

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

SAMARA BATISTA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
PURA FLOR de *Calendula officinalis* EM ASSOCIAÇÃO À LUZ LED AZUL FRENTE
A *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Juazeiro do Norte, Ceará
2022

SAMARA BATISTA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
PURA FLOR de *Calendula officinalis* EM ASSOCIAÇÃO À LUZ LED AZUL FRENTE
A *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

Coorientador: Maria Hellena Garcia Novais

Juazeiro do Norte, Ceará
2022

SAMARA BATISTA DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
PURA FLOR de *Calendula officinalis* EM ASSOCIAÇÃO À LUZ LED AZUL FRENTE
A *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva

Coorientador: Maria Hellena Garcia Novais

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a): Prof^a. Ma. Rakel Olinda Macedo da Silva
Orientador

Prof(a): Prof^a. Dra. M^a Karollyna N. da Silva Leandro
Examinador 1

Prof(a): Prof^a. Ma. Tassia Thais Al Yafawi
Examinador 2

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre acreditaram em mim, me incentivaram e me deram coragem para a seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me conceder tantas oportunidades e sustentar-me diante das dificuldades.

Agradeço à minha mãe Solange por me dar o maior exemplo de mulher/mãe, força e coragem que eu poderia ter e por me mostrar sempre a direção certa.

Agradeço ao meu pai Paulo por sempre estar presente e me apoiar em todos os sentidos, além disso, se orgulhar das pequenas e grandes conquistas até aqui.

À toda minha família pelo apoio e entusiasmo frente à essa grande caminhada.

Aos meus amigos da graduação que fizeram essa jornada ser mais divertida e memorável, desejo todo sucesso pra todos vocês.

Aos digníssimos que estiveram sempre nas aventuras e perrengues da vida acadêmica: Ana Carolina, Breno Lucca, Nayane, Sabrina, Amanda, Layla, Vanessa e Jaqueline.

Às minhas companheiras de estágio pelos dias e noites de aprendizado e cumplicidade.

À minha pessoa e melhor amiga, Cristiane Sampaio, por sempre se propor a me acompanhar e nunca hesitar em me apoiar, muito obrigada por compartilhar os últimos meses dessa jornada tão imprevisível, conte sempre comigo.

Agradeço à minha ilustre orientadora Prof^a. Raket Olinda por dar o seu melhor e me conduzir nessa etapa, admiro imensamente a profissional e pessoa que és.

Agradeço à minha coorientadora Maria Hellena por toda assistência prestada.

Agradeço à minha primeira banca representada pela Prof^a. Tassia Thais Al Yafawi e Prof^o. Cícero Roberto Nascimento pela disponibilidade e incentivo, vocês são demais.

Agradeço à Prof^a. M^a Karollyna pela confiança e oportunidade de fazer parte da monitoria e Liga Acadêmica de Biologia e Genética Molecular – BioGeM.

Agradeço aos professores do Centro Universitário Leão Sampaio por todo conhecimento transmitido nesses anos de graduação.

Agradeço a todos os que de algum modo estiveram envolvidos nesse percurso.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE PURA FLOR de *Calendula officinalis* EM ASSOCIAÇÃO À LUZ LED AZUL FRENTE A *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Samara Batista da Silva¹; Maria Hellena Garcia Novais²; Rakel Olinda Macedo da Silva³.

RESUMO

Essa pesquisa objetivou averiguar a atividade antibacteriana e modulatória de óleo essencial de *Calendula officinalis*, planta herbácea da família Asteraceae, em associação à luz de led azul frente às cepas bacterianas padrão e resistente, respectivamente, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* 06, como também *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* 358, principais patógenos aos quais se atribuem as infecções humanas bacterianas. Os experimentos partiram de testes de sensibilidade que verificaram o efeito antibacteriano e modulador do produto, obtido comercialmente. A metodologia aplicada fora baseada na técnica de contato gasoso, iniciando pela atividade antibacteriana que prosseguiu com a aplicação do inóculo bacteriano sobre as placas e, posteriormente, introduziu-se o composto na concentração de 100% no interior da tampa, repetindo o processo e acrescentando à exposição das outras placas à luz led azul após o semeio, procedendo a avaliação do perfil de sensibilidade após o período de incubação de 24 horas. Na atividade modulatória seguiu-se o mesmo protocolo, porém incluiu-se os discos sintéticos de amicacina 30µg, gentamicina 10µg, ciprofloxacina 5µg e norfloxacina 10µg. A análise referente à atividade moduladora demonstrou resultados significativos durante a associação com os antibióticos gentamicina e norfloxacina, vinculada ao óleo essencial e a luz led, apresentando sinergismo frente ambas as cepas resistentes. Em contrapartida, os demais não revelaram efeitos consideráveis nesse contexto. Dessarte, a sinergia analisada principia a abertura de pesquisas que pertençam a mesma linha de investigação e que embasadas nas proposições geradas através desse trabalho concedam respostas mais concretas no tratamento de pacientes com infecções induzidas por patógenos multirresistentes estabelecendo prognósticos mais promissores.

Palavras-chave: Antibacteriana. *Calendula officinalis*. Infecções bacterianas. Modulatória. Óleo essencial.

ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE PURE FLOWER ESSENTIAL OIL OF *Calendula officinalis* IN ASSOCIATION WITH BLUE LED LIGHT AGAINST *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Thus, this research aimed to investigate the antibacterial and modulatory activity of essential oil of *Calendula officinalis*, herbaceous plant of the Asteraceae family, in association with blue led light against standard and resistant bacterial strains, respectively, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* 06, as well as *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Staphylococcus aureus* 358, the main pathogens to which human bacterial infections are attributed. The experiments were based on sensitivity tests that verified the antibacterial and modulating effect of the product, obtained commercially. The methodology applied was based

¹ Discente do curso de Biomedicina. samarabatista2503@gmail.com. Centro Universitário Leão Sampaio.

² Mestranda em Química Biológica. marlenna1516@gmail.com. Universidade Regional do Cariri.

³ Docente do curso de Biomedicina. rakelolinda@leaosampaio.edu.br. Centro Universitário Leão Sampaio.

on the gaseous contact technique, starting with the antibacterial activity that continued with the application of the bacterial inoculum on the plates and, subsequently, the compound was introduced in a concentration of 100% inside the lid, repeating the process and adding the exposure of the other plates to blue led light after seeding, proceeding to the evaluation of the sensitivity profile after the incubation period of 24 hours. The same protocol was followed for the modulatory activity, but synthetic discs of amikacin 30µg, gentamicin 10µg, ciprofloxacin 5µg and norfloxacin 10µg were included. The analysis regarding the modulating activity showed significant results during the association with gentamicin and norfloxacin antibiotics, linked to the essential oil and the led light, showing synergism against both resistant strains. On the other hand, the others did not reveal considerable effects in this context. Thus, the synergy analyzed begins the opening of researches that belong to the same line of investigation and that, based on the propositions generated through this work, provide more concrete answers in the treatment of patients with infections induced by multiresistant pathogens, establishing more promising prognoses.

Keywords: Antibacterial. *Calendula officinalis*. Bacterial infections. Modulatory. Essential oil

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas atingem grande parte da população mundial, estas são atribuídas a diversos agentes como bactérias, vírus, fungos, protozoários dentre outros. Somado a isso, as infecções de maior notoriedade clínica são desencadeadas perante à exposição dos indivíduos às bactérias patogênicas multirresistentes, que em detrimento de suas habilidades de adaptação às agressões externas tornam-se menos sensíveis às condutas terapêuticas disponíveis, portanto, correspondendo à um dos maiores riscos de morbimortalidade dos últimos tempos (ABRANTES; NOGUEIRA, 2021).

Destacam-se os microrganismos mais comuns em contextos de infecções bacterianas em animais e humanos como *Escherichia coli*, enterobactéria Gram negativa apresentando cepas comensais e patogênicas, e *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram positiva com diversos sorotipos responsáveis por diversas enfermidades (ALEGRE et al., 2016; WAGNER, 2018).

Com efeito, a resistência bacteriana definida como a capacidade das bactérias resistirem aos efeitos dos fármacos, ocorrem por vias intrínsecas ou adquiridas (PRATES et al., 2020). Esses padrões põem em risco a eficácia dos tratamentos vigentes contra tais infecções e por isso essa circunstância passa a exigir medidas de controles mais consistentes (FREIRES; JUNIOR, 2022).

Assim sendo, há muito tempo, as plantas são tidas como artigos de exploração do homem, especialmente, nas práticas tradicionais e milenares, em verdade, a introdução das plantas de caráter medicinal na terapia complementar vem se tornando pauta, ao passo que a etnofarmacologia busca estruturar e registrar evidências que comprovem o êxito desses compostos (JÜTTE et al., 2017).

Nessa lógica, estudos indicam que *Calendula officinalis* L, planta da família Asteraceae, conhecida popularmente como margarida dourada, malmequer, maravilha-do-jardim e erva do sol, dispõe em sua composição de bioativos influentes de ação antibacteriana contra determinados microrganismos, classificados clinicamente como patogênicos, desde Gram negativos até Gram positivos, sendo este fitoterápico alinhado e incorporado as estratégias de combate à multirresistência bacteriana (SHIRINIDHI et al., 2017).

Junto a isso, o LED (*Light Emitting Diode*), componente semicondutor que significa diodo emissor de luz, é classificado como um tipo de tecnologia de condução de luz com diversos comprimentos de onda, apresentando faixas específicas, a depender da cor que for emitida (MACEDO, 2015). A luz conduz a inativação bacteriana haja vista a excitação dos fotossensibilizadores que a absorvem e produzem espécies reativas de oxigênio provocando efeito citotóxico (MUTHUKUMAR, 2019).

Diante do contexto da saúde pública, o avanço das infecções põe em xeque a exequibilidade terapêutica dos antimicrobianos conceituados na indústria farmacêutica. Com isso, a comunidade científica é impelida a investigar as circunstâncias que coordenam a detecção e, especialmente, a disseminação de bactérias antibiótico-resistentes a nível global. Os espécimes vegetais como *Calendula officinalis* em consórcio às tecnologias fotodinâmicas de inibição, propõem alternativas mais seguras de assistência e gerenciamento das políticas em saúde, e por fim sugestionam a evolução das ferramentas de controle dos microrganismos multirresistentes.

Contudo, a presente pesquisa tem como objetivo averiguar e constatar a atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Calendula officinalis* em associação à luz de LED (*Light Emitting Diode*) azul frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, utilizando-se metodologia de contato gasoso, avaliando-se o potencial modulador do óleo em combinações com antibióticos aminoglicosídeos e quinolonas.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Calendula officinalis* fora obtido comercialmente da Laszlo - Aromaterapia e Aromatologia, Alemanha. Informações do fabricante: obtido via CO₂ hiper crítico, este óleo consiste em um extrato 100% de pura flor de calêndula. Além do óleo essencial, que é rico em faradiol e ésteres, agrega também carotenóides (xantinas, calendulina, caroteno, licopeno, zeaxantina etc), flavonóides, ácido oleanólico, saponinas, mucilagens, resinas, princípios amargos, polissacarídeos, ácido salicílico, vitaminas e minerais, sendo um produto de altíssima concentração de princípios ativos. Componentes: óleo essencial < 4% / carotenoides < 2% / fadadiol éster < 25% / resinas, triterpenos e outros. Pode-se ainda destacar os constituintes marjoritários sendo as saponinas triterpênicas (ácido oleanólico) e flavonoides (quercetina, isoquercitrina e rutina).

A extração via dióxido de carbono (CO₂) supercrítico é um processo mais aprimorado de se extrair óleos essenciais. Possibilita a obtenção de óleos essenciais com melhor qualidade aromática e elevado potencial terapêutico.

2.2 MICRORGANISMOS, ANTIBIÓTICOS, MEIOS DE CULTURA E APARELHO LED

Foram utilizadas as linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Staphylococcus aureus* ATCC 292213 cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Vicente Lemos e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 06 e *Staphylococcus aureus* 358 cedidas pela Universidade Regional do Cariri. Estas estiveram mantidas em Agar infusão de coração (HIA). Para realização dos testes, as linhagens foram suspensas em tubo de ensaio com solução salina para obter-se uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Os discos de antibióticos (amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina) foram adquiridos comercialmente da Sensifar®. Os meios de cultura Agar infusão de coração (HIA) e Ágar Mueller Hinton (MH) foram adquiridos de HIMEDIA, Índia. O aparelho utilizado durante o procedimento experimental fora o Light Emithing Diodes- LED, que é um diodo emissor de luz, da marca NEW Estética®, o qual possui os espectros de luz vermelha, azul e amarela, permitindo também a combinação destas cores.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR CONTATO GASOSO

A semeadura dos microrganismos fora realizada em placas de petri contendo Ágar Mueller Hinton (MH), empregando-se a técnica de semeio em tapete. O óleo essencial de *Calendula officinalis* foi utilizado sua concentração em 100%. No centro das placas foram inseridos discos de papéis filtro, e no interior das tampas fora adicionado 20 µL do produto a ser testado. Prosseguindo a incubação em estufa a 37°C durante um período de 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicate. Por fim, a determinação dos halos de inibição obedeceu a contagem exibida na superfície de uma régua milimetrada (SILVA; CARVALHO; MATIAS, 2016).

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA MODULADORA POR CONTATO GASOSO

O ensaio para avaliação da atividade moduladora foi realizado de acordo com o método do contato gasoso modificado por (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001). A semeadura dos microrganismos fora realizada em placas de de petri contendo Ágar Mueller Hinton (MH), empregando-se a técnica de semeio em tapete. Na base das placas contento o inóculo bacteriano foram adicionados os discos de antibióticos amicacina 30µg, gentamicina 10µg, ciprofloxacina 5µg, norfloxacina 10µg. Sobre o interior das tampas de cada uma das placas fora adicionado 20 µL da concentração do produto onde houve eficiência inibitória a partir dos testes de atividade bacteriana para que através da volatilização da substância houvesse a interação com os discos de antibiótico anteriormente alocados. Outras placas contendo os discos de fármacos, mas sem o óleo foram também preparadas. Prosseguindo a incubação em estufa a 37°C durante um período de 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A determinação dos halos de inibição obedeceu a contagem exibida superfície de uma régua milimetrada, sendo analisados na presença e/ou ausência do produto testado sendo possível categorizar o sinergismo ou antagonismo.

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA COM EXPOSIÇÃO À LUZ DE LED AZUL

Durante o procedimento experimental com LED utilizou-se o aparelho *Light Emithing Diodes- LED*, da marca NEW Estética®. Fora utilizada a luz azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho de 415nm. Para a realização destes testes, seguiu-se as mesmas metodologias referentes aos testes de avaliação da atividade antibacteriana e moduladora por contato gasoso. Em seguida, as placas passaram a ser submetidas à luz de LED azul num intervalo de tempo de vinte minutos. Prosseguindo a incubação em estufa a 37°C durante um período de 24 horas (PEREIRA et al., 2017). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados analisados foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test Bonferroni utilizando software estatístico GraphPad Prism 7.0, as diferenças foram consideradas significativas quando p fora menor que 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

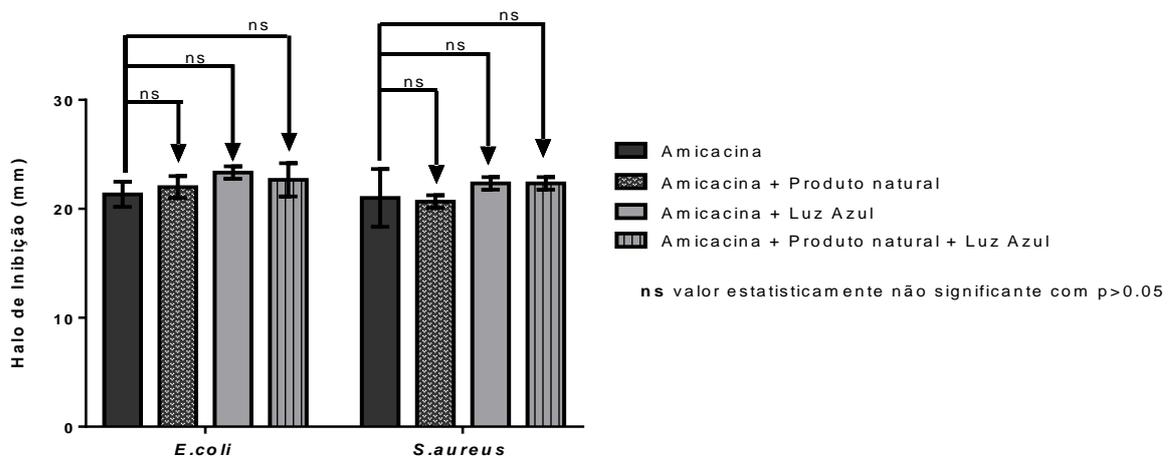
De acordo com os testes de atividade antibacteriana não fora detectada a inibição do crescimento bacteriano das cepas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na presença apenas da substância nem acrescido a luz de led azul. À vista disso, o óleo essencial e a fototerapia não promoveram a formação de halos, portanto, não desenvolveram uma atividade antibacteriana considerável sob tais bactérias.

Cabe pontuar que a ausência de atividade antimicrobiana, sobretudo, do óleo essencial selecionado pode ser justificada através diversas vias que puderam porventura afetar o seu potencial inibitório. Diante disso, Almeida; Almeida, Gherardi (2020) argumentaram que a época sazonal, é um dos principais fatores que interferem na performance de um mesmo espécime vegetal, somado a isso, o tipo de amostra vegetal, método e o tempo de extração são fatores críticos que também incidem diretamente no rendimento desses constituintes.

Como apontado por Souza (2020) durante os testes de atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim também não obtivera sucesso na redução das contagens microbiológicas da cepa de *Escherichia coli*, justificado pelo sistema alimentar e outros fatores como a temperatura e tempo de exposição que afetaram o êxito dos ensaios.

Os resultados demonstrados no **Gráfico 1** expressam os testes de modulação por contato gasoso utilizando o antibiótico Amicacina indicam que estes foram estatisticamente irrelevantes (em que p fora maior que 0,05) revelando, assim, a inaplicabilidade desse fármaco sob tais condições.

Gráfico 1: Atividade Modulatória por Contato Gasoso com Exposição à Luz de Led Azul com a inserção do antibiótico Amicacina na presença e ausência do óleo essencial de *Calendula officinalis* frente as cepas resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Própria do autor

Segundo os estudos de Böttger; Crich (2019) a Amicacina e Gentamicina, pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, em tese possuem um extenso espectro de ação contra bactérias aeróbias de Gram negativas, em especial aquelas que compõem à família Enterobacteriaceae e que produzem ESBLs, ou seja, β -lactamases de espectro estendido.

Com efeito, López (2019) destacou o dinamismo bactericida concernente a esta categoria, haja vista a possibilidade de gerar uma inibição irreversível da síntese proteica bacteriana, com destaque para subunidade 30s, provocando erros na leitura o que justifica a produção de proteínas anômalas “no sense”.

Uma vez que, apesar das descrições presentes na literatura que correlacionam o potencial antimicrobiano da Amicacina sobre tais espécies bacterianas, devem-se considerar outros fatores que podem ser determinantes, que vão desde a introdução da droga sob regime de isolamento ou sob a associação com produtos resultantes de organismos vegetais.

Piana; Kupski; Possebom (2021) salientaram que o surgimento das divergências entre as pesquisas etnofarmacológicas de variadas espécies de plantas medicinais, com ênfase no

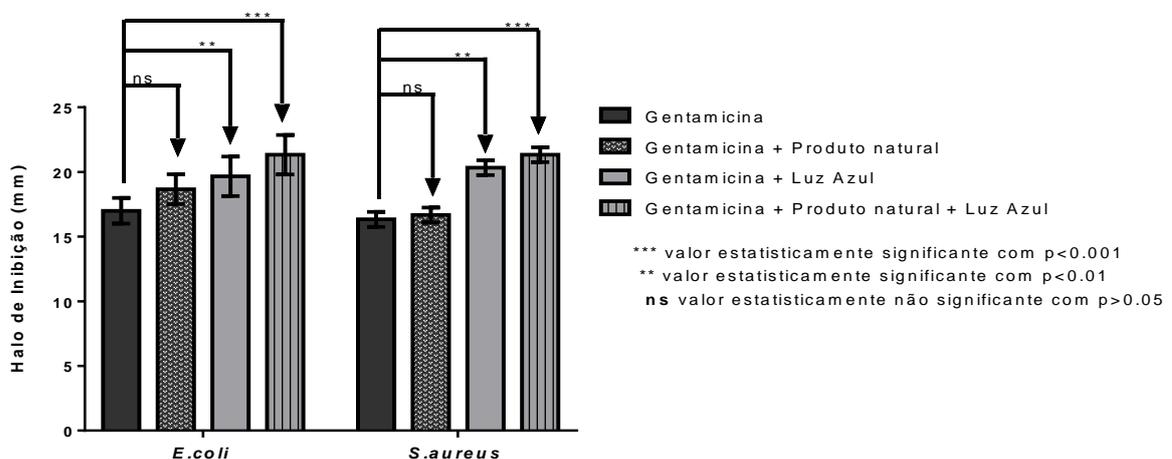
espécime de *Calendula officinalis*, podem ser fundamentadas no que tange a existência de mecanismos de resistência conferidos às bactérias o que impedem a análise concordante ao que fora visto nos ensaios citados anteriormente na literatura, somado a isso as baixas concentrações de substâncias ativas nos produtos em comercialização, a exemplo disso, os flavonoides.

Em consonância as observâncias de Gorniak; Bartoszeski; Króliczewski (2019), tal composto fitoquímico tem sido apontado como um dos elementos que conferem ação antibacteriana por desestabilizar a integralidade da membrana produzindo alterações ou até mesmo rupturas que interferem na principal característica dessa estrutura que é a permeabilidade.

Sob outro enfoque os resultados demonstrados no **Gráfico 2** expressam tanto a relação positiva do antibiótico Gentamicina com a luz de luz azul quanto a combinação do óleo essencial de *Calendula officinalis* com antimicrobiano e a luz, que quando associados resultados relevantes foram observados, indicando que o composto fitoquímico por si não fora eficaz, mas quando unido à luz houve a estimulação da ação dos princípios ativos presentes nele.

Não obstante, este indica a associação do fármaco juntamente à exposição à luz led azul em que se observa que um efeito considerável com $p < 0,01$, sobre as cepas Gram-negativas e Gram-positivas evento que denota efetividade deste arranjo, mas que tende a sofrer interferências a depender das condições em que são aplicadas.

Gráfico 2: Atividade Modulatória por Contato Gasoso com Exposição à Luz de Led Azul com a inserção do antibiótico Gentamicina na presença e ausência do óleo essencial de *Calendula officinalis* cepas resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Própria do autor

Kurosawa et al. (2020) projetou o perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp*, concebendo uma classificação em número absoluto e percentual aos quais para Gentamicina encontrou-se cerca de 96,5%, considerando um fármaco de ótima adequação terapêutica.

Conforme descreveu Galo et al. (2018) a inativação fotodinâmica é ditada pela variação da temperatura gerada pela luz, tempo de exposição das placas contendo o inóculo bacteriano, distância entre a emissão do feixe de luz e a área de cultura e entre outros fenômenos da irradiância, que reflete o fluxo de radiação por unidade de área recebida por uma superfície.

Em consequência disso, os compostos fenólicos, mais especificamente os bioflavonoides presentes no óleo essencial tiveram sua atividade antibacteriana ampliada. Como testificado por Rocha et al. (2013) durante a avaliação das plantas *S. terebintifolius* e *S. obtusifolium* em que a atividade antimicrobiana estivera relacionada à presença de metabolitos secundários como os próprios flavonoides e também saponinas, ambos constituintes de *Calendula officinalis*.

Alinhado a triagem fitoquímica de *Passiflora edulis Sims* realizada por Costa (2016) a detecção de bioativos como os flavonoides, saponinas e alcaloides estiveram intimamente correlacionados ao potencial antimicrobiano, sobretudo, os compostos fenólicos que atuam em diferentes níveis desde a membrana e parede celular dos microrganismos que passam a interagir com as proteínas de membrana das bactérias resultando na desarranjo dessas estruturas interferindo na permeabilidade e propiciando a coagulação do conteúdo celular.

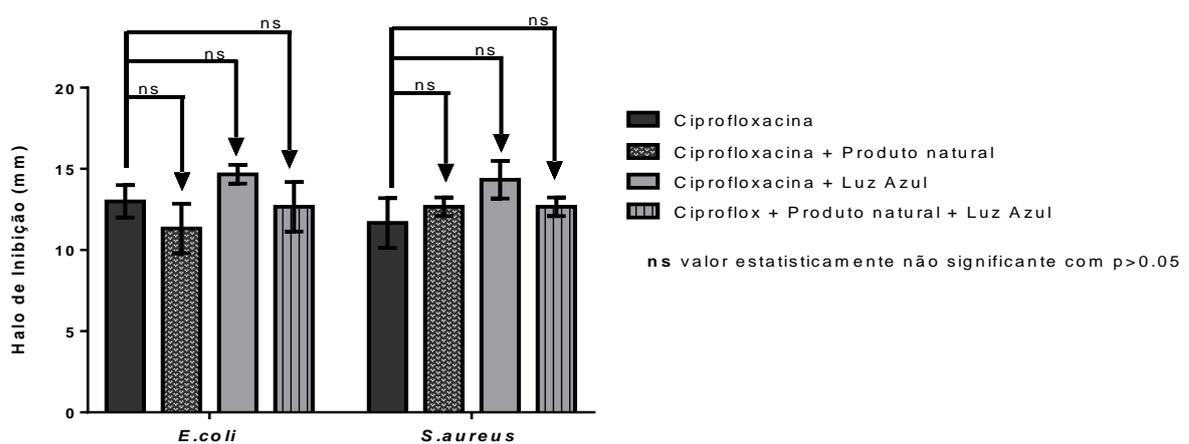
As propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas de *Malva sylvestris* (malva) também apontadas por Aleluia et al. (2015) foram determinadas também pela presença de mucilagens, taninos, glicolipídios e flavonoides quanto a relação no controle de biofilmes dentais causados por patógenos endodônticos, a exemplo, *Staphylococcus aureus*.

Ademais, verifica-se que modulação correspondente ao **Gráfico 2** desponta a presença do antimicrobiano sintético que em consórcio a luz de led azul e ao produto testado provocou um efeito sinérgico sobre as cepas Gram-negativas e Gram-positivas submetidas aos testes, sendo, portanto, o de maior significância em que $p < 0,001$, tendo em vista a formação de halos maiores em relação ao controle.

Desta maneira, os resultados encontrados na presente pesquisa podem estar atrelados a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) pelo tratamento fotodinâmico o que corrobora para a oxidação da membrana celular que destroem componentes celulares e em segundo plano a redução e neutralização dos fatores de virulência das bactérias por flavonoides ao passo que realiza o bloqueio de toxinas produzidas por patógenos, como também a quebra da estrutura citoplasmática (SILVA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018)

O **Gráfico 3** ilustra os resultados da atividade modulatória com ênfase na adição de ciprofloxacina em que pode se verificar que não houve a expressão de valores estaticamente significantes como determinado.

Gráfico 3: Atividade Modulatória por Contato Gasoso com Exposição à Luz de Led Azul com a inserção do antibiótico Ciprofloxacina na presença e ausência do óleo essencial de *Calendula officinalis* cepas resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Próprio autor

Na investigação acerca da prevalência de infecções do trato urinário Santos, Porcy e Oliveira Menezes (2019), destacaram que as cepas de *E. coli* apresentaram um perfil de resistência de 63% a Norfloxacin e de 61% a Ciprofloxacino, o que em termos gerais considera-se uma taxa sinalizadora quanto a crescente resistência dos microrganismos orientados aos processos farmacológicos das quinolonas. Somado a isso, Povoá et al., (2019) expôs que *E. coli* apresentou uma taxa de resistência de 35% também a Ciprofloxacina (Gráfico 3).

Diante da diminuta resposta modulatória emitida, essencialmente, no gráfico acima pode-se presumir que o produto que fora testado tenha de ter sofrido atenuação do seu potencial inibitório.

Alguns estudos sugerem que as bactérias Gram-negativas, citada acima, passam a ter um grau menor de susceptibilidade à ação dos antimicrobianos e demais substâncias associadas, explicada pela própria conformação celular bacteriana a que se compreende a dificuldade da difusão dos princípios ativos em consequência à existência dos lipopolissacarídeos aderidos à membrana externa (ALVES et al., 2022). Sendo assim, é previsto a possibilidade de que os fitoconstituintes de *Calendula officinalis* também enfrentem tais contratempos para combater diretamente esses patógenos.

Ao tomar nota acerca de tal pressuposto, os estudos concebidos por Farrar; Farrar (2020) designam os óleos essenciais (OE's) como compostos voláteis, que apresentam níveis de lipossolubilidade, possuem odor característico e com concentrações distintas de diversas substâncias consideradas vitais, provenientes da extração de plantas medicinais que, em suma, evidenciam propriedades farmacológicas e biológicas.

Simões; Souza (2019) discorrem sobre a crescente resistência aos antimicrobianos atribuída as cepas de *E. coli*, ainda que essa prerrogativa teria sido aplicada anteriormente às quinolonas de modo incisivo, observou-se que nos últimos tempos houve um aumento, em especial, ao ciprofloxacino, fato que corrobora com os dados indicados pela presente pesquisa (Gráfico 3).

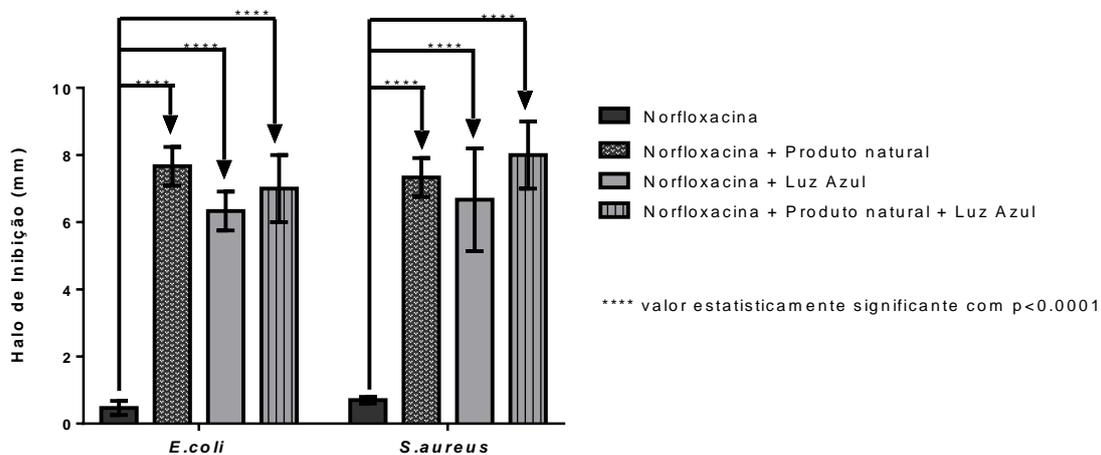
Sustentando tal lógica, Lima et al. (2022) legitima tal excerto ao identificar a prevalência desse microrganismo em um Hospital Universitário em Recife/PE analisando uroculturas positivas, considerando que esta bactéria fora responsável por cerca de 65% das infecções investigadas, ademais, exibindo um índice de resistência a ciprofloxacino contabilizando 27%, por isso, traz à tona a exigência do entendimento do comportamento dessas espécies mais virulentas relacionando-as com a terapia de infecções mais comuns.

Outrossim, ainda é válido explicitar o efeito pertinente de *Calendula officinalis* (Linn.), logo, em conformidade com os ensaios de Darekar; Hate (2021) a avaliação do seu potencial antibacteriano mostrou resultados moderados quanto a sua atividade inibitória com diferença significativa ($p < 0,05$) dentre os produtos adquiridos através das flores dessa herbácea, em que evidenciou uma repercussão positiva quanto bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*,

Enterococcus, com destaque para *Staphylococcus aureus* e por fim Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae*. Por conseguinte, admite-se que os testes desenvolvidos com outras cepas podem ser ainda mais promissores.

Para modulação como apresentado no **Gráfico 4** pode-se verificar a análise juntamente ao antimicrobiano Norfloxacina que demonstrou atividade modulatória importante dentro das disposições que fora submetido, conferindo uma escala de significância.

Gráfico 4: Atividade Modulatória por Contato Gasoso com Exposição à Luz de Led Azul com a inserção do antibiótico Norfloxacina na presença e ausência do óleo essencial de *Calendula officinalis* cepas resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Próprio autor

A Norfloxacina, fluoroquinolona integrante da segunda geração, apresenta atividade antimicrobiana acrescida e elevada se comparada aos fármacos anteriores (BUSH et al. 2020).

Pham et al. (2019) afirma que as quinonas apesar de sofrerem diversas modificações em sua estrutura química para melhoramento, ainda sim possuem um potencial de desenvolvimento de resistência antimicrobiana na medicina humana e veterinária, mas apesar disso, essa classe se destaca por possuir um espectro de atividade de alta amplitude contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atuando primariamente na topoisomerase IV e na DNA girase, respectivamente, tendo apenas como exceção o tratamento contra *S. aureus* em que a Norfloxacina atua diretamente na DNA girase.

Contudo, percebe-se que embora haja falhas nos processos de inibição de tal antibiótico a presença do óleo essencial por si conferiu aumento da capacidade de inibição bacteriana provocando um sinergismo, para além disso, as combinações frente a exposição a luz também produziram tais efeitos.

Isso está de acordo com o estudo de Melo et al. (2021) que propõe e atesta a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como um mecanismo baseado em fotossensibilizadores e fonte de luz visível como alternativa complementar que induz danos oxidativos e morte celular através de reações do tipo I (transferência de elétrons) e reações do tipo II (transferência de energia).

Briggs et al. (2018) avaliou a eficácia concernente à emissão de luz no tratamento de infecções em que bactérias resistentes Gram positivas e Gram negativas estiveram envolvidas, constatou-se então a efetividade para espécies de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichiacoli* e *Enterococcus faecalis*.

A avaliação realizada nesse estudo fora congruente à análise descrita por Loveckca (2018) e Muley et al (2009) em que as substâncias biologicamente ativas presentes nas folhas e flores de *Calendula officinalis* como proteínas e aminoácidos, açúcares redutores, saponinas, terpenóides, fenólicos, esteróides, glicosídeos e frações de flavonoides, podem ser associadas ao desempenho inibitório e antibiótico contra os microrganismos como fungos, parasitas, e sobretudo, as bactérias, a exemplo, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. fecalis*, *Sarcina lutea* e *Klebsiela pneumoniae*.

De modo geral, é cabível retomar a avaliação do composto volátil propriamente dito, assim, este produto aplicado aos testes obedeceu ao método de extração por fluido supercrítico ou CO₂ supercrítico, comumente utilizado na via de transformação industrial. Portanto, é definido que o fluido supercrítico se trata de uma substância que apresenta propriedades simultâneas de gás e líquido que se apresenta a temperatura e pressão superior ao ponto crítico e que podem ser manipuladas (ZHOU et al., 2021).

Para mais, Serrano; Figueiredo (2018) explicam que estes fluidos possuem alta solvatação e difusividade, característica atribuída aos líquidos e gases, respectivamente. Nessas condições, ao entrar em contato com a matriz vegetal penetram com maior eficiência, e por isso são extraídos biocompostos com rendimentos de alto valor.

A propósito, dióxido de carbono (CO₂) tem maior prestabilidade no processo de extração supercrítica (ESc) pois dispõe de propriedades físico-químicas como não inflamável, inodoro, insípido, inerte e não tóxico, estabelecendo maior segurança à saúde humana, sendo também ecologicamente correto (WRONA et al., 2017).

Por consequência, infere-se que a metodologia de extração do produto dificilmente pode ser responsável pela ausência ou declínio da ação antibacteriana verificada na maioria dos resultados, podendo averiguar que outras vertentes puderam interferir nesse desenvolvimento.

Tão logo, Oliveira; Sarmiento (2019) ratificam ainda que a produção de óleos voláteis é influenciada por fatores de variabilidade tanto de termos intrínsecos, que estão intimamente relacionados à genética e conseqüentemente à fisiologia da planta, quanto extrínsecos que se referem a ambientação (umidade, calor, luz, ar). Sob esse viés, as condições climáticas da região podem ter sido preponderantes na constatação da baixa atividade bactericida.

Sumariamente, o insucesso dos testes citados acima, com exceção dos quais se utilizou a gentamicina e norfloxacin, se deve em termos gerais pela resistência bacteriana. Nesse ínterim, ainda sobre a observação dessa característica Brunton et al. (2019) aponta que tal particularidade pode ser entendida pela inativação do fármaco acrescentadas à produção enzimática conferida aos microrganismos, dado que viabiliza falhas no acesso da substância ao interior celular bacteriano, progredindo com a irregularidade e conseqüentemente a inercia do composto sobre as espécies.

A multirresistência vinculada as bactérias Gram-negativas e em Gram-positivas estão largamente interligadas às bombas de efluxo, ditas proteínas de membrana que enviam as substâncias danosas as células bacterianas até o espaço extracelular reduzindo as concentrações internas evitando os efeitos deletérios (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

Em destaque para as Gram negativas que de forma natural contém a resistência intrínseca em função da menor permeabilidade da membrana (LPS), com isso segundo Poirel et al. (2018) traz que também que *Escherichia coli* possui capacidade de acumular genes de resistência, concebido através da transferência horizontal. Além disso, o *Staphylococcus aureus* também detêm a característica de aquisição de genes de resistência da mesma espécie ou de outras, que podem incidir diretamente no sítio de ação das substâncias provocando alterações o que induz a inativação, mediada por plamídeos e transposon (CUSSOLIM et al., 2021).

Além disto, o tipo de produto optado para pesquisa também incide diretamente nos resultados. Com isso, convém pontuar que o interesse científico acerca da funcionalidade dos óleos essenciais (OE's) citado por Li et al. (2018) ampara-se no tanto no baixo potencial de toxicidade direta aos organismos não alvos da substância, quanto na eficiente taxa de biodegradabilidade que, por sua vez, confere reduzidos riscos aos humanos e ao meio ambiente a qual integra.

Acrescido a isso, tal alternativa propicia ainda baixo custo, maior acessibilidade e propõe a limitação das injúrias provocadas pelos microrganismos procarióticos (AL ALSHEIKH et al., 2020).

Isso posto, o óleo essencial de *Calendula officinalis* agrega uma série de constituintes que a depender das condições de armazenamento e acondicionamento tendem a sofrer modificações de suas proficiências aromáticas e, acima de tudo, terapêuticas.

Neste sentido, Nascimento; Prade (2020) adverte que a aquisição de óleos essenciais na versão sintética pode corromper os principais benefícios encontrados na versão natural vegetal, por consequência, faz-se necessário observar as informações do produto desde a espécie (nome científico), especificações de quimiotipo até mesmo teor em princípio ativo, em segunda instância, a verificação do método de extração, coeficiente que está vinculado as variações químicas dos OE's.

4 CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos neste estudo demonstrou-se que o óleo essencial de *Calendula officinalis* isolado não apresentou atividade antibacteriana diante as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* testadas, entretanto, expressou uma modificação satisfatória durante os testes de modulação conduzidos através da associação do antibiótico gentamicina e norfloxacina, na presença e ausência da luz de LED azul. Evidencia-se que houveram repercussões significativas em função do sinergismo que provocou a sensibilização das bactérias. Todavia, não é descartada a possibilidade deste composto gerar resultados ainda mais promissores se direcionado a outras metodologias e outros patógenos. Em suma, esse trabalho permite uma perspectiva colaborativa e sugere novas pesquisas acerca da consolidação do potencial clínico e terapêutico de óleos essenciais para subsidiar o enfrentamento de doenças infecciosas de ordem bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 53, n. 3, p. 219-223, 2021.
- AL ALSHEIKH, H. M. et al. **Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance**. **Antibiotics**. v. 9, n. 8, p. 1-23, 2020.
- ALEGRE, M. L. et al. Impact of *Staphylococcus aureus* USA300 Colonization and Skin Infections on Systemic Immune Responses in Humans. **The Journal of Immunology**. v. 197, n. 4, p.1118-1126, 2016.
- ALELUIA, C.D. M. et al. Fitoterápicos na odontologia. **Revista Odontologia Universitária**. v. 27, n. 2, p. 126-34, 2015.
- ALMEIDA, J. C.; ALMEIDA, P. P.; GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutri Time**. v. 17, n. 1, p. 8623-8633, 2020.
- ALVES, M. V. D. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. v. 11, n. 1, p. 32-42, 2022.
- BÖTTGER, E. C., CRICH, D. Aminoglycosides: time for the resurrection of a neglected class of antibacterials?. **ACS infectious diseases**. v. 6, n. 2, p.168-172, 2019.
- BRIGGS, T. et al. Antimicrobial photodynamic therapy- a promising treatment for prosthetic joint infections. **Lasers in Medical Sciences**. v. 33, n. 3, p. 523-532, 2018.
- BRUNTON, L. L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Ed. 13. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- BUSH, N. et al. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**. v. 25, n. 23, p. 5662, 2020.
- COSTA, N. C. **Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana in vitro do extrato das sementes de *Passiflora edulis Sims* e formulações farmacêuticas**. 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2016
- CUSSOLIM, P. A. et al. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**. v. 6, n. 12, p. 831-843, 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, p. 45, 2017.

DAREKAR, D. P.; HATE, M. S. Phytochemical Screening of *Calendula Officinalis* (Linn.) Using Gas-Chromatography-Mass Spectroscopy with Potential Antibacterial Activity. **Journal of Scientific Research**, v. 65, n. 2, p. 1-7, 2021.

FARRAR, A. J., FARRAR, F. C. Clinical Aromatherapy. **Nursing Clinics of North America**. v.55, n. 4, p. 489–504, 2020.

GALO, I. D. C. et al. **Fototerapia antimicrobiana: otimização de protocolo experimental in vitro e estudo de resistência bacteriana**. 2018. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, Goiás, Brasil. 2018.

GORNIK, I.; BARTOSZESKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**. v. 18, p. 241-272, 2019.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

JÜTTE, R. et al. Herbal medicinal products–Evidence and tradition from a historical perspective. **Journal of Ethnopharmacology, Limerick**. v. 207, n. 1, p. 220-225, 2017.

KUROSAWA, L. S. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* associados a mastite bovina. **Pubvet**. v. 14, n. 5, p. 1- 6, 2020.

LI, Y. et al. Insecticidal Activities and Chemical Composition of the Essential Oils of *Ajania nitida* and *Ajania nematoloba* from China. **Journal of Oleo Science**. v. 67, n. 12, p. 1571-1577, 2018.

LIMA, D. C. S. et al. Prevalence of microorganisms resistant to ciprofloxacin isolated in urinary tract infections at University Hospital of Recife/PE. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 8, p. 1-9, 2022.

LÓPEZ, V. A. R. **Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Calendula officinalis* L., sobre cepas de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Botânicas) – Institución de Enseñanza e Investigación em Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 2019.

LOVECKA, P. et al. Characterization of biologically active substances from *Calendula officinalis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 19, p. 1167-1174, 2018.

MACEDO, Y. C. L. **Proposta e análise de um circuito para neoformação tecidual**. 2015. 45f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Eletrônica) - Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MELO, M.A. et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) para tratamentos de biofilme. **Virulência**. v. 12, n. 1, p. 2247-2272, 2021.

- MULEY, B. P. et al. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (asteraceae): a review. **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**. v. 5, n. 8, p. 455-465, 2009.
- MUTHUKUMAR, A. **Microbial Technology for the Welfare of Society**. v. 17, n. 1 p. 260, 2019.
- NASCIMENTO, A; PRADE, A. C. K. **Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais**. Ed. 2. Recife: Fiocruz-PE. 2020.
- OLIVEIRA, E. F. et al. Combination of aerosolized curcumin and UV-A light for the inactivation of bacteria on fresh produce surfaces. **Food Research International**. v. 114, n. 1, p.133-139, 2018.
- OLIVEIRA, R. K. B.; SARMENTO, A. M. M. F. O uso dos óleos essenciais de gerânio e junípero no rejuvenescimento facial. **Revista Diálogos em Saúde**. v. 2, n. 1 p. 38-52, 2019.
- PEREIRA, N. L. F. et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential os the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V. 174, n.1, p. 144-149, 2017.
- PHAM, T. et al. Quinolone antibiotics. **Med Chem Comm**. v. 10, n. 10, p. 1719-1739, 2019.
- PIANA, M., KUPSKI, C., POSSEBOM, M. B. H. Análise da atividade antibacteriana de espécies utilizadas popularmente em infecções do trato urinário. **Revista Farmácia Generalista/Generalist Pharmacy Journal**. v. 3, n.1, p.1-13, 2021.
- POIREL L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum Journal**. v. 6, n. 4. p. 1-27, 2018.
- PÓVOA, C. P. et al. Evolução da resistência bacteriana em infecção comunitária do trato urinário em idosos. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 9, n. 1, p.1-7, 2019.
- ROCHA, E. A. L et al. Atividade Antimicrobiana “In Vitro” de Extratos Hidroalcoólicos de Plantas Medicinais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. **Pesquisa Brasil Odontopediatria Clínica Integrativa**. v. 13, n. 3, p. 233-38, 2013.
- SANTOS, M. J. A., PORCY, C., & DE OLIVEIRA MENEZES, R. A. Etiologia e perfil de resistência bacteriana em uroculturas de pacientes atendidos em um hospital público de Macapá-Amapá, Brasil. Um estudo transversal. **Revista Diagnóstico e tratamento**. v. 24, n. 4, p. 135-142, 2019.
- SERRANO, C.; FIGUEIREDO. **Plantas Aromáticas**. Ed. 3. Portugal: A Fileira das Plantas Aromáticas e o Desenvolvimento Local, 2018.
- SHIRINIDHI, S. et al. Efficacy of calendula officinalis extract (Marigold flower) as antimicrobial agent against oral microbes: An invitro study in comparision with chlorexidine digloconate. **Journal of Clinical and Diagnostic Researc**. v. 11, n. 10, p. 5-10, 2017.

SILVA, A. D. et al. Atividade antimicrobiana de flavonoides: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**. v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020.

SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; MATIAS, E. F. F. Chemical Profile of Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and Evaluation of Antibacterial and Drug Resistance modifying Activity by Gaseous Contact Method. **Pharmacognosy Journal**. v. 8, n. 1, p. 4-9, 2016.

SIMÕES, L. P.; SOUZA, L. B. G. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de suco de cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) sobre cepas de *Escherichia coli* responsáveis por infecção urinária. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 51, n. 2, p. 154-156, 2019.

SOUZA, L. A. et al. Atividade antimicrobiana de óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em carnes inoculadas com *Escherichia coli*. **Brazilian Applied Science Review**. v. 4, n. 2, p. 592-605, 2020.

WAGNER, F. S. **Perfil antimicrobiano de cepas de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa isoladas do Rio Tubarão/SC**. 2018. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina, 2018.

WRONA, O. et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials. **Journal of AOAC International**. v. 100, n.6, p. 1624 - 1635, 2017.

ZHOU, J. et al. The Application of Supercritical Fluids Technology to Recover Healthy valuable Compounds from Marine and Agricultural Food Processing By-Products: **A Review. Processes**. v. 9, n. 2, p. 357, 2021.

