AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO DE *Calendula spp.* UTILIZANDO CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES IN VITRO OF *Calendula spp*. EXTRACT USING *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS

Murillo Alessandro do Nascimento[1,2], Luciana Lopes Guimarães[1,2], Daniel Siquieroli Vilas Boas[1]

[1]Universidade Santa Cecília, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Curso de Farmácia
[2]Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPNAT), Universidade Santa Cecília
E-mail para contato: mnascimento.ic@gmail.com

RESUMO – Diversas atividades foram descritas para Calendula officinalis, tais como antioxidante, imunoestimulante e antifúngica. Neste estudo, foram realizados ensaios para verificar o potencial antifúngico e antioxidante do extrato obtido. O extrato bruto originou-se pelo método de turbólise com etanol absoluto e seco em rotaevaporador. A atividade antioxidante foi determinada pela reação com o radical livre DPPH. O teste de susceptibilidade in vitro foi realizado pela adaptação do método de microdiluição em placa de poços, com concentrações que variavam de 0,156 a 10mg/mL. Em termos de atividade antioxidante, a concentração de 500 µg/mL demonstrou atividade anti-radicalar mais elevada. No que diz respeito à atividade antifúngica, apenas a concentração de 10mg/mL inibiu o crescimento de S. cerevisiae.

Palavras-chave: *Calendula officinalis*; Antioxidante; Antifúngico; Produtos naturais; Extrato vegetal.

ABSTRACT – Several activities have been described for Calendula officinalis, such as antioxidant, immunostimulant and antifungal. In this study, tests were carried out to verify the antifungal and antioxidant potential of the extract obtained. The crude extract originated by the turbolysis method with absolute ethanol and dried in a rotary evaporator. The antioxidant activity was determined by the reaction with the free radical DPPH. The in vitro susceptibility test was carried out by adapting the microdilution method in a well plate, with concentrations ranging from 0.156 to 10mg/mL. In terms of antioxidant activity, the concentration of 500 µg/mL demonstrated the highest anti-radical activity. Regarding antifungal activity, only a concentration of 10 mg/mL inhibited the growth of S. cerevisiae.

Keywords: *Calendula officinalis; Antioxidant; Antifungal; Natural products; Plant extract.*

Tipo do trabalho: (X) Iniciação científica ( ) Iniciação tecnológica ( ) Extensão

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas por seu potencial medicinal é algo amplamente descrito, fazendo com que produtos naturais e seus derivados representam mais da metade dos fármacos de uso clínico. Dentre as diversas substâncias químicas presentes nos produtos naturais, os compostos fenólicos são um grupo de metabólitos secundários que, de maneira geral, representam grande parte das atividades farmacológicas atribuídas às espécies vegetais. Os extratos obtidos das flores de calêndula, além de possuir as propriedades comuns a diversas plantas devido aos compostos fenólicos, apresenta ainda atividades diferenciadas, dentre elas destacam-se suas funções antibacterianas e fungicidas [1]. Os compostos fenólicos são substâncias constituintes de diversos vegetais, extremamente complexos e normalmente derivados de reações de defesa das plantas. Atuam como antioxidantes tanto por sua capacidade de doar hidrogênio ou elétrons, quanto por seus radicais intermediários apresentarem estabilidade, impedindo o processo oxidativo [2].

O objetivo geral deste estudo foi a analisar as atividades antifúngica e antioxidante de extratos obtidos a partir das flores de Calendula spp.. Estudos fitoquímicos foram conduzidos para colaborar com a caracterização das substâncias bioativas presentes no material vegetal selecionado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato foi obtido a partir das flores de calêndula obtidas comercialmente. As flores secas foram submetidas a extração por turbólise utilizando etanol absoluto. Após filtração simples, o extrato de *Calendula spp.* foi seco em rotaevaporador e ressuspenso em etanol novamente para ser submetido ao processo de *cleaning* com uma mistura de 150 mL de H_2O/Hexano (1:2) em funil de separação para remoção do excesso de gorduras e componentes graxos presentes no extrato seco. Após o *cleaning*, a fração hidroalcoólica foi seca em evaporador rotativo novamente.

A metodologia de determinação de fenólicos totais foi realizada em triplicata pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* [3], [4]. As amostras secas em rotaevaporador foram ressuspensas em metanol na proporção de 0,1:20 (m/v) amostra:solvente, sendo posteriormente diluídas na concentração de 12,5µg/mL, originando a solução de trabalho. A quantificação foi realizada em triplicata pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, seguido da leitura em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda $\lambda = 750$nm.

O teste de susceptibilidade *in vitro* foi realizado pela adaptação do método de microdiluição em placa de poços descritos na norma CSLI M7-A2 de 2008 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição).

O extrato seco de *Calendula spp.* foi ressuspenso em metanol na concentração de 5000 µg/mL, sendo posteriormente diluído para a concentração de 500 µg/mL para a detecção no comprimento de onda descrito para o método de atividade antioxidante. Realizou-se uma diluição seriada da solução estoque, com um intervalo de concentrações de 15,625 µg/mL a 500 µg/mL. Em cada ponto da diluição, foram adicionados 200µL de solução do radical DPPH em metanol na concentração de 40µg/mL em 1mL de extrato diluído, seguido do ajuste do volume final para 2mL utilizando 800 µL de metanol. A incubação ocorre ao abrigo da luz durante trinta minutos em temperatura ambiente. Após o fim do tempo de reação, realiza-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda $\lambda = 517nm$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de *Calendula spp.* apresentou um teor de fenólicos totais de 4,238 ± 2,742 mgEAG/g. O conteúdo total de fenólicos do extrato das flores secas de calêndula distribuídas de forma comercial apresentou um decaimento em relação aos valores descritos na literatura tanto para a quantificação de compostos fenólicos totais quanto para o doseamento de ácidos fenólicos [5], [6], [7], o que pode indicar diferentes alterações tanto em termos de condições ambientais quanto em termos de armazenamento e tratamento do material vegetal previamente à sua distribuição. Além disso, as metodologias de extração e purificação do extrato também interferem em seu conteúdo fitoquímico.

Frente a reação com o DPPH, o extrato apresentou atividade anti-radicalar superior a 50% em todas as concentrações propostas, conforme a Figura 1, apresentando uma tendência de aumento dessa atividade de acordo com o aumento da concentração nas três primeiras amostras. A análise de variância não demonstrou significância estatística entre as concentrações, dada a disparidade entre os valores das réplicas, aumentando o desvio padrão, especialmente nas duas primeiras concentrações (15,625 µg/mL e 31,25 µg/mL), onde uma das réplicas atinge o mesmo valor da média da concentração seguinte (62,5 µg/mL). No intervalo de concentrações de 62,5 µg/mL até 500 µg/mL, não se observou uma variação significativa no percentual de atividade antioxidante (Tabela 1), delimitando um intervalo de concentrações onde a atividade atinge um

platô. A característica de concentrações relativamente baixas também demonstrarem uma atividade antioxidante elevada, além do próprio platô entre diferentes volumes ou concentrações do extrato de calêndula já foi anteriormente descrito [8].

A visualização do crescimento das leveduras após os tratamentos com diferentes concentrações do extrato demonstrou uma baixa atividade antifúngica nas concentrações testadas. A concentração de 10 mg/mL foi a única em que não ocorreu nenhum crescimento aparente, enquanto nas demais concentrações houve crescimento semelhante ao "Controle inóculo" (controle positivo para crescimento) em pelo menos duas réplicas. Houve ainda uma dificuldade no crescimento das leveduras nas condições ideias, sendo necessário um período superior a 48h para leitura dos resultados, o que ocasionou a evaporação de alguns poços da placa, impactando diretamente a interpretação dos dados, especialmente na primeira réplica do experimento.

Figura 1: Atividade antioxidante das diferentes concentrações do extrato

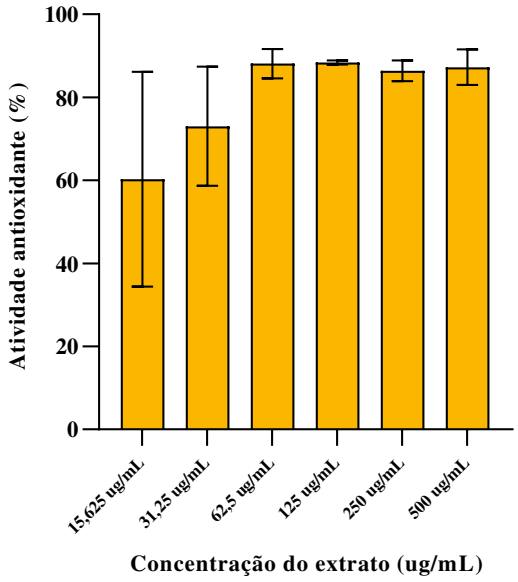


Tabela 1: Valores de potencial antioxidante com desvio padrão

Concentração (µg/mL)	% Atividade antioxidante ± DP
15,625 µg/mL	53,043% ± 0,035
31,25 µg/mL	73,043% ± 0,017
62,5 µg/mL	88,116% ± 0,004
125 µg/mL	88,406% ± 0,001
250 µg/mL	86,377% ± 0,003
500 µg/mL	91,884% ± 0,001

4 CONCLUSÃO

Frente ao exposto, o extrato etanólico obtido a partir das flores secas de *Calendula spp.* comercializadas para o preparo de chás apresenta elevada conservação de propriedades antioxidantes, apesar de uma diminuição no teor de compostos fenólicos totais que são conhecidos por seu papel no tocante à esta atividade. O extrato apresenta, ainda, uma leve

atividade antifúngica, sendo necessários testes quanto às concentrações mais efetivas e a diferenciação das atividades fungstática e fungicida. A experimentação e elucidação de mecanismos, estruturas e atividades de espécies vegetais faz-se extremamente necessária para o desenvolvimento de novas terapias para diversas doenças de origens inflamatória ou infecciosa, além de outras patologias que estejam relacionadas ao estresse oxidativo das células, como tumores. Com isso, o avanço tecnológico no que diz respeito as análises de misturas complexas, como é o caso dos extratos obtidos de matrizes vegetais, torna-se essencial para o estudo de tais amostras, sendo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um sistema de Espectrometria de Massas (*HPLC-MS/MS*) uma excelente opção, possibilitando uma avaliação ampla dos metabólitos presentes nos extratos, verificando tanto suas funções já descritas na literatura quanto novas substâncias nunca anteriormente descritas. A utilização de produtos naturais para fins profiláticos e de tratamento é uma prática que colabora com a promoção da saúde e bem-estar de toda a população. Este projeto contou com apoio institucional do PIBIC-Unisanta, bem como apoio financeiro do CNPq.

5 REFERÊNCIAS

1. MONTANÉ OJEDA, Claudia; ARIAS RAMOS, Daily; CHIL NÚÑEZ, Idelsy. *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en un extracto blando de flores de Calendula officinalis Linn. Orange Journal,* [s. l.], v. 2, n. 3, p. 20–31, 2021.
2. SILVA, Marília Lordêlo Cardoso et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 669–681, 2010.
3. FARIA, Felipe Meira de. Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividade antiulcerogenica e antioxidantes de *Rhizophora mangle L.* [S. l.]: [s.n.], 2009.
4. GENOVESE, Maria Inês et al. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, [s. l.], v. 39, p. 167–169, 2003.
5. JOVIĆ, Marko D. et al. Bioassay-Guided Assessment of Antioxidative, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Extracts from Medicinal Plants via High-Performance Thin-Layer Chromatography. Molecules, [s. l.], v. 28, n. 21, p. 7346, 2023.
6. MARTINS DE DEUS, Breno et al. Chemical Characterization, Bioactivity and Toxicity of European Flora Plant Extracts in Search for Potential Natural Origin Preservatives. Plants, [s. l.], v. 12, n. 15, p. 2784, 2023.
7. VILLALVA, Marisol et al. Sustainable Extraction Techniques for Obtaining Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds from the Lamiaceae and Asteraceae Species. Foods, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2067, 2021.
8. PRABHU VENKATESH, Deeksheetha et al. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Anti-inflammatory Potentials of Herbal Formulation Containing Marigold Flower (Calendula officinalis L.) Tea. Cureus, [s. l.], v. 15, n. 8, 2023.