area of the peaks observed in the chromatogram. Compounds were identified by comparing their experimental mass spectra with data from the equipment library. Only compounds whose mass spectra showed at least 90% similarity with data from the equipment library were reported as identified. The relative concentration of each component was calculated as the percentage of peak area corresponding to the compound in relation to the total area of all peaks observed in the chromatogram.

Bacterial Isolation, Reference Strains and Culture Conditions

The bacterial isolates were provided by the Veterinary Hospital of Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, and were collected in 2022 from injured and/or infected regions of 28 animals, with the aid of sterile cotton swabs and cultivated in Blood Agar Medium (Kasvi®). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) USA 300 were used as references in the antimicrobial assays. Bacteria was cultured on plates containing Brain Heart Agar medium (Merck®) kept at 37°C for 24 h while culture stocks were made in BHI medium containing 20% glycerol and conserved at -80°C.

Identification of Bacterial Isolates From Skin Infections

Initially, bacteria collected from the animals were submitted to biochemical tests (coagulase, catalase, Voges-Proskauer and growth in mannitol salt agar) and Gram staining. Bacteria was also identified by the Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS), followed by the microbial identification system Bruker Maldi Biotyper™. The molecular identification of *S. aureus* and *S.*

intermedius was done with primers targeting the nuclease gene (*nuc aur* and *nuc intr*) (Supplementary Table 1). The reactions consisted of 50 ng of DNA, 1U of Taq DNA polymerase, 1.0 μ L primer, 0.5 μ L dNTP, 2.5 μ L 10X buffer, making up the volume to 25 μ L Milli-Q water. The microtubes containing the samples were placed in the thermocycler (Applied Biosystems®) and were amplified following the specific protocol for each primer. At the end, samples were submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel, with a 100 bp molecular weight marker (Thermo Scientific®) and photographed under UV light in a dark chamber.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

MIC determination was performed using the microdilution method in a 96-well microplate using a bacterial suspension adjusted to 0.5 on the McFarland scale according to European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing (EUCAST, available in www.eucast.org). The CE and HF were prepared at the concentration of 10 mg/mL in dimethylsulfoxide (DMSO, Vetec®). Controls consisted of wells containing MH broth (negative control) or MH broth plus 100 μ L of bacterial suspension (positive control). Microplates were incubated at 37°C for 24 h. The lowest concentration of the hexanic fraction that inhibited visible growth of bacteria was considered the MIC that was expressed in μ g/mL. The test was done in triplicate. To test the susceptibility profile of the isolates the following antibiotics were purchased from Sigma: Gentamicin (G1264), Ampicillin (A9393), Erythromycin (E0774), Ciprofloxacin (17850), Tetracycline (97128), Ceftriaxoline (PHR1382), Penicillin (13752), Ceflacor (PHR1283), Ofloxacin (08757), Amoxicillin (A8523), all prepared in the concentration of 10 mg/mL.

Agar Diffusion Assay and Antimicrobial Activity of the Topical Formulation

The halo test was performed as described by EUCAST selecting isolated colonies from an agar plate prepared 24 h before the assay to prepare a suspension adjusted to a turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard. A sterile nasal swab was dipped into the adjusted suspension and then pressed firmly to the inside of the tube wall to remove excess fluid. Subsequently, the inoculum was spread on a MH medium, rotating the plate approximately 60° each time to ensure uniform distribution. Six 10 mm holes were made in the plate that received 1 X MIC, 5 X MIC, 10 X MIC, 20 X MIC of the hexane fraction, 2 μ L of DMSO or 2 μ L of gentamicin at a concentration of 10 mg/ mL. Plates were incubated at

37°C for 24 h. The diameters of the complete zone of inhibition were measured, including the hole diameter. The experiment was carried out in three biological replicates.

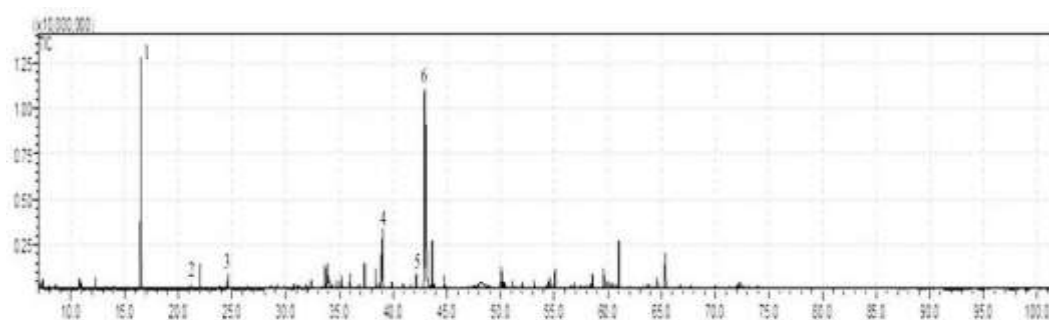
Two topical formulations containing the HF of *E. astringens* (0.5% or 5.0%) incorporated into the base mass dermatological (polyethylene glycol ointment) were prepared in a local pharmacy. As a negative control, a dermatological base without the addition of hexane fraction was used. The evaluation of the antimicrobial activity of the formulation was carried out according to the agar diffusion assay described above, using Gram positive bacteria isolated from skin infections. Around 20 mg of the topical formulation was added into the 10 mm in diameter holes. After 24 h at 37 °C the diameter of the zones of inhibition was measured to assess bacterial inhibition. The experiment was carried out in three biological replicates.

Results

The Crude Extract (CE) and Hexane Fraction (HF) of *Eugenia astringens* were analyzed by gas chromatography (Figure 1) and only compounds with a similarity index equal to or greater than 90% were reported as identified. In the CE the analysis showed the presence of glycerol (Peak 1), two sesquiterpene compounds: Caryophyllene (Peak 2) and α -Amorphene (Peak 3), palmitic acid (Peak 4), linoleic acid (Peak 5), trans-9- Octadecenoic acid (Peak 6), among others (Figure 1A). It was possible to detect in HF (Figure 1B) tetradecyloxirane (Peak 1), n-Octacosane (Peak 2), heneicosane (Peak 3), hexadecane (Peak 4), 1-Iodo-2-methylundecane (Peak 5) and (Peak 6).

Among the compounds that were detected in the CE by GC-MS analysis, aromatic compounds (7.21%), hydrocarbons (1.15%) stand out, which pointed to the presence of two sesquiterpene compounds (caryophyllene and α -Amorphene), fatty acids (39.38%) among them (palmitic acid and linoleic acid), fatty esters (3.23%), alcohols (10.91%) with emphasis on glycerol with the highest percentage, carbohydrates (4.51%). In the compounds present in HF, it was possible to identify hydrocarbons (23.16%), tetradecyloxirane (9.88%) among others. All compounds identified in CE and HF are described in the following table (Table 1).

A



B

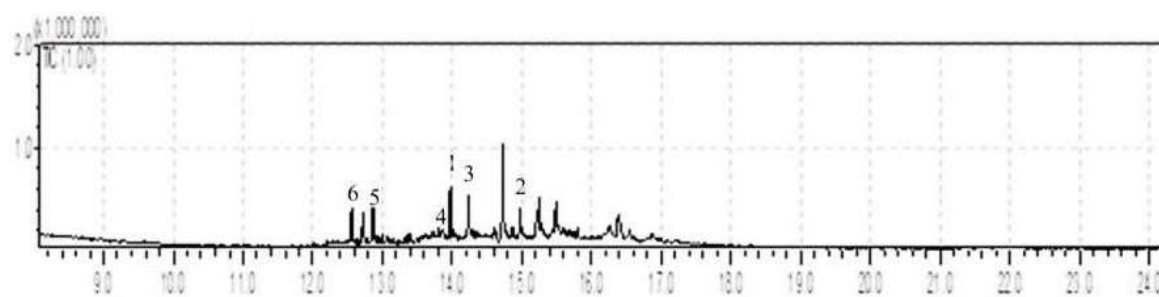


Figure 1. Total ion chromatogram of Crude Extract and Hexane Fraction prepared from *Eugenia astringens*.

Table 1. Chemical constituents identified in the Crude Extract and Hexane Fraction by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

*Rt (min)	Relative percentage (%)	Compounds in CE
	7.21	Aromatic compounds
28.616	0.25	Phloroglucinol 3TMS
37.350	1.52	Gallic acid 4TMS
50.061	1.29	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
58.581	0.91	Gamma-Tocopherol TMS

61.038	3.24	(+)- α -Tocopherol TMS
	1.15	Hydrocarbons
21.132	0.28	Caryophyllene
24.517	0.20	α -Amorphene
33.520	0.10	(7 <i>R</i> ,11 <i>R</i> , <i>E</i>)-3,7,11,15-Tetramethylhexadec-2-ene
56.569	0.14	Heneicosane
59.971	0.43	Tetratetracontane
	39.38	Fatty acids
8.280	0.08	2-hydroxypropanoic acid 2TMS
8.398	0.10	2-hydroxy-2-methylpropanoic acid 2TMS
11.577	0.12	2,2-dihydroxyacetic acid 3TMS
11.956	0.11	2-ethylhexanoic acid TMS
19.095	0.11	Pelargonic acid TMS
38.901	3.06	Palmitic acid TMS
39.029	3.76	Palmitic acid TMS
42.948	15.31	Linoleic acid TMS
43.069	13.03	<i>trans</i> -9-Octadecenoic acid TMS
43.196	0.72	<i>trans</i> -13-Octadecenoic acid TMS
43.642	2.79	Stearic acid TMS
47.907	0.16	Eicosanoic acid TMS
	3.23	Fatty esters
33.656	2.27	Phytol acetate

50.473	0.08	2-Monopalmitoylglycerol TMS
51.116	0.40	1-Monopalmitoylglycerol 2TMS
54.330	0.26	1-Monooleoylglycerol TMS
54.760	0.22	2,3-dihydroxypropyl stearate 2TMS
10.91		Alcohols
16.522	16.83	Glycerol 3TMS
24.787	0.08	<i>meso</i> -Erythritol 4TMS
31.916	0.27	butane-1,2,3-triol 3TMS
34.315	0.19	3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol
36.899	0.32	hexadecan-1-ol TMS
38.715	0.34	Triethylene glycol 2TMS
40.951	0.28	Myo-Inositol 6TMS
41.667	0.29	octadecan-1-ol TMS
42.174	0.85	3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol TMS
44.747	0.70	Tetraethylene glycol 2TMS
50.176	0.98	Pentaethylene glycol 2 TMS
55.105	1.23	Heptaethylene glycol 2TMS
59.617	1.13	Nonaethylene glycol 2TMS
64.586	0.98	Decaethylene glycol 2TMS
65.347	3.28	<i>b</i> -Sitosterol TMS
72.079	0.34	undecaethylene glycol 2TMS
4.51		Carbohydrates

30.811	0.26	<i>D</i> -Xylopyranose 4TMS
33.910	1.66	<i>D</i> -(-)-Tagatofuranose 5TMS
36.003	0.90	Alpha- <i>D</i> -mannopyranose
36.323	0.07	<i>D</i> -Galactose 5TMS
38.359	1.20	Glucopyranose 5TMS
53.140	0.42	a, <i>D</i> -Glucopyranoside-4TMS-b, <i>D</i> -fructofuranosyl-4TMS
	0.65	Others
10.942	0.37	Oxalic acid 2TMS
23.900	0.18	2-hydroxysuccinic acid 3TMS
47.465	0.10	(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeca-9,12-dienoyl chloride
*Rt	Relative	Compounds in HF
(min)	percentage	
	23.16	Hydrocarbons
12.558	4.81	2,3,5,8-Tetramethyldecane
13.972	5.62	Hexadecane
14.231	4.55	Heneicosane
15.241	8.18	<i>n</i> -Octacosane
	15.82	Others
12.863	5.94	1-Iodo-2-methylundecane
14.725	9.88	Tetradecyloxirane

* **tR**: Retention time in minutes.

Of bacteria isolated from skin infection of dogs, eight belonged to the Gram- positive group and 17 were Gram-negative (Figure 2). Among the Gram-positive bacteria, 75% were

positive for catalase, coagulase, and Voges-Proskauer and grew on Mannitol Salt Agar, suggesting *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius* or *S. intermedius*.

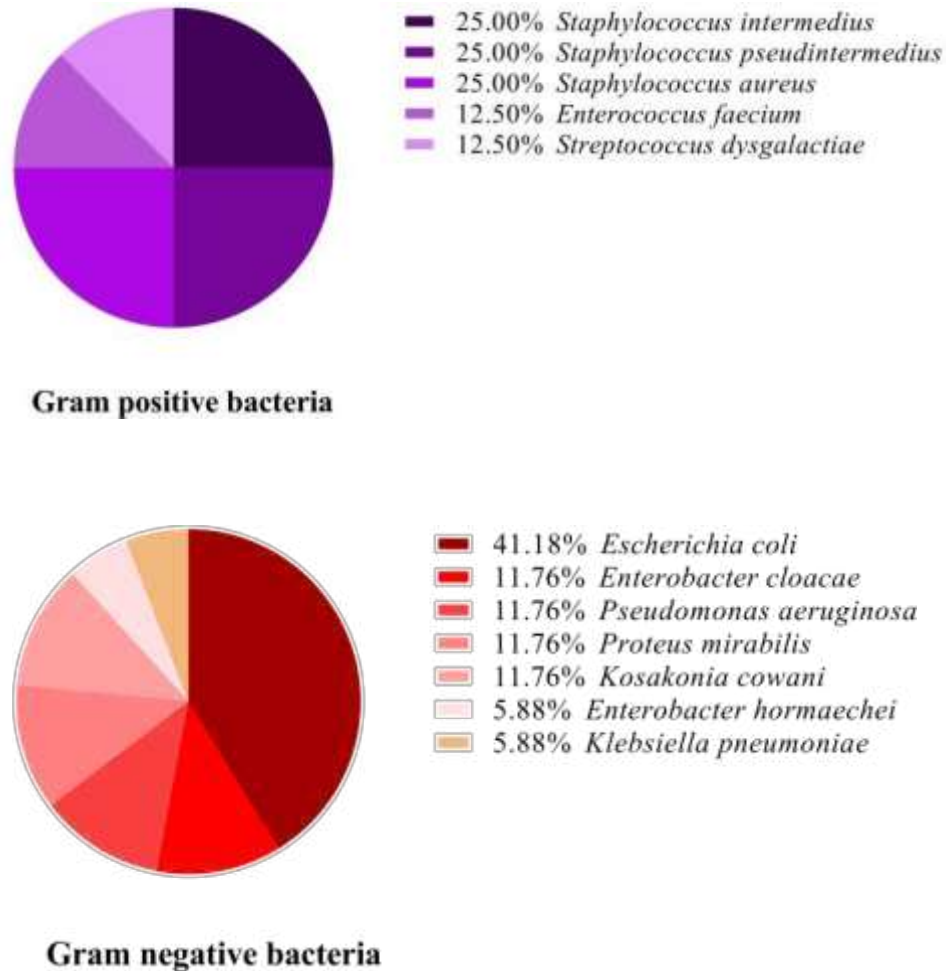


Figure 2: Identification of bacteria isolated from dogs affected with injuries and skin infections at the Veterinary Hospital of Uberaba in 2022.

S. aureus and *S. intermedius* isolates were identified by PCR (Figure 3). The 25 isolates were further identified by MALDI-TOF MS as *Escherichia coli* (7/25), *S. intermedius* (2/25), *S. pseudintermedius* (2/25), *S. aureus* (2/25), *Enterobacter cloacae* (2/25), *Pseudomonas aeruginosa* (2/25), *Proteus mirabilis* (2/25), *Kosakonia cowani* (2/25), *Enterobacter hormaechei* (1/25), *Enterococcus faecium* (1/25), *Streptococcus dysgalactiae* (1/25), and *Klebsiella pneumoniae* (1/25) (Supplementary Table 2). The *mecA* gene was absent

in all Gram-positive bacteria (Supplementary Figure 1).

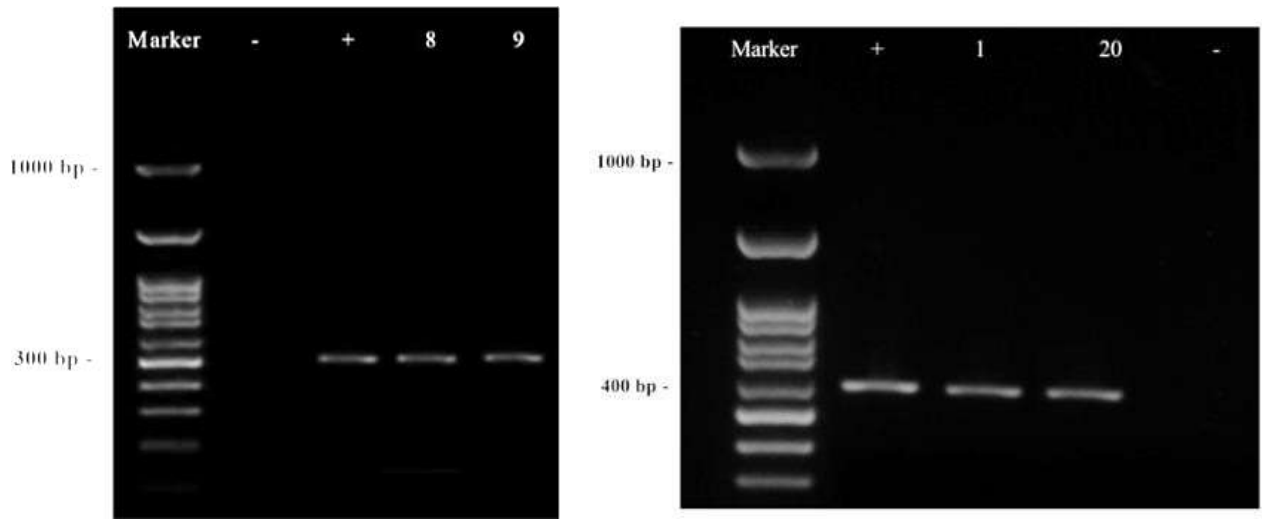


Figure 3: Amplification of the *nuc* gene of bacteria isolated from skin infection of dogs. In the 1.5% gel shown in the left, the *nuc aur* primer was used and an expected 350 bp fragment was seen in DNA isolated from isolates *S. aureus* (08) and *S. aureus* (09). *S. intermedius* ATCC29663 was used as a negative control (-) and *S. aureus* ATCC29213 as the positive control (+); In the gel shown in the right, an expected 450 pb fragment was seen for the amplification of the *nuc intr* gene of isolates *S. intermedius* (01) and *S. intermedius* (20). Control positive *S. intermedius* ATCC29663 (+) and *S. aureus* ATCC29213, the negative control (-). Marker: 100 bp DNA Ladder.

All the 25 bacterial isolates were investigated for antimicrobial resistance (Figure 4 and Table 2). The highest rate of resistance was seen for amoxicillin (40%), while ofloxacin showed no resistance rate. Among Gram-positives, no resistance to the antibiotic tested was found while the Gram-negative bacteria was resistant to amoxicillin (58.8%), penicillin (52.9%), erythromycin (47%), ceflacor (47%), ampicillin (35.3%), gentamicin (17.6%), tetracycline (11.8%), ceftriaxoline (11.8%), and finally ciprofloxacin (5.9%) with less resistant isolates. In the Gram-negative group, bacteria *E. hormaechei* (05), *E. coli* (11), *E. cloacae* (14), *P. aeruginosa* (16), *E. coli* (17), *E. coli* (18), *P. mirabilis* (19), *K. cowani*

(24), *K. pneumonia* (25), *P. mirabilis* (26), *E. coli*(27), *P. aeruginosa* (28) resistance was found to more than one antibiotic analyzed, with emphasis on bacteria *E. coli*, *P. mirabilis* and *K. cowani* who showed resistance to a greater number of antibiotics (Table 2).

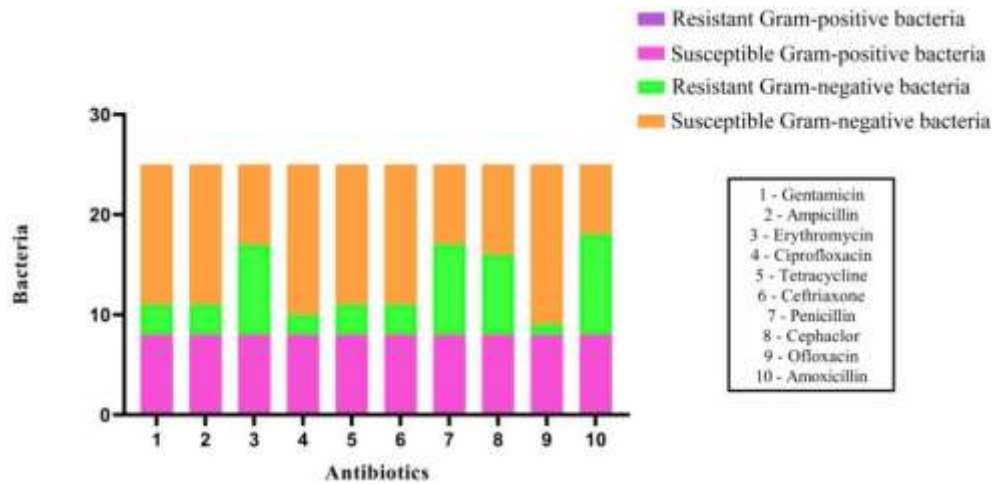


Figure 4: Susceptibility profile of bacteria isolated from dogs with skin infections.

The CE was efficient in inhibiting the growth of Gram-positives, with MIC values ranging from 0.9 $\mu\text{g/mL}$ to 31.2 $\mu\text{g/mL}$. Likewise, the HF had a strong effect on this group (MIC 7.8 $\mu\text{g/mL}$ to 31.2 $\mu\text{g/mL}$) but neither the CE nor the HF inhibited the growth of Gram-negatives (Table 3).

Table 2: Profile of multiresistance of Gram-negative bacteria isolated from dogs.

Species	Antibiotics
<i>Enterobacter hormaechei</i> (05)	Eritromicin, Penicillin, Cephaclor, and Amoxicillin.
<i>Escherichia coli</i> (11)	Penicillin, Cephaclor, and Amoxicillin.
<i>Enterobacter cloacae</i> (14)	Ceftriaxone, Penicillin, Cephaclor, and Amoxicillin.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (16)	Ampicillin, Eritromicin, and Amoxicillin.
<i>Escherichia coli</i> (17)	Ampicillin, Eritromicin, Penicillin, and Cephaclor.
<i>Escherichia coli</i> (18)	Ampicillin, Eritromicin, Ceftriaxone, Cephaclor, and Amoxicillin.
<i>Proteus mirabilis</i> (19)	Gentamicin, Ampicillin, Eritromicin, Penicillin, and

	Cephaclor.
<i>Kosakonia cowani</i> (24)	Gentamicin, Ampicillin, Eritromycin, Penicillin, and Amoxicillin.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (25)	Ampicillin, Eritromycin, Penicillin, and Cephaclor.
<i>Proteus mirabilis</i> (26)	Gentamicin and Tetracycline.
<i>Escherichia coli</i> (27)	Eritromycin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Penicillin and Amoxicillin.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (28)	Penicillin, Cephaclor and Amoxicillin.

The number in parenthesis refers to the identification of the bacterial isolate.

Table 3: Minimum inhibitory concentration of the crude extract, hexane fraction of *Eugenia astringens* and antibiotics against bacteria isolated from with skin infections.

Species	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
	CE	HF	GEN	AMP	ERI	CIP	TET	CEFT	PEN	CEF	OFL	AM
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1.9	31.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S. intermedius</i> (01)	1.9	7.8	1.9	0.4	0.2	0.12	0.4	0.2	0.12	0.12	0.12	250
<i>S. pseudintermedius</i> (03)	1.9	7.8	0.9	0.2	0.12	0.12	0.12	0.2	0.12	0.12	0.12	62.5
<i>E. hormaechei</i> (05)	500	500	15.6	62.5	500	1.9	62.5	250	500	500	1.9	500
<i>E. cloacae</i> (07)	500	500	7.8	0.12	0.2	0.12	0.12	0.2	0.2	0.2	0.2	15.6
<i>S. aureus</i> (08)	1.9	31.2	0.9	7.8	0.2	0.2	0.12	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S. aureus</i> (09)	1.9	31.2	0.2	7.8	0.2	0.12	0.12	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>E. coli</i> (10)	500	500	0.4	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	31.2	0.4	0.12	250
<i>E. coli</i> (11)	500	500	1.9	31.2	250	0.4	0.12	250	500	500	62.5	500
<i>E. faecium</i> (12)	31.2	31.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.12	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>S. pseudintermedius</i> (13)	31.2	31.2	1.9	0.12	0.12	0.4	31.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>E. cloacae</i> (14)	500	500	125	7.8	31.2	0.4	0.4	500	500	500	62.5	500
<i>E. cloacae</i> (15)	500	500	125	7.8	0.4	0.4	31.2	125	0.4	15.6	0.4	500
<i>P. aeruginosa</i> (16)	500	500	250	500	500	0.9	62.5	125	0.4	15.6	0.4	500
<i>E. coli</i> (17)	500	500	125	500	500	0.12	0.12	1.9	500	500	0.4	250
<i>E. coli</i> (18)	500	500	250	500	500	250	250	500	250	500	7.8	500
<i>P. mirabilis</i> (19)	500	500	500	500	500	125	250	250	500	500	62.5	250
<i>S. intermedius</i> (20)	31.2	31.2	0.9	0.9	0.9	0.4	0.9	0.12	0.12	0.12	0.2	500
<i>S. dysgalactiae</i> (21)	31.2	31.2	0.9	0.4	0.4	0.4	0.9	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12

<i>K. cowani</i> (22)	500	500	31.2	250	250	7.8	1.9	0.12	250	0.4	0.12	31.2
<i>E. coli</i> (23)	500	500	31.2	250	500	7.8	125	0.12	31.2	0.9	0.12	31.2
<i>K. cowani</i> (24)	500	500	500	500	500	250	250	125	500	250	125	500
<i>K. pneumoniae</i> (25)	500	500	250	500	500	15.6	250	250	500	500	15.6	250
<i>P. mirabilis</i> (26)	500	500	500	250	250	250	500	0.12	0.12	0.4	0.12	7.8
<i>E. coli</i> (27)	500	500	250	62.5	500	500	500	250	500	250	15.6	500
<i>P. aeruginosa</i> (28)	500	500	0.4	125	125	0.2	62.5	7.8	500	500	1.9	500

CB: *E. astringens* crude extract; HF: *E. astringens* hexane fraction; GEN: Gentamicin; AMP: Ampicillin; ERI: Erythromycin; CIP: Ciprofloxacin; TET: Tetracycline; CEFT: Ceftriaxone; PEN: Penicillin; CEF: Cefaclor; OFL: Ofloxacin; AM: Amoxicillin. ATCC - American Type Culture Collection. The number in parenthesis refers to the identification of the bacterial isolate.

Table 4: Antimicrobial activity assessed by agar diffusion test of formulations produced from the hexane fraction of *Eugenia astringens* on the Gram-positive bacteria isolated in this work.

Species	GEN	CE	HF	F1	F2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2.0 cm	1.5 cm	1.1 cm	1.1 cm	1.3 cm
<i>Staphylococcus intermedius</i> (01)	2.5 cm	1.1 cm	1.5 cm	1.0 cm	1.8 cm
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (03)	2.2 cm	1.7 cm	2.0 cm	1.5 cm	1.8 cm
<i>Staphylococcus aureus</i> (08)	2.0 cm	1.5 cm	1.4 cm	1.5 cm	1.8 cm
<i>Staphylococcus aureus</i> (09)	2.0 cm	1.3 cm	1.4 cm	1.4 cm	1.9 cm
<i>Enterococcus faecium</i> (12)	2.1 cm	1.3 cm	1.6 cm	1.2 cm	1.9 cm
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (13)	2.0 cm	1.8 cm	1.3 cm	1.1 cm	1.7 cm
<i>Staphylococcus intermedius</i> (20)	2.2 cm	1.9 cm	1.3 cm	1.5 cm	2.0 cm
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (21)	1.8 cm	1.7 cm	1.5 cm	1.3 cm	1.8 cm

Halo GEN: Gentamicin 20µL; CE: Crude Extract 20µL; FH: Fraction Hexane 20µL; F1: Formulation 1 (0.5% concentration) 20mg; F2: Formulation 2 (5% concentration) 20mg. The number in parenthesis refers to the identification of the bacterial isolate.

The antibacterial activity of the formulations containing 0.5% (F1) and 5.0% (F2) of HF was evaluated only on Gram-positive bacteria since the fraction had no activity on Gram-

negatives. Both formulations had strong activities revealed by large inhibition halos compared to the antibiotic used as positive control (Table 4 and Supplementary Figure 2). In some cases, the halos generated by F2 were larger or equivalent to HF alone. Gentamicin formed larger halos in all plates. However, the halos formed by F2 obtained an excellent performance, approaching very closely the values of gentamicin (Supplementary Figure 2).

Discussion

The diversity of flora found in Brazil can be explored to develop products to treat skin disease in animals. Although, phytotherapy is seen as a viable alternative by veterinary practitioners it is still an unexplored field and few formulations have reached worldwide market. In this study, two topical formulations produced with different concentrations (0.5% and 5%) of the hexane fraction of *E. astringens* showed promising results sustaining further investigation to support their use in the treatment of skin infections, one of the most recurrent problems in dogs.

The CE and HF of *E. astringens* had strong activity on all Gram-positive bacteria, but had no effect on the Gram-negatives, probably due to the outer membrane layer that provides resistance to different compounds. The cell wall of Gram-negative bacteria contains a thin layer of peptidoglycan surrounded by an internal and outer cell membrane that forms the periplasmic space, a double protection that makes cell lysis difficult (Domalaon, *et al.*, 2018). Unexpectedely, the activity of the CE was higher than the purified fraction. Likewise, the antibacterial activity of the formulations containing the HF were quite like gentamicin, the positive control used in the assay.

Among the compounds identified in the CE of *E. astringens*, the saturated fatty acids stearic, hexadecanoic acid (palmitic acid), polyunsaturated linoleic acid were found, which were already reported in the essential oil of *E. puniceifolia* that have functional and

nutraceutical activities that prevent cardiovascular diseases, obesity and diabetes (Bartolomeu, 2015). Linoleic acid has been described as capable of inhibiting the growth of *S. aureus* and other microorganisms by the alteration of cell wall and cell division (Greenway and Dyke, 1979) and also inhibited the growth of *E. coli* (Jumina, *et al.*, 2019) and *Candida albicans*, and the formation of biofilms (Kim, *et al.*, 2020). Sesquiterpene compounds (caryophyllene e α -amorphone) were reported in a previous study to be involved in the antimicrobial activity of the essential oil of *Piper abbreviatum* (Wan Salleh, *et al.*, 2014). Caryophyllene is a bicyclic compound that has antifungal, antimicrobial and antioxidant activities, the latter mainly observed by the system β - carotene/linoleic acid (Nogueira, *et al.*, 2020). Sesquiterpenes were reported as the main constituents (84.35%) of the HF of *E. astringens*, among of which caryophyllene (18.08%) exhibited strong inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* (Koyama *et al.*, 2019; Santiago-Carvalho, *et al.*, 2022). Another study analyzed essential oils from 56 species of the genus *Eugenia* and reported approximately 500 compounds, with sesquiterpenes (hydrocarbons and oxygen derivatives) as the main class of volatile constituents, along with smaller amounts of monoterpenes and, in some species, low concentration of aromatic and aliphatic compounds revealing the chemical diversity of the genus (de Souza, *et al.*, 2018). In this study, the HF of *E. astringens* presented a higher percentage of hydrocarbons (23.16%). In the essential oil of the species *E. involucrate*, hydrocarbon compounds (83.05%) and sesquiterpenes (6.36%) were also identified (Toledo *et al.*, 2020). In general, a predominance of sesquiterpene compounds is observed within the Myrtaceae family leading to strong evidence that these compounds are largely responsible for the antibacterial activity within the group. Previous work conducted by our group identified the sesquiterpene compounds β - karyophyoene, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methylBicyclo [5.3.0]decane, α - Guaiene, cis-Calamenene, viridiflorene, Phytol acetate in HF of *E. astringens* (Agrizzi,*et al.*, 2021), although the same findings were

not reported here probably due to different time of the year leaves were collected. The collection of the present work took place in the spring season, with a lot of rain, in middle November, 2021. In the work done by Agrizzi, the collection took place in the sunny summer, on August, 2018. This suggests that seasonality factors are related to the differences in the chromatography results of the two works, with seasonality being one of the main factors that directly influence the composition of the chemical constituents of the vegetables (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

Gram-negative bacteria were identified in 68% of the isolates from dogs with skin infections analyzed. This probably happened because samples were taken from dogs with all kind of skin problems, not only superficial pyoderma. Lai *et al.* (2022) reported high prevalence of *S. pseudintermedius* followed by *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. epidermidis*, *Enterococcus gallinarum*, *E. faecalis*, *Streptococcus halichoeri*, *Streptococcus sanguinis*, *Sphingonas mucosissima* and *Acinetobacter schindleri*. *E. coli*, *Proteus* ssp. and *Pseudomonas* ssp. were recovered from dogs with skin infection (Santoro, *et al.*, 2015; Beco, *et al.*, 2013; Arais, *et al.*, 2016).

The Gram-positive bacteria isolated from dog skin showed susceptibility to all the antibiotics tested, including gentamicin, a common drug used in therapy. Nevertheless, the Gram-negative group was resistant to most beta-lactams but sensitive to gentamicin. The profile of resistance to the antibiotics tested in this work was higher for amoxicillin, followed by erythromycin, ampicillin, penicillin, gentamicin, tetracycline, ceftriaxone, cefaclor, ciprofloxacin, and ofloxacin. The species *E. hormaechei*, *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. cowani* and *K. pneumoniae* presented resistance to more than one antibiotic making the treatment of the disease more challenging to veterinary practitioners. Multidrug resistant bacteria (69.83%) were isolated from canine pyoderma in the state of São Paulo of which 38.35% were identified as *Staphylococcus* spp., 32.04% as *E. coli*, 18.93% as

Proteus spp., 6,31% as *Klebsiella* spp. *Pseudomonas* spp. 3,40%, and 0,97% *Enterobacter* spp. (Menezes, *et al.* 2021).

In conclusion, this is the first work that tested a topical formulation prepared with the HF of *E. astringens* and evaluated its *in vitro* activity. Further studies concerning stability and toxicity of the natural products present in the CE or HF should be performed. The strong antibacterial activity of the CE and HF against Gram-positive bacteria reveal the potential of *E. astringens* as source of metabolites that can be used in the preparation of topical herbal ointments that may become strong allies in the treatment of dog's skin problems.

References

- Agrizzi A.P. (2021). Bioprospection of natural products with anticholinesterase and antibacterial activities from plant extracts from the Atlantic Forest. 70 f. Thesis (Doctorate in Applied Biochemistry) - Federal University of Viçosa, Viçosa. 2021.
- Arais L.R., Barbosa A.V., Carvalho C.A., Cerqueira A.M. (2016). Antimicrobial Resistance, Integron Carriage, And Gyra And Gyrb Mutations In *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Dogs With Otitis Externa And Pyoderma In Brazil. *Vet Dermatol*, [https://doi: 10.1111/vde.12290](https://doi.org/10.1111/vde.12290).
- Bartolomeu A.C.D. (2015). Estudo Químico de *Eugenia punicifolia* (KUNTH) DC. Visando A Descoberta de Inibidores da α -glicosidase. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.
- Beco L., Guaguere E., Lorente Mendez C., Noli C., Nuttall T., Vroom M. (2013). Suggested Guidelines For Using Systemic Antimicrobials In Bacterial Skin Infections: Part 2-- Antimicrobial Choice, Treatment Regimens And Compliance. *Vet Rec*, [https://doi: 10.1136/vr.101070](https://doi.org/10.1136/vr.101070).

- Cole A.L., Cosgrove Sweeney Y., Lasseter A.G., Gray J.M., Beavis A.C., Chong C.F., Hajheidari S.V., Beyene A., Patton D.L., Cole A.M. (2018). Avaliação Do Macaco-Rabo-Deporco (Macaca Nemestrina) Como Modelo De Transporte Nasal Humano De *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, <https://doi: 10.1128/IAI.00043-18>.
- Costa J.S., Cruz E.N.S., Setzer W.N., Silva J.K.R., Maia J.G.S., Figueiredo P.L.B. (2020). "Óleos Essenciais das Espécies Brasileiras de *Eugenia* e *Syzygium* e Suas Atividades Biológicas". *Biomol*, <https://doi.org/10.3390/biom10081155>.
- de Menezes M.P., Borzi M.M., Ruaro M.A., Cardozo M.V., Rabelo R.C., Verbisck N.V., Moraes P.C. (2022). Multidrug-Resistant Bacteria Isolated From Surgical Site of Dogs, Surgeon's Hands and Operating Room in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil. *Top Companion Anim Med*, <https://doi: 10.1016/j.tcam.2022.100638>.
- de Menezes M.P., Facin A.C., Cardozo M.V., Costa M.T., Moraes P.C. (2021). Evaluation of the Resistance Profile of Bacteria Obtained From Infected Sites of Dogs in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil: A Retrospective Study. *Top Companion Anim Med*. Epub, <https://doi: 10.1016/j.tcam.2020.100489>.
- de Souza A.M., de Oliveira C.F., de Oliveira V.B., Betim F.C.M., Miguel O.G., Miguel M.D. (2018). Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species - A Review. *Planta Med*, <https://doi: 10.1055/a-0656-7262>.
- Dégi J., Herman V., Igna V., Dégi D.M., Hulea A., Muselin F., Cristina R.T. (2022). Antibacterial Activity of Romanian Propolis Against *Staphylococcus aureus* Isolated from Dogs with Superficial Pyoderma: In Vitro Test. *Vet Sci*, <https://doi: 10.3390/vetsci9060299>.
- Domalaon R., Idowu T., Zhanel G.G., Schweizer F. (2018). Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *Clin Microbiol Rev*, <https://doi:10.1128/CMR.00077-17>.

- Drougka E., Foka A., Koutinas C.K., Jelastopulu E., Giormezis N., Farmaki O., Sarrou S., Anastassiou E.D., Petinaki E., Spiliopoulou I. (2016). Interspecies Spread Of *Staphylococcus aureus* Clones Among Companion Animals And Human Close Contacts In A Veterinary Teaching Hospital. A Cross-Sectional Study In Greece. *Prev. Vet. Med*, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.02.004>.
- Ellwanger J.H., Nobre C.A., Chies J.A.B. (2023). Brazilian Biodiversity as a Source of Power and Sustainable Development: A Neglected Opportunity. *Sustainability*, <https://doi.org/10.3390/su15010482>.
- Farghali H.A., AbdElKader N.A., AbuBakr H.O., Aljuaydi S.H., Khattab M.S., Elhelw R., Elhariri M. (2019). Ação Antimicrobiana Do Plasma Rico Em Plaquetas Autólogo Em Feridas Cutâneas Infectadas Por MRSA Em Cães. *Sci Rep*, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48657-5>.
- Fitz J., Fürst-Jucker J., Wegener T., Saller R., Reichling J. (2002). Phytotherapy Of Chronic Dermatitis And Pruritus Of Dogs With A Topical Preparation Containing Tea Tree Oil (Bogaskin). *Schweiz Arch Tierheilkd*, <https://doi:10.1024/0036-7281.144.5.223>.
- Fouda A.M.A., Abdel-Saeed H., Abdelgayed S.S., Abdou O.M. (2021). Clinical, Haemato Biochemical, And Histopathological Studies On Some Dermopathies In Dogs. *Adv. Anim. Vet. Sci*, <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.1.94.102>.
- Gajdács M. (2019). The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics Basel*, <http://doi:10.3390/antibiotics8020052>.
- Gobbo-Neto L., Lopes N.P. (2007). Plantas Medicinais: Fatores De Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova*, v.30, n.2, p. 374-381.
- González-Martín M., Corbera J.A., Suárez-Bonnet A., Tejedor-Junco M.T. (2020). Virulence Factors In Coagulase-Positive Staphylococci Of Veterinary Interest Other Than *Staphylococcus aureus*. *Vet Q*, <https://doi:10.1080/01652176.2020.1748253>.

- Greenway D.L.A., Dyke K.G.H. (1979). Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol, <https://doi:10.1099/00221287-115-1-233>.
- Haag A.F., Fitzgerald J.R., Penadés J.R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. Microbiol Spectrum, <https://doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>.
- Jumina J., Lavendi W., Singgih T., Triono S., Steven K.Y., Koketsu M. (2019). Preparation of Monoacylglycerol Derivatives From Indonesian Edible Oil And Their Antimicrobial Assay Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. SciRep, <https://doi:10.1038/s41598-019-47373-4>.
- Kim Y.G., Lee J.H., Park J.G., Lee J. (2020). Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* Biofilms By Centipede Oil Andlinoleic Acid. Biofouling, <https://doi:10.1080/08927014.2020.1730333>.
- Koyama S., Purk A., Kaur M., Soini H.A., Novotny M.V., Davis K. (2019) Beta-caryophyllene Enhances Wound Healing Through Multiple Routes. PLoS ONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216104>
- Lai C.H., Ma Y.C., Shia W.Y., Hsieh Y.L., Wang C.M. (2022). Risk Factors for Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* Species Isolated from Dogs with Superficial Pyoderma and Their Owners. Vet. Sci, <https://doi.org/10.3390/vetsci9070306>.
- Layne E.A. (2019). Can Pyoderma in Dogs be Treated With Fewer Antibiotics? Vet Rec, <https://doi:10.1136/vr.l4018>.
- Loeffler A., Lloyd D.H. (2018). What Has Changed In Canine Pyoderma? A Narrative Review. The Vet J, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.04.002>.
- Lucas E.J., Holst B., Sobral M., Mazine F.F., Lughadha N., Proença E.M., Costa E.C.B., Vasconcelos I.R. (2019). A New Subtribal Classification Of Tribe Myrteae

- (Myrtaceae). Syst Bot, <https://doi.org/10.1600/036364419X15620113920608>.
- Machado B.A., Machado R.F.M., Picoli U.S. (2017). An Investigation Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) In Domestic And Shelter Dogs In Montenegro. Rev Bras Saúde Prod Anim, <https://doi:10.1590/s1519-99402017000400005>.
- Nogueira S.A.C., Morais S.M., Souza E.B., Albuquerque M.R.J.R., Santos H.S., Cavalcante C.S.P., Sousa H.A., Fontenelle R.O.S. (2020). Antifungal and Antioxidant Activities of Vernonia Chalybaea Mart. ex DC. Essential Oil and their Major Constituent β -caryophyllene. Braz A of Biol Technol, <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190177>.
- Rich M. (2005). Staphylococci In Animals: Prevalence, Identification And Antimicrobial Susceptibility, With An Emphasis On Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Brit J Biomed Sci, <https://doi:10.1080/09674845.2005.11732694>.
- Rossato A.M., Primon-Barros M., Rocha L.D.L., Reiter K.C., Dias C.A.G., d'Azevedo P.A. (2020). Resistance Profile To Antimicrobials Agents In Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated From Hospitals In South Brazil Between 2014-2019. Rev Soc Bras Med Trop, <https://doi: 10.1590/0037-8682-0431-2020>.
- Sakina A., Mandial R.K. (2011). Prevalence And Clinical Observations Of Mange In Dogs. Vet. Pract.
- Santiago-Carvalho I., Simão V.B.L.T., Calixto D.S., Albuquerque C.T., Konno P.U.T., Salgado M.R., Muzitano F.M., Pinto C.S., Lasunskiaia E. (2022). Antitubercular And Immunomodulatory Activities Of *Eugenia astringens* N-Hexane Fraction. Phytomed Plus, <https://doi:10.1016/j.phyplu.2022.100236>.
- Santoro D., Marsella R., Pucheu-Haston C.M., Eisenschenk M.N., Nuttall T., Bizikova P. (2015). Review: Pathogenesis Of Canine Atopic Dermatitis: Skin Barrier And Host-

- Micro-Organism Interaction. *Vet Dermatol*, [https://doi: 10.1111/vde.12197](https://doi:10.1111/vde.12197).
- Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K. (2007). Reclassificação De Cepas De *Staphylococcus intermedius* Fenotipicamente Identificadas. *J Microbiol Clin*, <https://doi:10.1128/JCM.00360-07>.
- Sobral M., Proença C., Souza M., Mazine F., Lucas, E. (2015). Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25824>>. Acessado em 02 novembro de 2021.
- Toledo A.G., Souza J.G. de L. de, Silva J.P.B. da, Favreto W.A.J., Costa, W.F. da and Pinto, F.G. da S. (2020). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucrata* DC. *Bioscience J*, [https://doi 10.14393/BJ-v36n2a2020-48096](https://doi:10.14393/BJ-v36n2a2020-48096).
- Viegas F.M., Santana J.A., Silva B.A., Xavier R.G.C., Bonisson C.T., Câmara J.L.S., Rennó M.C., Cunha J.L.R., Figueiredo H.C.P., Lobato F.C.F., Silva R.O.S. (2022). Ocorrência E Caracterização De *Staphylococcus spp.* Resistente À Meticilina Em Cães Doentes No Brasil. *PLoS ONE*, [https://doi: 10.1371/journal.pone.0269422](https://doi:10.1371/journal.pone.0269422).
- Wan Salleh W.M., Ahmad F., Yen K.H. Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun*.

Acknowledgements

The authors would like to thank Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing laboratory facilities, CAPES, CNPq and FAPEMIG for financial support during this research.

Funding

The research project was funded by CAPES, CNPq and FAPEMIG. Quaresma LN was financed by a grant from CAPES-Brasil.

Supplementary Material

Table 1: Primers used for identification and characterization of isolates.

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Species / Gene	PCR Program
nuc intr	CATGTCATATTATTGCGAATGA AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC	430	<i>S. intermedius</i>	1. 95°C for 2 min. Steps 2–4 35 x: 2. 95°C for 30 sec, 3. 56°C for 35 sec, 4. 72°C for 60 sec, 5. 72°C for 2 min.
nuc aur	TCGCTTGCTATGATTGTGG GCCAATGTTCTACCATAGC	359	<i>S. aureus</i>	1. 95°C for 2 min. Steps 2–4 35 x: 2. 95°C for 30 sec, 3. 56°C for 35 sec, 4. 72°C for 60 sec, 5. 72°C for 2 min.
MEC	CCACTTCATATCTTGTAACG TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162	Gene <i>mecA</i>	1. 94°C for 5 min. Steps 2–4 32 x: 2. 94°C for 50 sec, 3. 58°C for 50 sec, 4. 72°C for 50 sec, 5. 72°C for 10 min.

Table 2: Biochemical characterization of samples collected from dogs with skin infections at the Uberaba Veterinary Hospital, Uberaba/MG in 2022 by biochemical and molecular tests.

Sample	Species (Bruker MALDI Biotyper)	Coa	Cat	VP	Man	Nuc intr	Nuc aur	MEC
Uniube 01	<i>Staphylococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-
Uniube 03	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	-	-
Uniube 05	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+	+	-	-	-	-
Uniube 07	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	-	-	-	-
Uniube 08	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-	+	-
Uniube 09	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-	+	-
Uniube 10	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	NR	NR	-
Uniube 11	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	NR	NR	-
Uniube 12	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	+	-	-	-	-
Uniube 13	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	+	+	+	+	-	-	-
Uniube 14	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	-	NR	NR	-

Uniube 15	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	-	NR	NR	-
Uniube 16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 17	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 18	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 19	<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 20	<i>Staphylococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	-	-
Uniube 21	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-
Uniube 22	<i>Kosakonia cowani</i>	-	+	+	-	NR	NR	-
Uniube 23	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 24	<i>Kosakonia cowani</i>	-	+	+	-	NR	NR	-
Uniube 25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	NR	NR	-
Uniube 26	<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 27	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	NR	NR	-
Uniube 28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	NR	NR	-

Coa: coagulase, Cat: catalase, VP: Voges-Proskauer, Man: mannitol, intr: primer for *Staphylococcus intermedius* species, nuc aur: primer for *Staphylococcus aureus* species, MEC: primer for *mecA* gene. NR: not performed.



Figure 1: DNA amplification of Gram-positive isolates using the *mecA* primer. Marker: 100 bp DNA Ladder; + : positive control (MRSA USA 300); Control - : negative control (*S. aureus* ATCC29213); 1: *Staphylococcus intermedius* (01); 3: *Staphylococcus pseudintermedius* (03); 8: *Staphylococcus aureus* (08); 9: *Staphylococcus aureus* (09); 12: *Enterococcus faecium* (12); 13: *Staphylococcus pseudintermedius* (13); 20: *Staphylococcus intermedius* (20); 21: *Streptococcus dysgalactiae* (21).

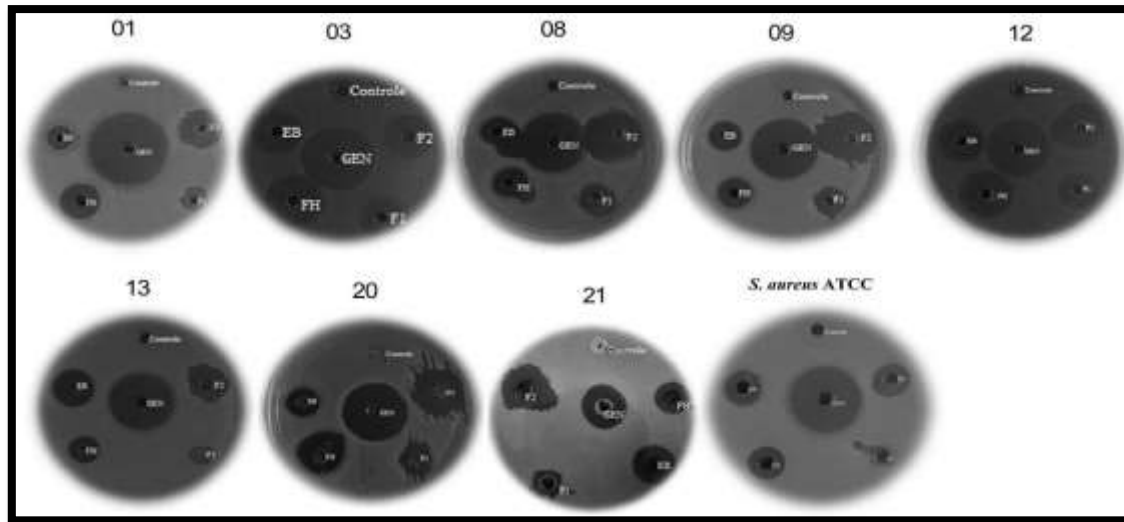


Figure 2: Photographs of antibacterial activity assay plates on Gram-positive bacteria. 01: *Staphylococcus intermedius* (01); 03: *Staphylococcus pseudintermedius* (03); 08: *Staphylococcus aureus* (08); 09: *Staphylococcus aureus* (09); 12: *Enterococcus faecium* (12); 13: *Staphylococcus pseudintermedius* (13); 20: *Staphylococcus intermedius* (20); 21: *Streptococcus dysgalactiae* (21); GEN: Gentamicin; CE: *E. astringens* Crude Extract; HF: *E. astringens* hexane fraction; F1: Formulation at a concentration of 0.5%; F2: Formulation at 5% concentration.