
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE)

Ana Marcia de Matos Volpato¹; Ester de Moura Rios²; Marilis Dallarmi Miguel³;
Paulo Cesar Sander³; Obdúlio Gomes Miguel³

¹Laboratório Industrial de Medicamentos - Departamento de Ciências Farmacêuticas do Setor de Saúde da UEPG

²Departamento de Biologia Geral do Setor de Saúde da UEPG

³Departamento de Farmácia do Setor de Saúde da UFPR

RESUMO

A atividade antimicrobiana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) já foi cientificamente comprovada em outros países. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de *C. officinalis* cultivada no Paraná - Brasil, nas condições de extração etanólica 50%, com filtração e partições sucessivas com hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, frente a cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Bacillus cereus*, pela técnica da difusão em meio sólido por cavidade e posteriormente pelo método de diluição em placa. Os resultados demonstraram que algumas frações do extrato inibiram as bactérias gram-positivas, com atividade frente a *Staphylococcus* e *Bacilos* e inexistente em gram negativas, indicando que o princípio ativo responsável pela atividade antibacteriana observada possa ser isolado a partir das frações Hexânica e DCM nas condições de extração propostas neste trabalho.

Palavras chave: *Calendula officinalis*, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) antimicrobial action has already been scientifically proved in other countries. The aim of this study was to assess the antibacterial action of the *Callendula officinalis* which is grown in Paraná - Brasil, under extraction conditions at ethanol 50%, with filtration and successive partitions with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butane, contrasting with strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Bacillus cereus*, by the diffusion technique in solid media by cavity and afterwards by the plaque dilution method. The results showed that some fractions of the extract inhibited the gram-positive bacteria, with activity in contrast with *Staphylococcus* and *Bacillus* and non-existing in gram-negative, also indicating that the active ingredient responsible for the antibacterial action observed can be isolated from the Hexanic and DCM fractions under the extraction conditions proposed in this study.

Key words: *Calendula officinalis*, antimicrobial action

1. INTRODUÇÃO

A *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), é uma planta originária do Egito, foi importada para a Europa no séc. XII e trazida para o Brasil no séc. XVIII, sendo cultivada como planta ornamental e medicinal¹. Na medicina tradicional é utilizada pelos seus efeitos antiinflamatório, antisséptico e cicatrizante². Através de reações químicas de identificação e análises cromatográficas, foram encontrados diversos grupos de compostos nas flores de *C. officinalis* L., sendo os principais constituintes: princípio amargo calendulina e calendina, carotenóides, esteróides, sesquiterpenóides, triterpenóides, óleo essencial, flavonóides, resinas, mucilagem, ésteres de ácidos orgânicos, ácidos pentadecílico e salicílico, saponinas, álcoois, esteróis, triterpenos e taninos³. A atividade antibacteriana de *C. officinalis* foi comprovada experimentalmente em outros países⁴. No entanto, sabe-se que a atividade antimicrobiana de extratos parece depender, não apenas da presença de substâncias antimicrobianas no vegetal, mas também, das diversas fases de desenvolvimento do vegetal e das condições de extração⁵. A resposta final pode ser resultante de efeitos sinérgicos, antagonistas, além de outros fatores interativos entre os diversos componentes⁶.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana de *C. officinalis* L. cultivada no Brasil, nas condições de extração etanólica à 50° C com partições sucessivas em solventes de polaridade crescente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *Calendula officinalis* L. foi coletada em setembro de 1998, no município de Campo Largo - PR. A identificação do material Botânico foi realizado pela professora Rosemeri Moro, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde há uma excicata depositada no Herbário da UEPG, sob número 6483.

3.2. EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

Os capítulos florais de *Calendula officinalis* foram secos em estufa a 40° C por 48 h. 1,3 Kg do material foi moído até um pó grosso. Este material foi mantido em maceração com metanol 80% durante 10 dias e posteriormente percolado. Após, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 30% do volume inicial, obtendo-se assim o extrato bruto.

3.3. PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Durante a concentração do extrato bruto, houve a formação de uma grande quantidade de precipitado de coloração marrom. Este precipitado foi separado por filtração através de papel filtro. O resíduo foi levado à secura através de jatos de ar quente e pulverizado em grau de porcelana. O filtrado foi particionado sucessivamente com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol⁷.

3.4. ESTUDO FITOQUÍMICO

As frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica foram cromatografadas em coluna com solventes PA, de polaridade crescente. Os compostos puros obtidos foram identificados por IV, CG - MS, MS, RMN ¹H e ¹³C. As frações foram investigadas quanto à sua propriedade antimicrobiana.

3.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para os testes de sensibilidade⁸ foram analisados o precipitado 1 (PPT1), precipitado 2 (PPT2), as frações: hexânica (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e butanólica (BUT), dissolvidas em dimetilsulfóxido e filtradas em millipore. As estirpes utilizadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 e *Bacillus cereus*. A suspensão bacteriana em salina foi padronizada pelo tubo 0,5 da escala de MacFarland. O potencial

antimicrobiano do precipitado e das frações foi inicialmente avaliado pela técnica da difusão em meio sólido por cavidade-placa, utilizou-se 3 mg por cavidade. A seguir as frações foram testadas através do método de diluição em meio trypticase soy ágar (TSA) e em trypticase soy broth (TSB). Para avaliar possível atividade bactericida, procedeu-se ao subcultivo dos tubos que não apresentaram crescimento visível após 24 e 48 horas e contagem do número de colônias sobreviventes. Os experimentos foram realizados em triplicata e foram utilizados como controle, antimicrobianos padrão e volumes equivalentes de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente das frações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicam baixa atividade inibitória das frações de *Calendula*. As frações de hexano e de diclorometano demonstraram maior atividade antibacteriana, principalmente em gram positivas, e portanto os compostos mais apolares podem ser os principais constituintes fitoquímicos atuando como antibacterianos. Os compostos mais polares, presentes na fração butanólica, foram ativos apenas contra *B. cereus*, que demonstrou maior sensibilidade às frações, inclusive ao precipitado. A fração acetato de etila inibiu apenas *S. aureus* e os halos de inibição em mm estão indicados na tabela 1. As frações não inibiram gram-negativas. Concentrações de até 2 mg/ml da fração DCM diluídas em meio sólido não inibiram o crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*. A concentração mínima inibitória do DCM, determinada em meio sólido após 24 e 48 horas de incubação foi de 1,5 mg/ml para *S. aureus* e de 2,0 mg/ml para *S. epidermidis* (Tabela 2). A concentração mínima inibitória do HEX foi de 1,5 a 3,0 mg/ml para *S. aureus*. O efeito bactericida do DCM, correspondente a um número de sobreviventes igual ou inferior a 0,01% não foi observado em *S. aureus* cultivado em meio líquido, no entanto, sub-cultivos indicaram redução de 99% da população na concentração de 3,0 mg/ml.

TABELA 1. Atividade inibitória das frações de *Calendula officinalis* em bactérias pelo método da difusão radial em ágar.

Frações	Diâmetro do halo de inibição em mm			
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
PPT 1	13	0	0	0
PPT 2	---	---	0	0
HEX	16	0	12	10-12
DCM	17	0	13	12
AE	---	---	12	0
BUT	13-14	0	0	0
DMSO	0	0	0	0

TABELA 2. Determinação da concentração mínima inibitória do DCM, por diluição em ágar.

Fração e Concentração (ug/ml)	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
DCM 850	++	+++	---	---	---	---	---	---
DCM 1000	0	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DCM 1300	0	+	++	++	+++	+++	+++	+++
DCM 1500	0	0	0	+	+++	+++	+++	+++
DCM 2000	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++
DMSO	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Controle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

0: < 3 colônias +: 3 a 150 colônias ++: 150 a 300 colônias +++: crescimento confluyente

5. CONCLUSÕES

- Os extratos de hexano, diclorometano e acetato de etila de *Calendula officinalis* demonstraram atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e foram inativos contra as bactérias Gram-negativas.
- Os resultados indicam que o princípio ativo responsável pela atividade antibacteriana observada pode ser isolado a partir das frações DCM e HEX nas condições de extração propostas neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. OCIOZYNSKA, I. et al. *Study of the chemistry of marigold (Calendula officinalis L.) inflorescence*. Herba Pol., Poznan. 23(3):191-9 (1977)
2. VIDAL-OLLIVIER, E. et al. *Flavonol glycosides from Calendula officinalis flowers*. Planta Med. 55(1):73-74 (1989).
3. KASPRZYK, Z.; WOJCIECHOWSKI, Z.; JANISZOWSKA, W. *Phytochemistry*. 9:561-64 (1970)
4. DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSARD, G. GUIRAUD, H.; LALLEMAND, M. *Étude des propriétés antibactériennes des fleurs de Souci Calendula officinalis L. et des teintures mères homéopathiques de C. officinalis L. et C. arvensis L. Annales pharmaceutiques françaises*, 38, n. 6, p. 493-499. 1980.
5. MACHADO, J. O.; SANTOS, E.; LEFÈVRE, A.F.V. *Atividade Antibacteriana de extratos de Bidens pilosa L.* Revista Ciênc. Farm. São Paulo, v. 10, p. 55 –62, 1988.
6. RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M. *Genotoxicity of an extract of Calendula officinalis L.* *Journal of Ethnopharmacology*, 61, p. 49-55. 1988.
7. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. *Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais.* *Quim. Nova*, 21(1):99-105 (1998).
8. CLEELAND, R.; SQUIRES, E. *Evaluation of new antimicrobials in vivo and in experimental animal infections.* In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. ed. 3, edited by V. LORIAN, Williams & Wilkins, Baltimore, ch. 21. 1991