

A INFLUÊNCIA DA VITAMINA D NO SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA RELAÇÃO COM AS DOENÇAS AUTOIMUNES: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Analice Melo de Oliveira¹;

<http://lattes.cnpq.br/6917958547984624>

Amanda Olinda Oliveira²;

<https://orcid.org/0009-0000-4790-6609>

Andrezza Cristina Moura dos Santos³;

<http://lattes.cnpq.br/9453061133052497>

Cicera Laura Roque Paulo⁴;

<https://orcid.org/0000-0001-5873-5892>

Cicero Leonardo de Moraes Pinto⁵;

<http://lattes.cnpq.br/6523814006214402>

Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues⁶;

<https://orcid.org/0000-0003-3901-6758>

Francivânia Vieira da Silva⁷;

Glaucia Maria França da Silva⁸;

Iarny Silvestre de Alencar⁹;

<https://orcid.org/0009-0000-4624-5570>

Iasminy Macedo¹⁰;

<https://orcid.org/0000-0003-3216-2330>

João Arthur de Oliveira Borges¹¹;

<http://lattes.cnpq.br/1413085690464056>

Júlio César Silva¹²;

<https://orcid.org/0000-0003-3602-3776>

Lívia Pereira Ferreira¹³;

<https://orcid.org/0000-0002-7822-9855>

Olivia Caroline Maia de Moura¹⁴;

<http://lattes.cnpq.br/3026050474109876>

Priscilla Ramos Freitas¹⁵;

<https://orcid.org/0000-0003-4047-4836>

Raimundo Luiz Silva Pereira¹⁶;

<https://orcid.org/0000-0001-8205-7120>

Rakel Olinda Macedo da Silva¹⁷;

<http://lattes.cnpq.br/0146961314135080>

Sara Kathelyn Moreira de Alencar¹⁸;

<http://lattes.cnpq.br/8078789182773151>

Vinícius Bezerra de Freitas Pereira¹⁹;

<http://lattes.cnpq.br/1452926939953353>

Yasmin Thially Bento da Silva Vitorino²⁰;

<http://lattes.cnpq.br/7810885792507382>

Yedda Maria Lobo Soares de Matos²¹.

<https://orcid.org/0000-0002-1837-2844>

RESUMO: O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação antibiótica e modificadora do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Tea Tree frente a bactérias multirresistentes. Será utilizado o Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMA) comercializado de origem Australiana da marca Via Aroma. Em relação aos antibióticos que serão utilizados para as testagens serão obtidos da Sigma Aldrich, os quais serão utilizados eritromicina, gentamicina e norfloxacina. As seguintes cepas serão utilizadas: *Staphylococcus aureus* 10, e *Escherichia coli* 06. O OEMa terá concentração de 1024 µg/mL. Serão repicadas cepas bacterianas em placas de Petri contendo meio de cultura Heart Infusion Agar (HIA) e incubados a 37°C/24 horas. Essas cepas serão diluídas com salina, para a preparação do inóculo bacteriano, até atingir concentração de 0.5 na escala de McFarland. Para análise da atividade moduladora de antibióticos o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* deve ser utilizado em concentração subinibitória (CIM/8). Os resultados para as análises serão expressos como média geométrica e desvio padrão, analisados por análise de variância ANOVA seguida de teste post hoc de Bonferroni usando o software GraphPad Prism 9.0. Com a ampla aplicação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* espera-se que o presente estudo tenha resultados significativos frente a sua aplicabilidade em bactérias multirresistentes assim propiciando para os pesquisadores um norte frente as pesquisas realizadas para produção de novos antibióticos para evitar a evolução de resistência aos antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial. Resistência bacteriana. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*.

THE INFLUENCE OF VITAMIN D ON THE IMMUNE SYSTEM AND ITS RELATIONSHIP WITH AUTOIMMUNE DISEASES: AN INTEGRATIVE REVIEW

ABSTRACT: The present study aims to evaluate the antibiotic and modifying action of Melaleuca alternifolia Tea Tree essential oil against multiresistant bacteria. The Essential Oil of Melaleuca alternifolia (OEMa) sold in Australia by the Via Aroma brand will be used. Regarding the antibiotics that will be used for testing, they will be obtained from Sigma Aldrich, which will be used as erythromycin, gentamicin and norfloxacin. The following strains will be used: Staphylococcus aureus 10, and Escherichia coli 06. OEMa will have a concentration of 1024 µg/mL. Bacterial strains will be cultured in Petri dishes containing Heart Infusion Agar (HIA) culture medium and incubated at 37°C for 24 hours. These strains will be diluted with saline to prepare the bacterial inoculum until reaching a concentration of 0.5 on the McFarland scale. To analyze the modulatory activity of antibiotics, Melaleuca alternifolia essential oil should be used at a subinhibitory concentration (MIC/8). The results for the analyses will be expressed as geometric mean and standard deviation, analyzed by ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test using GraphPad Prism 9.0 software. With the wide application of Melaleuca alternifolia essential oil, it is expected that the present study will have significant results regarding its applicability in multiresistant bacteria, thus providing researchers with a guide for research carried out to produce new antibiotics to prevent the evolution of antibiotic resistance.

KEY-WORDS: Essential oil. Bacterial resistance. Staphylococcus aureus. Escherichia coli.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são desencadeadas por microrganismos patogênicos que invadem o tecido e provocam diversas desordens no hospedeiro. Nesse contexto, as infecções são consideradas um dos graves problemas de saúde pública, em decorrência do aumento da resistência bacteriana a antibióticos utilizados na prática clínica, fator que resulta em um difícil tratamento do indivíduo acometido (Guimarães et al., 2017).

Adicionalmente, as infecções bacterianas são uma preocupação a nível global devido ao seu elevado índice de morbidade e mortalidade. Fator que somado a resistência antibacteriana desenvolve complicações ao paciente acometido pela infecção provocada pelo patógeno, o que resulta a um maior tempo de internação, tornando o tratamento mais longo e exposição maior aos fármacos possibilitando o risco de desencadear efeitos adversos ao uso das medicações levando ao óbito (Brasil, 2022).

No período da pandemia do Coronavírus, houve o aumento de mecanismos de resistência adquiridos por bactérias tem se tornado comuns. O que decorreu por conta de um tratamento excessivo por parte da população para tentar impedir a contaminação do vírus, ou por parte dos profissionais, por conta dos casos de internações. Promoveu as

bactérias o ambiente propício para o seu desenvolvimento e de novas formas de resistência aos fármacos utilizados (Leal et al., 2021).

Dentre as principais bactérias que desenvolvem perfis de resistência aos fármacos estão a espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e a *Escherichia Coli* (*E. coli*), em que *S. Aureus* apresenta uma resistência maior a Meticilina (Gabriela et al., 2020). Já em relação a espécie *E.coli* o seu principal mecanismo de resistência está associado com a produção de enzimas inativadoras, as β -lactamases que apresentam atividade restrita de degradação estando associado as penicilinas lábeis (Andrade et al., 2016).

Com o crescente desenvolvimento de novos mecanismos adquiridos pelos microrganismos, se torna imprescindível associar os tratamentos já existentes a novas fontes, juntando o conhecimento milenar sobre as plantas medicinais para a descobertas de novas alternativas para ajudar a diminuir ou inibir essa resistência bacteriana (Ferreira et al., 2022).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para numerosas aplicações na medicina popular, dentre elas, a produção de antissépticos tópicos, podendo ser utilizados em infecções provocadas por bactérias, fungos e vírus (Silva; Mariana Oliveira Santana; Silva, 2023).

Um dos óleos que se destacam no uso antisséptico e anti-inflamatório principalmente no combate a infecções cutâneas é o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, sua grande procura teve início na Segunda Guerra Mundial em que era muito utilizado nos doentes e feridos, mas teve uma cessação do seu uso logo após a descoberta da penicilina e logo volta a ser aplicado novamente na década de 70 após a resistência adquirida pelos patógenos (Oliveira et al., 2015).

HIPÓTESE

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMA) pode apresentar uma importante atividade bacteriana frente a bactérias multiresistentes. O OEMa apresenta uma ampla aplicabilidade descrita na literatura possuindo ação fungicida, bactericida e antimicrobiana, utilizada na medicina tradicional há muitas décadas. É possível que o óleo comercializado também tenha atividade direta ou modificadora da ação de antibiótico frente a bactérias multirresistente podendo sua utilização atuar na problemática da resistência bacteriana.

REVISÃO DE LITERATURA

Infecções bacterianas

O processo infeccioso pode ocorrer por meio de diferentes patógenos, fungos, bactérias, vírus e protozoários, que estão presentes em diferentes ambientes. Nesse contexto, podem ser destacadas as infecções causadas por bactérias, considerando

que estas são as principais responsáveis pelo grande número de infecções atualmente, principalmente em ambientes com um grande número de patógenos, como o ambiente hospitalar (Rodrigues et al., 2022).

As infecções provocadas por bactérias são consideradas um grave problema de saúde pública, visto que estas influenciam diretamente nas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Estas são principalmente desencadeadas no ambiente hospitalar resultando em um aumento do isolamento de cepas resistentes as suas formas de tratamento (Veloso; Campelo, 2017).

As infecções hospitalares podem ocorrer tanto de forma cruzada, que acontece por meio do paciente acometido pela doença transmitindo para os demais pacientes que estejam no âmbito hospitalar, como também acontecer de forma que haja a contaminação dos profissionais que estejam no atendimento (Shafer et al., 2019).

Levando em consideração os crescentes números de infecções em decorrência de bactérias, a ANVISA (2020) mostra que a resistência bacteriana a antibióticos chega a provocar cerca de 700 mil mortes por ano em todo o mundo, e ainda aponta que nos próximos anos esse valor pode aumentar, podendo chegar a 10 milhões de mortes.

Entre as bactérias que causam infecções em humanos se destacam tanto as Gram positivas como as Gram negativas, podendo estas infectar diferentes áreas do corpo humano, e usando como porta de entrada a pele, mucosas e regiões expostas devido aos dispositivos invasivos, como catéter. As infecções dependem da virulência e resistência do patógeno, alguns microrganismos já são provenientes da microbiota local do organismo desenvolvendo um importante papel para mantê-lo saudável, o problema está quando migra para outras regiões que não seja proveniente da microbiota local ou quando passa a estar presente em grande quantidade provocando assim uma desordem (MSF, 2020).

Resistência bacteriana

Desde os primórdios, os seres humanos convivem diariamente com bactérias, porém, as bactérias patogênicas apresentam um problema de resistência bacteriana, decorrente do uso inadequado e prolongado de antibióticos, além da não adesão ao tratamento prescrito pelos profissionais de saúde por parte dos pacientes que necessitam do tratamento (Carvalho et al., 2021; Vasconcelos et al., 2017).

Além desses, outro fator associado ao surgimento de casos de resistência bacteriana está também a pandemia do coronavírus, na qual tem havido um uso excessivo de medicamentos sem prescrição médica, tendo como base informações não científicas que não comprovam sua eficácia real do antibiótico utilizado. Como resultado dessas informações, a população passou a utilizar antibióticos, muitas vezes de amplo espectro, de maneira irregular, o que possivelmente ampliou o desenvolvimento de casos resistência bacteriana, na tentativa de tratar sintomas causados pela infecção do SARS-CoV-2 e até

mesmo evitar sua contaminação (Freire; Junior, 2022).

Esse mecanismo de resistência pode ocorrer devido a mutações genéticas ou à transferência de informações entre as bactérias, por meio do plasmídeo, através do processo de conjugação. Neste processo, as bactérias adquirem a capacidade de se manter em crescimento no ambiente da infecção e continuar se proliferando (Lima; Benjamim; Santos, 2017).

O aumento constante da resistência, principalmente em bactérias que possuem um grande potencial para causar infecções graves, tem provocado preocupações e criado a necessidade de desenvolver novas classes de antibióticos e medicamentos para combater esses patógenos (Brito; Cordeiro, 2012). As infecções causadas por microrganismos multirresistentes têm se tornando um problema mundial, devido ao crescente aumento de infecções causadas por essas bactérias resultando em maiores despesas de tratamento e morbimortalidade nos pacientes afetados (Pereira et al., 2015).

Segundo Monteiro et al (2020), além do uso incorreto de antibióticos, o consumo frequente de alimentos tratados com antimicrobianos para controlar microrganismos também tem contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes. Os antibióticos também tem sido amplamente utilizados em rações de frangos de corte, galinhas poedeiras e em suínos, com o intuito de melhorar a saúde do trato gastrointestinal desde a década de 50. Entretanto, devido ao aparecimento dos microrganismos resistentes aos mesmos e a possibilidade do surgimento desse problema devido ao uso indiscriminado dessas moléculas, outros aditivos estão sendo usados em substituição. Os prebióticos, probióticos e simbióticos se destacando entre os aditivos equilibradores da microbiota, pois eles podem ser utilizados melhorando as condições luminiais do trato gastrointestinal, sem gerar resistência microbiana, podendo promover ganho em desempenho e em melhoria de qualidade de produtos avícolas (Loureiro et al., 2016; Reis; Vieites, 2019).

Muitas bactérias podem causar mecanismos de resistências, entre estas, as espécies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) são uma das principais espécies capazes de desenvolver mecanismos de resistência estudadas (Borges; Guimarães, 2023). Dados epidemiológicos mostram que *Staphylococcus aureus* tem uma grande incidência em casos de infecção hospitalar e possui uma grande capacidade de adaptação e de resistência, alguns fatores pode promover sua patogenicidade, como lesões na pele, alimentos contaminados e baixa imunidade do indivíduo acometido como ocorre em ambientes hospitalares (Mello et al., 2020).

Em relação a espécie *S. aureus*, as formas de resistência desenvolvidas nestas bactérias são desencadeadas por meio de mutações em genes específicos, ou são obtidos através de genes de resistência de outras bactérias transportados através do plasmídeo (Cussolim et al., 2021). Além destes, também pode ser citados outras formas de mecanismos de resistências incluindo a redução das concentrações de antibióticos na bactéria, ocorrendo pela baixa penetração como também pelo efluxo desencadeado por

proteínas transmembrana, evitando sua chegada até o alvo e inativação do antibiótico por hidrólise ou até mesmo pela modificação enzimática tornando a terapêutica não funcional (Tintino et al., 2018).

Já em relação a espécie *Escherichia coli* bactéria Gram negativa também pertencente a flora bacteriana humana assim como *S. aureus*, estas cepas apresentam diferentes fatores de virulência o que permite que o microrganismo supere as defesas imunológicas do hospedeiro. Esses fatores de virulência incluem a adesina, fatores de aquisição do ferro e também as toxinas, plasmídeos e outros elementos genéticos moveis (Sarowska et al., 2019). A principal forma de *Escherichia coli* adquirir resistência é através da transferência horizontal de genes utilizando a: transformação, transdução e conjugação do material genético ocorrendo respectivamente pela fragmentação do DNA encontrado no ambiente, transferência do material genético através de bacteriófagos e através de pilus de conjugação genica. Assim o material é transferido diretamente de uma célula doadora para uma receptora (Abe; Nomura; Suzuki, 2020).

Staphylococcus Aureus

A espécie *Staphylococcus aureus* é classificada como uma bactéria Gram positiva presente na microbiota natural da pele, colonizando também as mucosas nasais. Mesmo esta sendo uma bactéria comensal, quando a barreira da pele é prejudicada interferindo na sua integridade, passa a ser uma porta de entrada para o microrganismo adentrar no organismo, deixando de ser uma bactéria comensal e passando a ser patogênica. Devido a esse fator é comum causar sintomas de infecções na pele, mas quando ingeridas através de alimentos contaminados podem provocar infecções gastrointestinais e podem chegar a ser letal para pessoas que apresentam sua imunidade diminuída (Obaidat; Stringer, 2019).

Esse microrganismo tem um potencial de adquirir resistência com maior facilidade como a resistência ao fármaco meticilina (MRSA) que atualmente é um grande problema de saúde pública tendo uma grande taxa de mortalidade (Katsarou et al., 2019).

A meticilina é um fármaco criado logo após a penicilina como uma forma de evitar a resistência que a espécie *S. aureus* já possuía a penicilina. Após ser aplicada na clínica por volta de 1959 a meticilina controlou a infecção provocada por esta bactéria, no entanto no ano de 1961 o cientista britânico Jevons relatou o isolamento de uma cepa de MRSA, em que esta resistência foi produzida por um gene que codifica a proteína de ligação a penicilina 2a ou 2' (PBP2a ou PBP2') (*mecA*) que foi integrada no elemento cromossômico (SCCmec) de cepas de *S. aureus* sensível à meticilina (Jokinen et al., 2017; Schulte e Munson., 2019).

As taxas de resistência da infecção por *S. aureus* e pelas cepas multirresistentes estão aumentando, dificultando todo o tratamento clínico. O mecanismo de resistência endógena inclui principalmente três aspectos que seria a permeabilidade da membrana

externa, sistema de efluxo e a produção excessiva da β -lactamase (GUO et al., 2020).

Quando a permeabilidade da membrana é reduzida todo o metabolismo energético da bactéria acaba sendo afetado, acarretando em uma absorção menor do medicamento levando assim a resistência, o que ocorre na resistência aos aminoglicosídeos, devido à baixa permeabilidade da membrana enfraquecendo a ingestão do medicamento (Anuj et al., 2019).

Já relacionado ao sistema de efluxo ele é o modulador chave para resistência do *S. aureus* podendo ser ativo por diferentes bombas de efluxos, às QacA, NorA e Smr, onde a QacA é um fator importante no MSRA (Zárate et al., 2019). O efluxo ativo onde passa o fármaco do meio intracelular para o meio extracelular gera resistência a diferentes antimicrobianos (Costa; Silva Junior., 2017).

Tanto esses fatores da permeabilidade da membrana e do sistema de efluxo acabam tendo uma grande influência na resistência aos antimicrobianos e quando se fala na β -lactamase não é muito diferente, tanto Staphylococcus aureus resistente à meticilina e Escherichia coli produtora de b-lactamases de largo espectro são resistentes à maioria dos b-lactâmicos, tendo grande prevalência nos últimos anos (Domingues, 2020).

Escherichia Coli

A espécie *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa pertencente a ordem das Enterobacteriales, anaeróbia facultativa podendo possuir flagelos ou não. Esse microrganismo acomete principalmente o trato urinário e intestinal sendo algumas cepas natural da microbiota intestinal, portanto normalmente não é uma bactéria patogênica, entretanto existem fatores que podem contribuir para a sua virulência e assim provocar infecções bem como o caso de alimentos e água que tem a presente *E. coli*, sendo assim indicativo de contaminação (Tortora, 2017).

Existem diferentes subtipos de espécie *E. coli* sendo classificadas de acordo com o sítio da infecção, como enteropatogênicas (EPEC) e as patogênicas extra intestinais (ExPEC). A EPEC é do tipo diarreiogênica, é reconhecida como um importante agente causador de diarreia principalmente em crianças de países em desenvolvimento que pode ser diferenciada pelos fatores de virulências como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas. Dentre os vários tipos da espécie considerada enteropatogênica é possível encontrar: *E. coli enterotoxigênica (ETEC)*, *E. coli enteroinvasora (EIEC)*, *E. coli enterohemorrágica (EHEC)*, *E. coli produtora da toxina de Shiga (STEC)*, *E. coli enteroagregativa (EAEC)* e *E. coli aderente difusa (DAEC)* (Kaur e Dudeja, 2023; Souza et al., 2016).

O subtipo ExPEC apresenta patogenicidade quando atinge sítios extra intestinais nos seres humanos, acometendo principalmente o trato urinário, sistema nervoso central e o sistema sanguíneo. Porém esses não são os únicos sítios a serem afetados, qualquer

parte do organismo pode ser atingido (Silva R., 2022). Esse subtipo não apresenta um determinante específico de virulência, os estudos epidemiológicos mostram que existem mais de 50 genes que estão associados as patogenicidades de forma extraintestinal (Johnson; Russo, 2018).

Produtos naturais e atividade farmacológica

Com o crescente aumento de casos de resistência bacteriana, novos estudos estão sendo realizados acerca dos produtos naturais para o combate as infecções como uma forma emergente de encontrar novos antibióticos sem potencial resistência bacteriana (Newman; Cragg, 2020).

Como aponta Binhara (2021) os produtos naturais vêm sendo utilizados de maneira constante nos últimos anos como forma de combate as bactérias e como uma maneira sustentável, por ter baixa ou nula ação sobre o meio ambiente. Até mesmo na fermentação alcoólica os produtos naturais vêm sendo empregados como forma de evitar contaminação e fermentação indesejada por proliferação bacteriana não seletiva, que acaba trazendo prejuízos a fermentação ideal (Kronka; Mocheuti, 2023).

Diversos estudos relatam a ação antimicrobiana de óleos essenciais extraído de plantas, seus metabolitos e demais componentes presentes (Falah, 2019; Porter; Morey; Monu, 2020). Os óleos essenciais (OE) como compostos naturais tem uma significativa ação antioxidante e antimicrobiana, com baixo custo, menos toxicidade além de apresentar uma maior acessibilidade (Atarés; Chiralt, 2016; Oliveira et al., 2022).

Diversos óleos essenciais possuem diferentes propriedades biológicas, como atividades anti-inflamatórias, sedativas, digestivas, antimicrobianas, antivirais ou antioxidantes, apresentando seu uso para fins inseticidas, medicinais e com etológicos (Loose; Pilger; Wagenlehner, 2020). Um dos óleos bastante utilizado é o de *Melaleuca alternifolia*, com ação inibitória de bactérias, inclusive empregada no uso de bactérias resistentes aos antibióticos. Entretanto é aplicada e eficaz em bactérias isoladas que propicia infecção cutânea como as bactérias do gênero *Staphylococcus* (Gioppo; Zancanaro; Bellaver, 2019).

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* TEA TREE

A espécie *Melaleuca alternifolia* é uma planta nativa da Austrália, é conhecida popularmente como árvore do chá. O óleo essencial extraído da planta é amplamente utilizado na medicina popular com finalidade de ação antifúngica, antibacteriana e antiviral. Segundos estudos com o óleo essencial da espécie, as propriedades antifúngicas e bacterianas dar-se principalmente ao composto terpinen-4-ol, um monoterpeno, que é o

principal componente do óleo, sendo o principal mediador da atividade do TTO in vitro e in vivo (Felipe et al., 2018).

Observa-se na literatura uma ação antiacne, melhora de inflamação em dermatites e problemas bucais como a dor de dente e halitose (De Groot Eschmidt, 2016). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) também é bastante aplicado na odontologia, tendo efeitos bactericidas e bacteriostáticos contra os periodontopatógenos de maior prevalência, *em que* estudos clínicos comprovaram a eficácia havendo diminuição da inflamação gengival, propriedades antioxidantes benéficas para o hospedeiro e redução das respostas imunoinflamatórias aos patógenos (Casarin et al., 2018).

Além disso no estudo realizado por Oliveira et al (2022) demonstrou que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* teve ação de sensibilidade para a bactéria *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, com maior atividade frente a espécie de bactéria Gram negativa. Dessa forma, é conhecido que o OEMa tem eficácia para o tratamento de inúmeras doenças desencadeada por microrganismos como fungos e bactérias resistentes aos antibióticos convencionais (Silva L et al., 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

Produtos utilizados

Para realização do presente trabalho de pesquisa será utilizado o Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia* (OEMa) comercializado de origem Australiana da marca Via Aroma que de acordo com o fabricante os produtos da marca são 100% puros sem aditivos ou diluições extraído através de processo de destilação a partir de folhas da planta possuindo certificação IBD. Em relação aos antibióticos que serão utilizados para as testagens serão obtidos da Sigma Aldrich, os quais serão utilizados eritromicina, gentamicina e norfloxacino.

Cepas bacterianas

As seguintes cepas multirresistentes serão utilizadas no estudo: *Staphylococcus aureus* 10, e *Escherichia coli* 06 . Em que o seu perfil de resistência está descrito no estudo de Bezerra et al (2017).

Preparação de substancias

Para o óleo essencial a ser testados e os antibióticos que serão utilizados, inicialmente será pesado 10 mg de cada produto e adicionado 500 µL de DMSO. Essa solução será transferida para outro tubo e diluída em 9.265 µL de água destilada estéril, resultando em uma solução com teor final concentração de 1024 µg/mL.

Concentração Inibitoria Mínima (CIM)

Serão repicadas cepas bacterianas em placas de Petri contendo meio de cultura Heart Infusion Agar (HIA) e encubados a 37°C por 24 horas. Essas cepas serão diluídas em tubos de ensaio contendo salina, para a preparação do inóculo bacteriano, até atingir o correspondente a 0.5 na escala de McFarland. Posteriormente, serão preparados microtubos contendo, uma alíquota de 100 µL de inóculo bacteriano, referente a 10% da solução total, e adicionado 900 µL de meio de cultura infusão de cérebro e coração (BHI) líquido a concentração 10%. Após o preenchimento dos microtubos, será transferido o volume de 100 µL da solução preparada para cada poço de placas de microdiluição contendo 96 poços e em seguida o óleo essencial será microdiluído, o que irá resultar em concentrações variadas de 512 µg/mL a 8 µg/mL. O último poço de cada coluna não será microdiluído com o óleo essencial para ser utilizado como controle positivo do crescimento bacteriano. Logo após, as placas serão incubadas a 37°C por 24 horas, e após esse período, será adicionado 20 µL de resazurina em cada um dos poços previamente preparados e serão mantidas 1 hora em temperatura ambiente. Logo após esse período, será avaliado a variação colorimétrica onde os poços que permanecerem com a cor azul tem como resultado negativo para o crescimento bacteriano e os poços que mudaram a coloração de azul para rosa tem como resultado positivo para o crescimento bacteriano (Mann; Markham, 1998; Coutinho et al., 2008)

Modificação da atividade antibiotica

Para análise da atividade moduladora de antibióticos óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* deve ser utilizado em concentração subinibitória (CIM/8). Inicialmente, serão preparados microtubos contendo 150 µL do inóculo bacteriano, correspondente a um volume de 10% do volume total, o volume correspondente a CIM/8 do óleo essencial e o volume restante para 1.500 µL de BHI a 10%. Os controles serão preparados utilizando 1.350 µL de meio BHI a 10% e 150 µL do meio BHI do inóculo bacteriano. Cada poço de uma placa de microdiluição será preenchido com 100 µL do óleo essencial. Seguindo este procedimento, microdiluições com 100 µL de eritromicina, gentamicina e norfloxacin em dose inicial concentração de 1.024 µg/mL serão realizadas. As placas irão ser incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e, em seguida, o CIM desses antibióticos na presença do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* será determinado pela adição de resazurina. Todos os testes devem ser realizados em triplicata.

Análise estatística

Os resultados para as análises serão expressos como média geométrica e desvio padrão, analisados por análise de variância ANOVA seguida de teste post hoc de Bonferroni usando o software GraphPad Prism 9.0. Em que as diferenças com $p < 0,05$ serão

considerado significativas.

RESULTADOS ESPERADOS

Com a ampla aplicação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* espera-se que o presente estudo tenha resultados significativos frente a sua aplicabilidade em bactérias multirresistentes assim propiciando para os pesquisadores um norte frente as pesquisas realizadas para produção de novos antibióticos para evitar a evolução de resistência aos antibióticos que crescem a cada dia, dificultando na evolução dos tratamentos e acarretando em morbidades e mortalidades dos pacientes acometidos por infecções por esses patógenos multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- Abe, K. *et al.* Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. **FEMS Microbiology** abr. 2018.
- Agencia nacional de vigilância sanitária. Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>>. Acesso em: 20.ag.2023
- Alizadeh Behbahani, B.; Noshad, M.; Falah, F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, nov. 2019.
- Andrade, L.N.; Darini, A.L. C. Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. Curso Básico de Antimicrobianos divisão de **MI –CM –FMRP-USP**, 2016.
- Atarés, L.; Chiralt, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 51–62, fev. 2016.
- Bezerra, C. F. *et al.* Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 265–268, 1 dez. 2017.
- Binhara, R. Da C. Efeitos isolados e sinérgicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* e isotiocinato de alilo frente a bactérias patogênicas. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/29971>>. Acesso em: 24 set. 2023.
- Brasil. Ministério Da Saúde. Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar. **Brasília, DF, 2022**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/noticias-anvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>>. Acesso em: 09nov. 2023.
- Carvalho, J. J. V. De *et al.* Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, 10 jun. 2021.

Casarin, M. *et al.* *Melaleuca alternifolia* and its application against dental plaque and periodontal diseases: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 2, 12 dez. 2017.

Cussolim, P. A. *et al.* Mecanismos de resistência do staphylococcus aureus a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, v. 6, n. 12, 10 jan. 2021.

Da Costa, A. L. P.; Silva Junior, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, ago. 2017.

De Groot, A. C.; Schmidt, E. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. **Contact Dermatitis**, v. 75, n. 3, 13 maio 2016.

De Oliveira Souza, C. *et al.* Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 7, jul. 2016

Domingues, I. L. Resistência aos Antibióticos em Infecções Adquiridas na Comunidade. **Repositório científico da UC**. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10316/92951>>. Acesso em: 22 set. 2023. **Ecology**, v. 96, n. 5, 28 fev. 2020.

Escherichia coli. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 8 fev. 2018.

Felipe, L. De O. *et al.* Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia* —natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2,

Ferreira, E. E. *et al.* A importância do uso de fitoterápicos como prática alternativa ou complementar na atenção básica: revisão da literatura. **Pesquisa, Society e Development**. v. 11, n. 1, 2022.

Freires, M. S. *et al.* Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado da azitromicina frente a Covid-19: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, 7 jan. 2022.

Gioppo, A.; Zancanaro, V.; Bellaver, E. H. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. **Biotemas**, v. 32, n. 3, 20 ago. 2019.

Guimarães, C. C. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista brasileira de Biociência**, v. 15, n.2, 2017.

Guo, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 107, 17 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>. Acesso em: 19.set.2023

Johnson, J. R.; Russo, T. A. Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic

Jokinen, E. *et al.* Comparison of outcome and clinical characteristics of bacteremia caused by methicillin-resistant, penicillin-resistant and penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Infectious Diseases**, v. 49, n. 7, 28 fev. 2017.

Jordão, A.; V, J. *et al.* Mecanismo patológico da sepse em infecção por *Staphylococcus aureus*. **repositorio.animaeducacao.com.br**, 27 jun. 2023. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/36113>. Acesso em: 18 set. 2023.

Khademi, F.; Sahebkar, A. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of antibiotic-resistant *Listeria* species in food, animal and human specimens in Iran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, 24 ago. 2019.

Kronka, Andrei Mocheuti. Estudo de antimicrobianos naturais sobre bactérias Gram + (*Lactobacillus*) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica. **Unesp.br**, 2023.

Leal W.S *et al.* Análise da automedicação durante a pandemia do novo coronavírus: Um olhar sobre a azitromicina. REASERevista Ibero-Americana de Humanidades, **Ciências e Educação**. v.7. n.8, 2021.

Lima, C. *et al.* Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte, Enferm**, p. 105–113, 2017.

Loose, M.; Pilger, E.; Wagenlehner, F. Anti-Bacterial Effects of Essential Oils against Uropathogenic Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, 25 jun. 2020.

Loureiro, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, jan. 2016.

Maestri, Gabriela *et al.* Quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e mecanismos de resistência nas mãos de manipuladores de alimentos em UANS hospitalares em SC. **Disciplinarum Scientia, Saúde**, v. 21, n. 1, p. 91-105, 2020.

Mann, C. M.; Markham, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538–544, maio 1998.

Mello, C. N. Produção de toxinas por *Staphylococcus* sp. isoladas de amostras de pele : uma revisão bibliográfica. **lume.ufrgs.br**, 2020.

Monteiro, R. F. *et al.* O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 53, 23 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.25248/reas.e3597.2020>. Acesso em: 30 ago.2023

Msf Academy for Healthcare. Introdução à prevenção & controle de infecção. **Medicis Sans Frontieris**, França 2020. Disponível em: https://coronavirus.msf.org.br/wp-content/uploads/2020/06/Covid19_B1_PCI_Cadeia_de_Transmiss%C3%A3o_compressed.pdf.

Acesso em: 12.09.2023

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 12 mar. 2020.

Obaidat, M. M.; Stringer, A. P. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 on dairy cattle farms in Jordan. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, out. 2019.

Oliveira, A. F. M. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias patogênicas de importância clínica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, 12 out. 2022.

Oliveira, I. *et al.* EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA E DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO SEMI-SÓLIDA DE USO TÓPICO. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 5, n. 1, 3 jun. 2015.

Porter, J. A.; Morey, A.; Monu, E. A. Antimicrobial efficacy of white mustard essential oil and carvacrol against *Salmonella* in refrigerated ground chicken. **Poultry science**, v. 99, Out. 2020.

Reis, T. L.; Vieites, F. M. antibiótico, prebiótico, probiótico e simbiótico em rações de frangos de corte e galinhas poedeiras. **Ciência Animal**, v. 29, n. 3, 2019.

Sarowska, J. *et al.* Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 1, 21 fev. 2019.

Shafer, C. W. *et al.* Infectious Disease: Health Care-Associated Infections. **FP essentials**, v. 476, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30615408/>. Acesso em: 04 set.2023

Silva, F.; Mariana Oliveira Santana; Silva, T. Tratamento De Acne, Óleo Essencial De Melaleuca: Revisão De Literatura Sobre Tratamento De Acne Através Do Método De Melaleuca. **Recima21**, v. 4, n. 1, p. e414226–e414226, 5 out. 2023.

Silva, L. L. Da *et al.* Atividades terapêuticas do óleo essencial de melaleuca (*melaleuca alternifolia*) Uma revisão de literatura / Therapeutic activities of melaleuca essential oil (*melaleuca alternifolia*) A literature review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 6, 17 dez. 2019.

Silva, R. S. Aspectos sobre a diversidade genética de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica e sua relação com o potencial patogênico extra intestinal. **repositorio.unifesp.br**, 1.mai. 2022.

Tintino, S. R. Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural.

Vasconcelos, D.V. *et al.* O uso de antimicrobianos no âmbito hospitalar e as atribuições do farmacêutico na comissão de controle de infecção hospitalar (CCIH). **Revista AMRIGS**, v. 49, n. 3. 2017.

Velôso, D. S. *et al.* Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de um hospital de ensino. **Revista Interdisciplinar Ciências E Saúde - RICS**, v. 4, n. 2, 2017.

Zárate, S. *et al.* A Molecular Modeling Approach to Identify Novel Inhibitors of the Major Facilitator Superfamily of Efflux Pump Transporters. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, mar. 2019.