



Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth.

Deborah Q. Falcão^{1*}, Edlaine R. Costa², Daniela S. Alviano³, Celuta S. Alviano³,
Ricardo M. Kuster¹, Fábio S. Menezes²

¹Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590, RJ, Brasil,

²Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590, RJ, Brasil,

³Departamento de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590, RJ, Brasil

RESUMO: A espécie *Calceolaria chelidonioides* (Scrophulariaceae), até então inédita nas citações científicas, foi estudada sob o ponto de vista farmacológico buscando-se identificar possíveis atividades antimicrobiana e antioxidante em metodologia *in vitro*. As partes aéreas dessa espécie demonstraram atividade antioxidante em modelo usando o radical livre DPPH. As flores de *C. chelidonioides* mostraram grande potencial antibacteriano frente à bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a metilina MRSA, um dos principais responsáveis em casos de infecção hospitalar.

Unitermos: *Calceolaria chelidonioides*, Scrophulariaceae, MRSA, DPPH.

ABSTRACT: “Antioxidant and anti-microbial activity from *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth.” The species *Calceolaria chelidonioides* (Scrophulariaceae), not scientific described so far, was studied in pharmacological aspects aiming to identify some anti-microbial and antioxidant activity. The aerial parts showed antioxidant activity using *in vitro* DPPH model. The flowers from *C. chelidonioides* showed strong antibacterial potential against meticiline resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains the main responsible for hospital infection complications.

Keywords: *Calceolaria chelidonioides*, Scrophulariaceae, MRSA, DPPH.

INTRODUÇÃO

A espécie *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth, sinônimo *Fagelia chelidonioides* Kuntze, é encontrada somente em regiões de altitude elevada. Embora sua composição química e propriedades farmacológicas não tenham sido estudadas cientificamente até o momento, *C. chelidonioides* é muito usada popularmente no Brasil para o tratamento de diferentes tipos de câncer.

O gênero *Calceolaria* L. ocorre na América do Sul, nas regiões de clima tropical e temperado, América Central e Nova Zelândia (Di Fabio et al., 1995; Garbarino et al., 2004). É um gênero rico em espécies de importância econômica, por serem usadas como ornamentais, e etnofarmacologicamente. As partes aéreas são usadas popularmente no Chile por suas propriedades adoçante, digestiva, diurética (Sacchetti et al., 1999) e antimicrobiana no tratamento de estomatites (Sacchetti et al., 1999; Garbarino et al., 2004). Alguns desses usos populares puderam ser comprovados cientificamente.

Baseando-se nos artigos publicados na literatura, pode-se perceber que algumas espécies desse gênero se caracterizam pela presença de substâncias com potencial farmacológico bastante interessante, tais como: inseticida (Khambay; Jewess, 2000), contra *Mycobacterium tuberculosis* (Woldemichael et al., 2003), tripanomicida (ativo contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*) e antitumoral inibindo o crescimento de células tumorais TA3 e células TA3 resistentes a metotrexato (Morello et al., 1995).

Sob o ponto de vista químico, as espécies desse gênero têm sido bem estudadas sendo identificados diferentes diterpenos e bis-diterpenos (Chamy et al., 1989; Chamy et al., 1990; Chamy et al., 1991a) de diferentes esqueletos: pimarano (Chamy et al., 1989; Piovano et al., 1989; Chamy et al., 1990; Chamy et al., 1995a), isopimaradieno (Chamy et al., 1990; Chamy et al., 1998), pimaradieno (Chamy et al., 1991a), labdano (Garbarino et al., 2004), abietano (Chamy et al., 1987; Chamy et al., 1991b), desidroabietano (Chamy et al., 1987; Chamy et al., 1995a), estemodano (Chamy et al.,

Tabela 1. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos caules, flores, raízes, folhas, flores com folhas e flores com folhas e raízes de *Calceolaria chelidonioides* pelo método do DPPH e determinação da CE₅₀.

µg/mL	Controle	Caules	Flores	Raízes	Folhas	Flores e folhas	Flores, folhas e raízes
5	4,57 ± 1,51	5,75 ± 2,58	1,14 ± 0,47	2,2 ± 0,65	1,71 ± 0,24	11,25 ± 0,18	5,43 ± 2,26
10	10,03 ± 3,25	7,23 ± 1,88	3,52 ± 1,62	3,71 ± 0,04	1,8 ± 0,709	14,64 ± 0,51	7,37 ± 3,75
25	28,14 ± 1,37	13,35 ± 2,46	8,91 ± 1,21	10,76 ± 0,87	6,54 ± 0,87	24,09 ± 1,19	15,73 ± 2,56
50	57,02 ± 0,55	26,75 ± 4,43	18,7 ± 0,86	19,56 ± 1,08	11,47 ± 1,22	36,25 ± 1,48	32,42 ± 4,22
125	90,07 ± 0,82	65,14 ± 2,78	46,26 ± 0,97	47,26 ± 0,60	27,88 ± 0,44	76,25 ± 0,39	62,46 ± 1,47
250	95,23 ± 0,43	89,2 ± 0,26	82,92 ± 1,18	82,48 ± 1,67	54,17 ± 0,61	90,72 ± 1,13	89,27 ± 0,60
CE ₅₀	38,91 ± 1,32	122,34 ± 2,78	146,40 ± 0,97	145,18 ± 0,82	229,48 ± 0,68	100,75 ± 0,81	119,36 ± 2,48

Controle positivo: extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761®) nas mesmas concentrações que o extrato.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de flores (EFL), folhas (EFO), caules (EC), raízes (ER), folhas com flores (EFF) e flores com folhas e raízes (EFFR) e das frações das partições em hexano das flores (HF), em diclorometano das flores (DF) e em acetato de etila das flores (AEF) e dos caules (AEC) de *C. chelidonioides* (50mg/mL) investigada pela formação do halo de inibição em diâmetro (cm), usando como controle para as bactérias vancomicina (1mg/mL) e para os fungos, anfotericina B (1mg/mL).

	EFL	EFO	EC	ER	EFF	EFFR	HF	DF	AEF	AEC	Controle
<i>C. albicans</i>	1,3	1,4	-	-	-	-	-	1,1	1,0	1,0	1,7
<i>C. neoformans</i>	0,8	1,1	-	-	-	-	-	1,1	1,0*	0,8	2,2
<i>F. pedrosoi</i>	-	NT	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	1,8
<i>T. rubrum</i>	1,0	NT	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	1,7
<i>S. aureus</i> MRSA	1,6	1,5	-	-	0,8	0,8*	-	1,0	1,0	0,5	1,5
<i>S. epidermidis</i>	1,0	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	0,5	1,1

NT= não testado; - = sem atividade; * = formação de pseudo-halo.

1995b), estemaranos (Chamy et al., 1990; Garbarino; Molinari, 1990a; Garbarino; Molinari, 1990b; Chamy et al., 1991a; Chamy et al., 1995b) e diterpenos endoperóxidos de esqueleto abietano (Chamy et al., 1993); além de flavonóides não glicosilados (Wollenweber; Mann; Roitman, 1989), fenilpropanóides glicosilados (verbascosídeo, calceolariosídeos A-E, forsitosídeo A e isoarenariosídeo) (Nicoletti et al., 1988; Di Fabio et al., 1995) e naftoquinonas (Khambay; Jewess, 2000).

As partes aéreas de *C. chelidonioides* foram avaliadas quanto as atividades antioxidante, utilizando a metodologia do radical livre DPPH e antimicrobiana, frente a bactérias (*Staphylococcus aureus* MRSA e *Staphylococcus epidermidis*) e fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Trichophyton rubrum*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material foi coletado em setembro de 2003 no município de Macabú, no estado do Rio de Janeiro, e identificado botanicamente pela Prof^a. Dr^a. Élsie Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, tendo sido depositada uma amostra neste Herbário. As diferentes partes de *C. chelidonioides* foram separadas (em flores,

folhas, caules, raízes, flores com folhas e flores com folhas e raízes) e secas à temperatura ambiente. As partes da planta foram moídas em moído de facas e submetidas a processo de extração exaustiva por maceração estática com etanol, por 2 meses, renovando-se o solvente a cada 4 dias, obtendo-se dessa forma seis extratos diferentes. Todos os extratos etanólicos foram secos por evaporação sob pressão reduzida para total remoção do solvente. Após secagem, o resíduo vegetal foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). As partições foram novamente evaporadas sob pressão reduzida e então usadas nos testes farmacológicos.

Atividade antioxidante

Foi testada a atividade seqüestrante de radicais livres dos extratos etanólicos das diferentes partes de *C. chelidonioides* utilizando o modelo fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (Mensor et al., 2001). Nesse modelo 1 mL da solução de DPPH foi adicionado a 2,5 mL de uma solução do extrato suspenso em etanol nas concentrações de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, por 30 min, e em seguida a absorbância foi lida em 518 nm. O branco foi feito adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL

de amostra. Como controle negativo usou-se a mistura de 1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de etanol. As atividades antioxidante percentuais foram obtidas por regressão linear para o extrato, chegando-se assim à concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado em 100% (CE₅₀) (Mensor et al., 2001). A atividade antioxidante dos extratos testados foi comparada com a CE₅₀ obtida ao se realizar o mesmo ensaio com o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761®), controle positivo, reconhecido por sua elevada atividade antioxidante. Os testes foram feitos em duplicata.

Atividade antimicrobiana

Todos os extratos etanólicos e as partições em hexano, diclorometano e acetato de etila dos extratos de flores e a partição em acetato de etila dos caules foram testados frente aos fungos: *Candida albicans* sorotipo B ATCC 36802, *Cryptococcus neoformans* T₁-444 sorotipo A (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-SP), *Trichophyton rubrum* T544, *Fonsecaea pedrosoi* 5VPL (coleção de fungos do Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ); e bactérias: *Staphylococcus aureus* MRSA (BMB9393) (Hospital Clementino Fraga Filho da UFRJ) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Foi usada a metodologia de difusão em ágar onde aplica-se o extrato a ser testado diretamente no meio previamente inoculado com o microrganismo, sem a utilização de discos estéreis (Hili; Evans; Veness, 1997). Os extratos foram solubilizados em 500 µl do solvente original e diluídos em 500 µl de água destilada para obtenção de uma concentração final de 50 mg/ml. O controle foi feito com anfotericina B (1 mg/mL) para os fungos e vancomicina (1 mg/mL) para as bactérias. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h a 7 dias, variando em função do microrganismo testado. Após esse período o diâmetro do halo de inibição foi medido com régua, em centímetros. A formação do halo de inibição no local onde foi aplicada a amostra indica a sensibilidade do microrganismo ao mesmo, sendo passível de ocorrer resultados atípicos principalmente em testes com microrganismos mutantes ou resistentes. Neste caso, é observado um halo de inibição mas com a presença de algumas colônias na região; a isto se dá o nome de pseudo-halo (Falcão, 2003). Os testes foram feitos em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antioxidante

A Tabela 1 demonstra a atividade antioxidante dos extratos etanólicos testados em comparação com o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* usado como controle. Todos os extratos demonstraram certa capacidade de seqüestrar radicais livres na metodologia testada, principalmente na maior concentração usada (250 µg/mL), sendo o extrato de

folhas o que apresentou menor potencial. Ao se comparar a concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos extratos com a obtida com o controle, pôde-se observar que nenhum extrato de *C. chelidonioides* foi tão ativo quanto o de *Ginkgo biloba* (EGb 761®). Vale ressaltar que, embora o extrato de flores e folhas tenha apresentado maior CE₅₀ do que o controle, apresentou alta atividade nas menores concentrações (5 e 10 µg/mL), sendo bem superiores às observadas com o *G. biloba* e com os extratos de flores e folhas separadamente, indicando que as substâncias responsáveis pela atividade possivelmente se encontram diluídas nos extratos individualizados ou apresentam efeito sinérgico quando misturadas. O mesmo pode ser observado comparando-se a atividade (CE₅₀) observada para o extrato de flores, folhas e raízes com os respectivos extratos individualizados. Esse efeito sinérgico da atividade é em função da comparação das misturas com os extratos isolados, de uma maneira geral.

Atividade antimicrobiana

A Tabela 2 mostrou a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos etanólicos e partições testadas observada através da formação do halo de inibição do crescimento microbiano em diâmetro (cm). Os extratos etanólicos de caules, raízes e partição hexânica de flores não apresentaram atividade frente aos microrganismos testados. Todos os demais extratos e partições apresentaram atividade frente à cepa de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), sendo o resultado do extrato de flores superior ao do controle e o de folhas, semelhante ao controle feito com vancomicina na concentração de 1mg/mL. Essa atividade é de grande importância devido ao alto grau de patogenicidade e resistência dessa cepa. MRSA é comumente encontrado em hospitais, sendo o principal responsável em casos de infecção hospitalar (Kantzanou et al., 1999). Embora o extrato etanólico de flores tenha sido o que apresentou melhores resultados dentre os testados, esta atividade mostrou-se diminuída ao ser comparado com suas partições, indicando que possivelmente os metabólitos responsáveis pela atividade sejam de maior polaridade, estando retidos na partição butanólica não testada ou devido ao sinergismo entre as diferentes substâncias presentes no extrato etanólico total.

Embora a composição química da espécie ainda não seja conhecida, pode-se esperar a presença de derivados terpenoídicos, principalmente diterpenos, e de origem biossintética mista, flavonóides.

CONCLUSÃO

Os estudos com *C. chelidonioides* estão em fase preliminar, mas indicam grande potencial no controle de *S. aureus* resistente a antibiótico sintético. Os metabólitos responsáveis pela atividade antibacteriana parecem estar presentes em maiores concentrações nas flores e, aqueles

responsáveis pela atividade sequestrante de radicais livres predominam nas flores e folhas, usadas juntamente. Esse estudo colabora, portanto, para o conhecimento de uma espécie originalmente brasileira, até então inédita cientificamente.

REFERÊNCIAS

- Chamy MC, Piovano M, Gambaro V, Garbarino JA, Nicoletti M 1987. Dehydroabietane diterpenoids from *Calceolaria ascendens*. *Phytochemistry* 26: 1763-1765.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Gambaro V, Miranda C 1989. Foliosate, a bis-diterpene and 9-*epi-ent-7,15-isopimaradiene*-derivatives from *Calceolaria foliosa*. *Phytochemistry* 28: 571-574.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Miranda C, Gambaro V 1990. Diterpenes from *Calceolaria lepida*. *Phytochemistry* 29: 2943-2946.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Gambaro V 1991a. Diterpenes from *Calceolaria polifolia*. *Phytochemistry* 30: 3365-3368.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Miranda C, Gambaro V, Rodriguez ML, Ruiz-Perez C, Brito I 1991b. Diterpenoids from *Calceolaria thyrsoflora*. *Phytochemistry* 30: 589-592.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Pascard C, Cesario M 1993. Endoperoxide diterpenes from *Calceolaria purpurea*. *Phytochemistry* 34: 1103-1106.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Chaparro A 1995a. Diterpenoids from *Calceolaria hypericina*. *Phytochemistry* 40: 1209-1212.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Vargas C 1995b. Diterpenoids from *Calceolaria dentata*. *Phytochemistry* 40: 1751-1754.
- Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Amestica MP 1998. Diterpenoids from *Calceolaria glandulifera*. *Phytochemistry* 49: 2595-2597.
- Di Fabio A, Bruni A, Poli F, Garbarino JA, Chamy MC, Piovano M, Nicoletti M 1995. The distribution of phenylpropanoid glycosides in Chilean *Calceolaria* spp. *Biochem Syst Ecol* 23: 179-182.
- Falcão DQ 2003. *Estudo químico e farmacológico de quatro espécies de Hyptis do estado do Rio Grande do Sul*. Rio de Janeiro, 147p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Garbarino JA, Chamy MC, Piovano M, Espinoza L, Belmonte E 2004. Diterpenoids from *Calceolaria inamoena*. *Phytochemistry* 65: 903-908.
- Garbarino JA, Molinari A 1990a. A stemarane diterpene from *Calceolaria kingii*. *Phytochemistry* 29: 3040-3041.
- Garbarino JA, Molinari A 1990b. Diterpenoids from *Calceolaria latifolia*. *Phytochemistry* 29: 3037-3039.
- Hili P, Evans CS, Veness RG 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microb* 24: 269-275.
- Kantzanou M, Panayotis T, Tseleni A, Maniatis AN, Vatopoulos ACE, Legakis NJ 1999. A multi-centre study of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *Int J Antimicrob Agents* 12: 115-119.
- Khambay BPS, Jewess P 2000. The potential of natural naphthoquinones as the basis for a new class of pest control agents - an overview of research at IACR-Rothamsted. *Crop Prot* 19: 597-601.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130.
- Morello A, Pavani M, Garbarino JA, Chamy MC, Frey C, Mantilla J, Guerrero A, Repetto Y, Ferreira J 1995. Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. *Comp Biochem Physiol* 112C: 119-128.
- Nicoletti M, Galeffi C, Messana I, Marini-Bettolo GB, Garbarino JA, Gambaro V 1988. Phenylpropanoid glycosides from *Calceolaria hypericina*. *Phytochemistry* 27: 639-641.
- Piovano M, Chamy MC, Garbarino JA, Gambaro V 1989. 9-*epi-ent-7,15-Isopimaradiene* derivatives from *Calceolaria glandulosa*. *Phytochemistry* 28: 2844 - 2845.
- Sacchetti G, Romagnoli C, Nicoletti M, Di Fabio A, Bruni A, Poli F 1999. Glandular trichomes of *Calceolaria adscendens* Lidl. (Scrophulariaceae): Histochemistry, development and ultrastructure. *Ann Bot* 83: 87-92.
- Woldemichael GM, Franzblau SG, Zhang F, Wang Y, Timmermann BN 2003. Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Med* 69: 628-631.
- Wollenweber E, Mann K, Roitman JN 1989. Flavonoid aglycones excreted by three *Calceolaria* species. *Phytochemistry* 28: 2213-2214.