



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ZILDA CRISTIANI GAZIM

**DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS
CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L. Asteraceae) POR CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM) E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONDIÇÕES DE PLANTIO**

MARINGÁ
2005

ZILDA CRISTIANI GAZIM

**DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS
CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA
(*Calendula officinalis* L. Asteraceae) POR CROMATOGRAFIA GASOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM) E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONDIÇÕES DE PLANTIO**

Dissertação de Mestrado apresentado por Zilda Cristiani Gazim
Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
do Departamento de Farmácia e Farmacologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá como
Parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas, na área de concentração de Produtos
Naturais Biologicamente Ativos

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez.
Co-Orientador: Prof^ª Dr^ª Cláudia Moraes de Rezende

MARINGÁ

2005

Dedico este trabalho

Ao Grande Criador do Universo, que gentilmente Criou todas as plantas dentre elas a calêndula e a Paracelsus fonte de toda inspiração.

AGRADECIMENTOS

Menção especial ao prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortêz do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá pela valiosa orientação; agradeço a oportunidade em me acolher como orientanda e a confiança que depositou em minha pessoa durante estes anos.

À professora Dr^a Cláudia Moraes de Rezende do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório, para que grande parte do experimento pudesse ser realizado.

Aos professores Dr. Celso Vataru Nakamura, Dr. Benedito Prado Dias Filho e Dr^a. Tânia Ueda Nakamura, do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá meus sinceros agradecimentos pela ajuda oportuna.

À professora Lúcia Elaine Ranieri Cortez do departamento de Farmacognosia e Fitoterapia da Universidade Paranaense obrigada pelo incentivo e amizade.

Ao professor e grande amigo Edson Luiz da Silva do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, obrigada pelo apoio.

À amiga Eliete Martins e sua família que me acolheu em sua casa por semanas durante toda a fase experimental no Rio de Janeiro.

À Marinete Martinez Vicentim do laboratório de microbiologia básica, pela ajuda na execução dos ensaios antibacterianos e antifúngicos.

À Universidade Paranaense na pessoa dos professores Ezilda Jacomasi e Edson Roberto Rodrigues que cederam o terreno no horto medicinal, o laboratório e equipamentos para que grande parte do experimento fosse realizado.

Aos senhores José Félix de Oliveira e Isaias Dias funcionários do horto medicinal da Universidade Paranaense pela grande colaboração na fase de plantio, coleta e secagem da calêndula. Meus agradecimentos especiais.

Ao Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva, UNIPAR, pela valiosa ajuda.

À minha mãe e minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
não é motivo para não querê-las...
Que triste os caminhos, se não fora
a presença distante das estrelas.”

Mário Quintana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Histórico	12
1.2	Descrição botânica	13
1.3	Composição química	14
1.4	Atividade farmacológica	15
1.5	Perfumaria	18
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	19
3	METODOLOGIA EMPREGADA	20
3.1	Identificação botânica.....	20
3.2	Local e análise do solo	20
3.3	Plantio e adubação.....	20
3.4	Coleta	21
3.5	Secagem	22
3.5.1	Determinação da perda por secagem.....	23
3.5.2	Determinação da perda por dessecação.....	23
3.6	Extração do óleo essencial das flores de <i>Calendula officinalis</i> L.....	24
3.6.1	Destilação por arraste a vapor	24
3.6.2	Headspace análise.....	25
3.6.2.1	Análise por “headspace” utilizando a técnica por dedo frio (“cold finger”).....	26
3.6.2.2	Análise por “Headspace” por Micro-extração em fase sólida (SPME).....	27
3.7	Índices físico-químicos do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i>	29
3.7.1	Densidade Relativa.....	29
3.7.2	Rotação Ótica	29
3.7.3	Índice de Refração.....	30
3.8	Análise cromatográfica do óleo essencial das flores de <i>Calendula officinalis</i>	30
3.8.1	Instrumentação	30
3.8.1.1	Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR).....	31
3.8.1.2	Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM).....	32

3.9	Pesquisa de Padrão Interno.....	32
3.10	Quantidade do óleo essencial de <i>C. officinalis</i> e do padrão interno a serem injetados no cromatógrafo	33
3.11	Análise quantitativa dos constituintes químicos da fração volátil obtida por arraste a vapor...33	
3.12	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>C. officinalis</i>	34
3.13	Ensaio microbiológicos.....	35
3.13.1	Microorganismos Utilizados e Condições de Crescimento.....	35
3.13.2	Padronização da Suspensão bacteriana e Fúngica.....	35
3.13.3	Preparo das Drogas Controle.....	36
3.13.4	Método de Microdiluição em Caldo.....	38
3.13.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	38
3.13.4.2	Determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM ou CFM).....	39
3.13.5	Método de difusão em disco de papel.....	40
3.13.6	Padronização do inóculo	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Plantio.....	42
4.2	Germinação e Inflorescência.....	44
4.3	Controle de Pragas e Doenças.....	45
4.4	Coleta	45
4.5	Secagem	47
4.5.1	Perda de água por secagem.....	48
4.5.2	Determinação da perda por dessecação.....	49
4.6	Extração do óleo essencial das flores de <i>C. officinalis</i> por destilação por arraste a vapor.....	50
4.7	Índices físico-químicos.....	51
4.8	Análise cromatográfica do óleo essencial das flores de <i>C. officinalis</i>	52
4.9	Instrumentação	53
4.10	Escolha do padrão interno utilizado para análise.....	53
4.11	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i>	55

4.12	Identificação dos constituintes químicos da fração volátil de <i>C. officinalis</i> obtido pela técnica de arraste a vapor por CGAR-EM.....	56
4.13	Análise quantitativa dos constituintes químicos da fração volátil obtida pela técnica de arraste a vapor em função área total % e da quantidade do padrão tridecano (CGAR).....	58
4.14	Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da <i>C. officinalis</i> obtido por análise por “headspace”.....	59
4.14.1	Análise por “headspace” obtido pela técnica de dedo frio (cold finger).....	59
4.14.2	Análise do headspace pela técnica de micro-extração em fase sólida (SPME).....	61
4.14.3	Estudo comparativo da identificação dos constituintes químicos da fração volátil da <i>Calendula officinalis</i> pelas técnicas de: Arraste a vapor e Análise por “Headspace” utilizando as técnicas de SPME e Dedo Frio “cold finger”.....	66
4.15	Fórmula estrutural, espectro de massa obtido por CG/EM e espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995) dos componentes majoritários da fração volátil obtida por arraste a vapor e headspace.	69
4.15.1	Alfa-muuroleno	69
4.15.2	Gama-cadineno.....	70
4.15.3	Delta-cadineno.....	70
4.15.4	Viridiflorol	71
4.15.5	Epi-alfa-muurolol	71
4.15.6	Alfa-cadinol	72
4.15.7	Alfa-copaeno	72
4.15.8	Gama-muuroleno.....	73
4.15.9	Beta-cariofileno	73
4.16	Determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>C. officinalis</i>	74
4.16.1	Atividade antimicrobiana do óleo pelo método de microdiluição com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	74
4.16.2	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>C. officinalis</i> pelo método de difusão em disco.	75
4.17	Comparação dos constituintes químicos encontrados na fração volátil pesquisada com a literatura (CHALCHAT et al., 1991).	77
4.17.1	Cromatograma da fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).	77
4.17.2	Identificação das substâncias presentes na fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).....	78
5	CONCLUSÃO	80
6	REFERÊNCIAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de análise por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) para análise quantitativa da fração volátil de <i>C. officinalis</i> obtido por destilação a arraste a vapor.	31
Tabela 2: Condições de análise por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR –EM) para análise qualitativa da fração volátil de <i>C. officinalis</i> obtido por destilação a arraste a vapor, análise por “ <i>headspace</i> ” (dedo frio, SPME).	32
Tabela 3: Análise do solo: pH.	42
Tabela 4: Análise do solo: concentração de elementos químicos.	42
Tabela 5: Variações do teor de umidade em órgãos frescos e órgãos transformados em drogas.	48
Tabela 6: Determinação da perda por secagem das flores de <i>C. officinalis</i>	49
Tabela 7: Determinação da perda por dessecação das flores de <i>C. officinalis</i>	49
Tabela 8: Índices físico-químicos do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i>	51
Tabela 9: Padrões de destilação (rendimento de óleo na planta/ quantidade de amostra/ quantidade de água/ tempo de destilação/ rendimento de óleo essencial/ min).	52
Tabela 10: Compostos identificados da fração volátil de <i>Calendula officinalis</i>	57
Tabela 11: Quantificação dos constituintes químicos da fração volátil de <i>Calendula officinalis</i> obtido pela técnica de arraste a vapor.	58
Tabela 12: Identificação da fração volátil da <i>C. officinalis</i> pela técnica de headspace por dedo frio.	60
Tabela 13: Tipos de fases estacionárias para agulhas de SPME.	64
Tabela 14: Identificação da fração volátil da <i>C. officinalis</i> por HS-SPME.	65
Tabela 15: Comparação dos constituintes químicos da fração volátil da <i>C. officinalis</i> obtidos pelas três técnicas de separação.	68
Tabela 16: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial e <i>C. officinalis</i>	74
Tabela 17: Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>C. officinalis</i>	76
Tabela 18: Identificação das substâncias presentes na fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto das flores na época de coleta.....	21
Figura 2: Visão panorâmica do canteiro.....	22
Figura 3: Secagem em esteira.....	22
Figura 4: Secagem em estufa.....	22
Figura 5: Aparelho tipo Clevenger modificado.....	24
Figura 6: Material vegetal para extração.....	25
Figura 7: Análise por “ <i>headspace</i> ” utilizando a técnica por dedo frio (ACREE; TEANISHI, 1993).....	26
Figura 8: Análise por “ <i>Headspace</i> ” por dedo frio.....	27
Figura 9: Concentração da fração de diclorometano.....	27
Figura 10: Análise por “ <i>Headspace</i> ” por SPME.....	27
Figura 11: Análise por “ <i>headspace</i> ” por SPME.....	27
Figura 12: Manuseio da seringa no processo de extração (A, B, C) e dessorção no injetor do cromatógrafo (D). 29	
Figura 13: Esquema para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em microplaca.....	40
Figura 14: Semente variedade “orange gutana” cor cinza.....	43
Figura 15: Semente variedade “orange gutana” cor caramelo claro.....	43
Figura 16: Flores de <i>C. officinalis</i> em diferentes estágios de desenvolvimento.....	45
Figura 17: Época de coleta.....	46
Figura 18: Estágio de desenvolvimento da flor para a coleta.....	47
Figura 19: Destilação do Óleo essencial de <i>C. officinalis</i> por destilação por arraste a vapor.....	50
Figura 20: Cromatograma da fração volátil de <i>Calendula officinalis</i> indicando o local ideal para adição do padrão interno.....	54
Figura 21: Cromatograma do padrão (tridecano) e do óleo essencial de <i>C. Officinalis</i> para identificação dos picos.....	55
Figura 22: Cromatograma da série homóloga de hidrocarbonetos n-C ₉ (nonano) a n-C ₃₀ (triacontano).....	56
Figura 23: Cromatograma da fração volátil da <i>Calendula officinalis</i> obtido pela técnica de headspace por dedo frio.....	60
Figura 24: Cromatograma da fração volátil obtida por HS-SPME.....	65
Figura 25: Estrutura química do alfa-muuroлено.....	69
Figura 26: Espectro de massa do alfa-muuroлено obtido por CG/EM.....	69
Figura 27: Estrutura química do gama-cadineno.....	70
Figura 28: Espectro de massa do gama-cadineno obtido por CG/MS.....	70
Figura 29: Estrutura química do delta-cadineno.....	70
Figura 30: Espectro de massa do delta-cadineno obtido por CG/MS.....	70
Figura 31: Estrutura química do viridiflorol.....	71
Figura 32: Espectro de massa do viridiflorol obtido por CG/EM.....	71
Figura 33: Estrutura química do epi-alfa-muurolol.....	71
Figura 34: Espectro de massa epi-alfa-muurolol obtido por CG/MS.....	71

Figura 35: Estrutura química do alfa-cadinol.....	72
Figura 36: Espectro de massas do alfa-cadinol obtido por CG/MS.....	72
Figura 37: Estrutura química do alfa-copaeno.....	72
Figura 38: Espectro de massa do alfa-copaene obtido por CG/MS.....	72
Figura 39: Estrutura química do gama-muuroleno.....	73
Figura 40: Espectro de massa do gama-muuroleno obtido por CG/MS.....	73
Figura 41: Estrutura química do beta-cariofileno.....	73
Figura 42: Espectro de massa do beta-cariofileno obtido por CG/MS.....	73
Figura 43: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i> em <i>S. aureus</i>	75
Figura 44: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i> contra <i>B. subtilis</i>	75
Figura 45: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i> contra <i>E.coli</i>	76
Figura 46: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de <i>Calendula officinalis</i> contra <i>P. aeruginosa</i>	76
Figura 47: Cromatograma da fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS

AMH	Ágar Müller-Hinton
ASD	Ágar Sabouraud-dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMH	Caldo Müeller-Hinton
DB5	Coluna com 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano
DIC	Detector de Ionização em Chamas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
HS-SPME	Headspace por Micro Extração em Fase Sólida
HS-Cold finger	Headspace por dedo frio
IK	Índice de Kowáts
IRR	Índice de Retenção Relativo
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
CAR/PDMS	Carboxeno/Polidimetilsiloxano
CW/TPR	Carbowax/Resina Temperada
PDMS/DVB/CAR/PDMS	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano
SPME	Micro Extração em Fase Sólida
TR	Tempo de Retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SÍMBOLOS

Na_2SO_4	Tiosulfato de sódio
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica
d_{20}^{20}	Densidade relativa
n_D^{20}	Índice de refração

UNIDADES

μl	microlítros
μg	microgramas
mg	miligramas
μm	mícom
ml	mililitro
mm	milímetro

RESUMO

A *Calendula officinalis* (Asteraceae) é uma planta medicinal com extenso uso terapêutico devido sua atividade antiinflamatória, cicatrizante, antiedematosa, imunomodulatória, antimicrobiana (antibacteriana, antiviral e antifúngica) e na perfumaria. Trata-se de uma planta originária do Egito e Europa e aclimatada na região sul do Brasil. No presente trabalho a *C. officinalis* foi produzida na região Noroeste do estado do Paraná Brasil, e as técnicas utilizadas para plantio, coleta, secagem das flores seguiram as condições descritas na literatura. A fração volátil das flores da *C. officinalis* foi isolado por destilação por arraste a vapor e análise por “*Headspace*” utilizando duas técnicas diferentes: micro extração em fase sólida (SPME) e dedo frio “cold finger”, e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A composição química obtida pelas diferentes técnicas mostrou uma variação qualitativa da fração volátil. Após identificação, verificou-se que os componentes majoritários encontrados na fração volátil por destilação por arraste a vapor foram sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois: δ -cadineno (14,33%), γ -cadineno (7,24%), α -muuroleno (4,06%), viridiflorol (3,07%), Epi- α -muurolol (12,09%), α -cadinol (20,67%). E a análise por “*headspace*” mostrou a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos: α -coapeno (15,20%), γ -muuroleno (5,29%), α -muuroleno (6,18%), γ -cadineno (25,49%) e δ -cadineno (22,12%). Através da cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e utilizando um padrão interno (tridecano) foi possível quantificar os constituintes da fração volátil das flores de *C. Officinalis*: δ -cadineno (0,460 μg); γ -cadineno (0,172 μg); Epi- α -muurolol (0,238 μg) e α -cadinol (0,657 μg). A análise microbiológica da fração volátil de *C. Officinalis* foi determinada por microdiluição em caldo e difusão em disco de papel contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* e a levedura *Candida albicans*. O óleo essencial apresentou uma atividade inibitória moderada em *S. aureus* e *B. subtilis* com uma concentração inibitória mínima (CIM de 315 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) através da técnica de microdiluição em caldo e inativo em *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* e *C. albicans* (CIM> 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Na técnica de difusão em disco, apresentou inibição moderada para *S. aureus* e *B. subtilis* com halo de inibição de 11 mm e 19 mm respectivamente.

Palavras chaves: *Calendula officinalis* L.(Asteraceae), Fração volátil, CG/EM, HS-SPME, HS-Cold Finger, *S. aureus*,*B. subtilis* , δ -cadineno, α -cadinol.

ABSTRACT

ABSTRACT

Calendula officinalis (Asteraceae) is a medicinal plant of therapeutic and perfumery use due to its anti-inflammatory, healing, antiedematous, immunomodulatory, and antimicrobial (antibacterial, antiviral and antifungal) activity. This plant is originated from Egypt and Europe and acclimated in the south region of Brazil. In this study, *C. officinalis* was produced in the Northeast region of Paraná state, Brazil, and the techniques used for plantation, that is, collecting, and dryness of the flowers, were performed according to the condition described in the literature. The volatile fraction of the flowers of *C. officinalis* was isolated by using steam distillation, and the analysis was carried out through 'Headspace', using two different techniques: solid phase micro extraction (SPME) and cold finger, and analyzed by mass spectrometry gas chromatographic (CG/EM). The chemical composition obtained with the different techniques showed a qualitative range of the volatile fraction. After identification, it was observed that the major components found in the volatile fraction by using steam distillation embraced hydrocarbon sesquiterpens and alcohol: δ -cadinene (14.33%), γ -cadinene (7.24%), α -muurolene (4.06%), viridiflorol (3.07%), Epi- α -muurolol (12.09%), α -cadinol (20.67%). The analysis by 'headspace' showed the presence of hydrocarbon sesquiterpens: α -copaene (15.20%), γ -muurolene (5.29%), α -muurolene (6.18%), γ -cadinene (25.49%), and δ -cadinene (22.12%). Through the gas chromatography of high resolution (GCHR) and with the use of an internal standard (tridecane) it was possible to quantify the constituents of the volatile fraction of the *C. officinalis* flowers: δ -cadinene (0.460 μ g; γ -cadinene (0.172 μ g); Epi- α -muurolol (0.238 μ g) and α -cadinol (0.657 μ g). The microbiological analysis of the volatile fraction of *C. officinalis* was determined by microdilution in broth, and diffusion in paper disk against the following bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis* and the leaven known as *Candida albicans*. The essential oil showed a mild inhibitory activity in *S. aureus* and *B. subtilis* with a minimum inhibitory concentration (MIC of 315 μ g.mL⁻¹) by using the microdilution technique in broth, and inactive in *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* and *C. albicans* (MIC > 1000 μ g.mL⁻¹). The disk diffusion technique showed a mild inhibition for *S. aureus* and *B. subtilis* with halo of inhibition of 11 mm and 19 mm, respectively.

Key-words: *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Volatile fraction. CG/EM. HS-SPME. HS-Cold Finger. *S. aureus*. *B. subtilis*. δ -cadinene. α -cadinol.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A *Calendula officinalis* é originária do Egito. Suas virtudes são conhecidas desde a antiguidade. Foi importada no século XII para a Europa, sendo cultivada pelos gregos (SALLÉ, 1996). Sua denominação botânica origina do latim, *kalendulae*, que representa o 1º dia do mês do calendário romano, em virtude desta planta florescer no início da maioria dos meses do ano. Os romanos a denominaram *solsequium*, que significa seguidora do sol, já que suas flores se abrem ao raiar do sol e fecham quando o sol se põe (ALONSO, 1998).

Suas pétalas secas foram empregadas substituindo o açafrão por gregos e romanos devido a grande concentração de carotenóide em suas pétalas. Os árabes a acrescentavam à ração dos cavalos de raça por acreditarem que aumentava a força dos vasos sanguíneos. Isto foi confirmado por Patrick et al. (1996) sugerindo seu poder cicatrizante e antiinflamatório ao estímulo da formação de novos vasos sanguíneos pela *C. officinalis* (SCHULZ et al., 2001).

Os espanhóis a consideravam mágica e os feiticeiros a usavam como talismã. Na idade média foi muito utilizada, sendo recomendada pela abadesa Hildegarda de Bengen (1099-1179) para o tratamento de impetigo do couro cabeludo e manchas da pele (ALONSO, 1998). Albert o grande utilizava-a contra as picadas de serpentes (SALLÉ, 1996) sendo incorporada em praticamente todos os textos herbários da época. O padre Sebastian Kneipp (1821-1897) recomendava a aplicação externa de calêndula em úlceras, varizes e manchas de pele de todos os tipos. Tanto durante a guerra civil norte-americana, como durante a primeira guerra mundial, se usaram unguentos e pomadas de *C. officinalis* como antiinflamatório e anti-séptico de feridas. Vários relatos citam a exportação de grandes quantidades de *C.*

officinalis cultivada em Sussex (Inglaterra) aos hospitais de campanha localizados na França (ALONSO, 1998).

Devido a que suas pétalas se assemelharem a raios de glória, esta flor foi consagrada e reverenciada pelos devotos à Virgem Maria. Atualmente, na Índia, de acordo com uma velha tradição, se fazem grinaldas com flores de calêndula em honra às divindades Mahadevi e Durga (ALONSO, 1998).

1.2 Descrição botânica

A *C. officinalis* pertence à família Asteraceae (CORREA JÚNIOR et al., 1991); é uma planta anual que mede cerca de 50 cm de altura (SILVA, 1995); talos erectos e ramificados, folhas oblongo-lanceoladas, pilosas por ambas as faces (ALONSO, 1998). As flores possuem 4 a 5 cm de diâmetro e dão na extremidade de haste com 35 a 70 cm. O botão central das flores é rodeado por 15 a 20 lígulas coloridas. Os frutos, tipo aquênio, são curvos e providos de protuberâncias no dorso e crenados na face ventral (CORREA JÚNIOR et al., 1991). As flores são de coloração amarelo alaranjada (GRIEVES, 1982). As pétalas centrais das flores são tubulosas e as periféricas são liguladas (FRANCO, 1999).

Esta planta floresce quase o ano todo, exceto em períodos de estiagem. É grandemente cultivada em toda zona temperada do mundo, também como planta ornamental (CORREA JÚNIOR et al., 1991). É muito sensível à falta de água nos períodos de estiagem, ocorrendo um comprometimento de sua produtividade (SILVA JÚNIOR, 1997). Temperaturas noturnas muito elevadas diminuem o tamanho das flores (CORREA JÚNIOR et al., 1991).

Popularmente é conhecida como calêndula, bem-me-quer, calendula-das-boticas, margarida-dourada, maravilha-dos-jardins, mal-me-quer (SILVA JÚNIOR, 1997), bem me

quer de todos os meses, malmequer amarelo, malmequer do campo, mal me quer dos jardins, malmequeres, maravilha, verrucária (CORREA JÚNIOR et al., 1991).

1.3 Composição química

As flores possuem saponinas triterpênicas (2 a 10%); terpenos (ALONSO, 1998); flavonóides: derivados do quercetol (quercetina-3-*O*- glicosídeo: isoramnetina-3-*orto*-glicosídeo e isoramnetina-3-*orto*-rutinosídeo (PIETTA et al., 1992), derivados glicosídeos (dissacarídeos, trissacarídeos); derivados da aglicona (PIETTA et al., 1994); quercetina: quercetinaglicosídeos; hidroxycumarinas: escopoletina, umbelliferona, esculetina (PDR, 2000); carotenóides: calendulina, caroteno, licopeno, rubixantina, violaxantina, zeína; álcoois triterpênicos pentacíclicos: arnidiol, faradiol, ácido faradiol-3-mirístico, lupeol, taraxasterol, ácido faradiol-3-palmítico (STEVENSON, 1961 e ALONSO, 1998); triterpenos pentacíclicos trihidroxialcoois: oleoano-12-eno-3 β ,16 β ,28-triol; lupano-20(29)-eno-3 β ,16 β ,28-triol; taraxano-20-eno-3 β ,16 β ,22- α -triol; taraxano-20-eno-3 β ,16 β ,30-triol e ursano-12-eno 3 β ,16 β ,21-triol (WILKOMIRSKI, 1985); polissacarídeos: ramno-arabino-galactano e dois arabinogalactanos; ácido málico (6,8%); mucilagem (1,5%); resinas; substância amarga: calendeno ou calendina; taninos; poliacetilenos; esteróis: sitosterol, estigmasterol, isofucoesterol, campesterol, metil-enecholesterol e colesterol; ácido salicílico; glicosídeo sesquiterpênico: arvósido A; inulina e um óleo volátil (0,1- 0,2%) muito abundante em sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois, tendo como constituintes químicos carvona, geranilacetona, mentona, isomentona, cariofileno, α e β -ionona (0,2%) (ALONSO, 1998), α -cadinol, Epi- α -cadinol, δ -cadineno, γ -cadineno, γ -cadinol, oplopanona, α -muurolol (CHALCHAT et al., 1991; PDR, 2000; RADULESCU et al., 2000; CRABAS et al., 2003), 6-epoxido, 2 cadinols (GRACZA, 1986). Este também é chamado de marigold absoluto, calêndula absoluto. O termo calêndula absoluto vem da verdadeira *C. officinalis*

provavelmente produzida na França, mas vendida em países de língua inglesa com o nome de marigold. O óleo absoluto extraído das línguas floridas, é um líquido muito viscoso, de uma coloração verde escura com um intenso odor herbáceo amargo (ARCTANDER, 1960).

1.4 Atividade farmacológica

As atividades farmacológicas da *C. officinalis* são muitas e estão contidos em numerosos estudos que indicam: atividade antiinflamatória de ésteres triterpeníol (faradiol-3-ester mirístico, ester palmítico 3-faradiol e Ψ -taraxasterol) presentes nas flores. A atividade antiedematosa destas três substâncias foram determinadas pela inibição que exercem sobre a ação do óleo de cróton utilizado para induzir edemas em orelhas de camundongos (DELLA LOGGIA, 1994). Outras publicações reforçam as propriedades antiinflamatória das flores atribuídas aos ésteres triterpenóides de ácidos graxos, dentre estes os lauril, miristoil e palmitoil ester de faradiol que são os mais abundantes (HAMBURGER et al., 2003). Akihisa et al. (1996) verificaram a presença de 11 álcoois triterpênicos presentes em algumas plantas da família da Asteraceae, dentre elas a *C. officinalis* (helialol, taraxasterol, Ψ -taraxasterol, α -amirina, β -amirina, lupeol, taraxerol, cicloartenol, 24-metilenecicloartanol, tirucalla-7,24-dienol e dammaradienol). Em todas as plantas pesquisadas, o componente majoritário foi o helianol (29-86%) que foi isolado e verificado sua atividade antiinflamatória contra o acetato de 12-*o*-tetradecanoilforbol-13 (substância indutora de inflamação em orelhas e promoção de tumor de pele em rato). O helianol provocou uma redução de 50% do processo inflamatório na orelha e na pele dos camundongos (PDR, 2000). Atividade regenerativa e reepitelização: estudos realizados por Klouček Popova et al. (1982) demonstraram a influência da *C. officinalis* aplicada em forma de pomada na regeneração e epitelialização da pele, aumentando o metabolismo das glicoproteínas, nucleoproteínas e colágeno durante o período de regeneração dos tecidos. Estudos histológicos em lesões de tecidos com aplicação de *C.*

officinalis na forma pomada foram analisados em 8 h, 24 h e 48 h de aplicação, mostrando a regeneração das lesões. Também foi observado por Patrick et al. (1996) que o extrato de *C. officinalis* induziu a formação de vasos sanguíneos, sendo este achado muito importante no processo de granulação (PDR, 2000; SCHULZ et al., 2001). Os sesquiterpenos componentes majoritários da fração volátil da *C. officinalis* são importante classe de compostos antiinflamatórios naturais descrito por Veiga et al. (2001). A Atividade imunomodulatória foi estudada por Amirghofran et al. (2000), onde extrato de *C. officinalis* mostrou estimulação na granulocitose e uma excelente atividade anti-tumoral, por estimular a proliferação de linfócitos e este sistema estimulatório ocorre com o envolvimento da ativação das células T. Atividade antimutagênica da *C. officinalis* foi verificada em estudos realizados por Elias et al. (1990), onde isolaram e identificaram 30 saponinas avaliando-se sua atividade mutagênica e antimutagênica utilizando técnicas de incubação de líquido modificado de *Salmonella typhimurium*. A atividade antiviral é motivo de muitos estudos por muitos laboratórios no intuito de descobrir novos agentes antivirais que interferem na imunodeficiência humana. A análise do extrato orgânico das flores secas exibiu potente ação anti-HIV *in vitro* causando uma reversão da atividade de transcrição do HIV-1. Testes antivirais utilizando o ácido glicosídeo oleanóico presentes nas flores demonstraram efeito inibitório contra o vírus *Vesicular stomatitis* (VSV). Culturas de *Rhinovirus* (HRV) tiveram afetadas significativamente sua replicação (PDR, 2000). Kalvatchev et al. (1997), utilizaram o extrato orgânico das flores verificando um efeito citoprotetor deste extrato em humanos infectados com o vírus HIV-1, concluindo os trabalhos com a propriedade anti-HIV-1 pelo extrato de *C. officinalis*.

Atividade antimicrobiana: numerosos estudos buscam encontrar produtos naturais e derivados de compostos naturais para serem usados na prevenção de contaminação de alimentos. Algumas espécies são conhecidas por possuírem óleos essenciais com atividade

antimicrobiana comprovada como o eugenol, allicina, aldeído cinâmico (HSIEH et al, 2001). Foi verificada atividade antimicrobiana de dois alcalóides terpênicos, lactonas e flavonóides presentes no óleo essencial de *C. officinalis*; os flavonóides isolados das flores demonstraram atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* (DUMENIL et al., 1980). Outros estudos mostraram que os flavonóides são efetivos contra *Klebsiella pneumoniae*, *Sarcina lutea* e *Candida monosa* (PDR, 2000). Dumenil et al. (1980) avaliaram a atividade antimicrobiana da tintura de *C. officinalis* em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*. Os resultados demonstraram uma atividade contra *S. aureus*, *S. fecalis*, e dentre estes dois uma maior atividade contra o *S. aureus*. Muito utilizada para tratamento de leucorréia pela medicina popular, pode ser observado uma atividade tricomonocida atribuída a terpenos álcoois e lactonas presentes na fração óleo essencial das flores (GRACZA, 1986). Foi verificado atividade moluscicida no controle da esquistossomose pelas saponinas (álcoois triterpênicos pentacíclicos) (HELALY et al., 1998). A fração volátil da *C. officinalis* mostrou atividade nematocida reduzindo nematóides produzidos em ratos (PEREZ et al., 2003). Atividade genotóxica verificada em extrato de folhas, flores e da planta toda mostraram efeito citotóxico em três tipos de células: MRC5, Hep2 e células ascíticos no tumor de Ehrlich. Um dos extratos rico em saponinas desenvolveu atividade antitumoral in vivo em tumor Ehrlich em ratos (RAMOS et al., 1998). Estudos feitos por Vargas et al. (1998), demonstraram uma redução de 10% na diarreia em ratos, quando comparada com óleo de rícino utilizando a Calêndula em decoctos. Os constituintes majoritários da fração volátil (δ -cadineno) apresentam atividade larvicida contra *Culex pipiens*, *Musca domestica* e *Ceratidis capitata* larvae (EL-SHAZLY; HUSSEIN, 2003), e atividade antibacteriana em *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, verificado em testes de difusão em disco (HAZNEDAROGLU et al., 2001). O δ -cadineno também possui atividade antibacteriana contra *Xanthomonas campestris*

pv. *Malvacearum* (Smith) que ataca o algodão (ESSENBERG, 1994; DAVIS et al., 1995; WANG et al., 2003). Os componentes majoritários da fração volátil (α -copaeno, γ -cadineno, δ -cadineno e α -cadinol) apresentaram atividade anti-plasmódica contra o *P. falciparum* agente causador da malária (BOYOM et al., 2003).

1.5 Perfumaria

Na perfumaria é utilizado na composição de vários perfumes. O aroma característico das flores de calêndula são associados aos sesquiterpenos presentes na fração volátil dentre estes o δ -cadineno conferindo as notas verdes, doce e refrescantes; e o α -cadinol responsável pelas notas amadeiradas (REZNICEK; ZITTERL-EGLESEER, 2003). Seu odor herbáceo amargo intenso possui notas únicas, e são compostas com fragrâncias com notas naturais de crisântemo, são muito interessantes em composição com musgo de carvalho, extrato de mate, extrato de chá verde, cicpriol, isociclocitral; traços de calêndula absoluto podem ser usados com jacinto, lírio, gardênia, musgo, etc (ARCTANDER, 1960). Os principais perfumes que contém marigold absoluto são Eternity (C. Klein[®]); Romance (Ralph Lauren[®]); Dolce & Gabbana (Dolce & Gabbana[®]); Ravello e Giorgio (Beverly Hills[®]); Beautiful (Ester Lauder[®]); Lou Lou (Cacharel[®]); Hugo Deep Red (Hugo Boss[®]); Anthracite eau de toilette (Jacomo[®]), dentre outros.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

- Obtenção do material volátil presente nas flores de *C. officinalis* (preparo do solo, plantio, coleta, secagem e extração).
- Determinar a composição química dos constituintes químicos da fração volátil por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) presente nas flores de *C. officinalis* cultivada na Região Noroeste do Paraná.
- Determinar a atividade antimicrobiana da fração volátil extraído das flores de *C. officinalis* visto ao grande avanço do uso de óleos essenciais na conservação de alimentos, contrapondo-se ao uso de substâncias químicas sintéticas e altamente nocivas ao organismo.
- Obter os constituintes químicos do óleo essencial por dois processos de extração: destilação por arraste em aparelho de Clevenger modificado e análise por “*headspace*”, utilizando as técnicas de micro extração em fase sólida (SPME) e dedo frio “cold finger”.

3 METODOLOGIA EMPREGADA

3.1 Identificação botânica

A identificação da *Calendula officinalis* foi realizada pela bióloga Ezilda Jacomasi (horto medicinal da Universidade Paranaense) e a exsicata está depositada no herbario da Unipar sob o nº 1311.

3.2 Local e análise do solo

A implantação da cultura da *C. officinalis* foi realizado num terreno de 34,5 m² localizado no Horto Medicinal da Universidade Paranaense-UNIPAR, na Cidade de Umuarama, região Noroeste do Estado do Paraná.

As amostras de solo para análise foram coletadas em duas partes do terreno, a uma profundidade de 20 cm em diferentes pontos resultando em duas amostras compostas (amostras 1 e 2). A análise do solo foi realizada no Laboratório de Solos-Integrante Cela-PR do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá. Os valores de pH e as concentrações dos elementos químicos encontrados no solo estão nas Tabelas 3 e 4 apresentadas em resultados e discussão.

3.3 Plantio e adubação

O plantio ocorreu em 30/04/04 (início do outono), que coincidiu com temperaturas mais amenas. As mudas foram obtidas a partir de sementes da variedade orange guitana. As sementes foram obtidas da empresa SEMENTES SEMEX especializada no comércio de sementes. O plantio foi realizado em sistema de semeadura direta no campo em linha (MONTANARI JÚNIOR, 1992; MONTANARI JUNIOR, 2000), e em canteiros, que é

recomendado para as espécies de ciclo curto e porte pequeno a médio (até 1,0 m), como a *C. officinalis* (CORREA JÚNIOR et al., 1991). Os canteiros foram levantados com 1,0 m de largura, e separados por covas para facilitar o escoamento das águas da chuva; três linhas com espaçamento de 0,40 m foram levantadas nestes canteiros, e sobre estas linhas foram feitas as covas adotando-se uma distância de 0,30 m entre estas e com profundidade de 0,02 m (2 cm) onde foram plantadas três sementes por covas (MONTANARI JUNIOR, 2000).

3.4 Coleta

A coleta iniciou-se em 20/07/04, três meses após o plantio, quando as flores estavam no seu desenvolvimento máximo (OLIVEIRA, 1998), e já havia indícios de polinização (CORREA JÚNIOR et al, 1991) como pode ser verificado na Figura 1.



Figura 1: Aspecto das flores na época de coleta

O horário da coleta das flores foi diariamente no período da manhã (7:30H) e ao entardecer (18:00H) (SIMÕES, 2001), evitou-se coletar nos dias chuvosos e tomando-se cuidado para esperar que todo o orvalho evaporasse antes da coleta.

As flores foram colhidas manualmente, com o pedúnculo o mais curto possível (MONTANARI JUNIOR, 2000).



Figura 2: Visão panorâmica do canteiro.

3.5 Secagem

A secagem das flores foi em esteiras à sombra e temperatura ambiente (Figura 3) e em estufas de ar circulante a temperatura de 35°C como mostra a Figura 4. As flores foram acondicionadas em camadas finas e durante a secagem não foram revolvidas por um período de 10 dias segundo resultados obtidos na determinação de perda de água por secagem (Tabela 6) e perda de água por dessecação (Tabela 7).

Nesta fase do trabalho foi determinado a perda de água por secagem e a perda de água por dessecação.



Figura 3: Secagem em esteira.



Figura 4: Secagem em estufa.

3.5.1 Determinação da perda por secagem

Cinco amostras com cerca de 27,0 g exatamente pesados, das flores frescas foram colocados para secar a temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, através da média de cinco determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) e calculado pela equação 3.5.1

$$X = \frac{P_f \times 100\%}{P_i} \quad \text{equação 3.5.1}$$

Onde:

P_f = peso da amostra seca

P_i = peso da amostra fresca

3.5.2 Determinação da perda por dessecação

Foram pesados exatamente 2,0 g das flores secas, em pesa-filtro de vidro previamente dessecado e tarado nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Os pesa-filtros foram colocados na estufa por 2 horas à 105 °C, após foi resfriado em dessecador e pesado. A operação foi repetida até peso constante. Os valores representam a média de 5 determinações e são expressos em % (p/p), calculados pela fórmula abaixo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad \text{equação 3.5.2}$$

Onde:

P_a = peso da amostra

P_u = peso do pesa-filtro contendo amostra antes da dessecação,

P_s = peso do pesa-filtro contendo amostra após a dessecação.

3.6 Extração do óleo essencial das flores de *Calendula officinalis* L.

3.6.1 Destilação por arraste a vapor

A técnica utilizada foi destilação por arraste a vapor com cooção em aparelho tipo Clevenger modificado conforme Figura 5 (WAGNER et al., 1984; PORTE, 2000; ALIGIANNIS et al., 2001; HAZNEDAROGLU; KARABAY, 2001; RASOOLI; MIRMOSTAFA, 2003; ADAMS et al., 2004). O óleo essencial de *C. officinalis* pode ser convenientemente obtido pelo processo de destilação por arraste a vapor (CHALCHAT, 1991; RADULESCU et al, 2000).



Figura 5: Aparelho tipo Clevenger modificado.

Foi feita a destilação das lígulas secas (Figura 6); estas foram separadas do receptáculo floral, e pesados 50 g de planta e 500 ml de água destilada.



Figura 6: Material vegetal para extração.

A destilação ocorreu durante 3 h. O óleo foi retirado do aparelho com hexano (P.A) e foi filtrado com Na_2SO_4 anidro (SIMÕES, 2001), armazenado em frasco escuro, sob refrigeração e aberto para evaporar o hexano. Posteriormente foi preparada amostra com o padrão interno, conforme descrito no item 3.10.

3.6.2 Análise por “Headspace”.

Para o experimento, utilizou-se duas técnicas diferentes de análise por “headspace” utilizando as técnicas por dedo frio “cold-finger” como pode ser verificado na Figura 7 (ACREE; TEANISHI, 1993; REZENDE et al., 1999; REZENDE et al., 2004) e por micro extração em fase sólida (SPME) (TORQUILHO, 2001; JIROVETS et al., 2002; KIM; LEE, 2002; LEE et al., 2003).

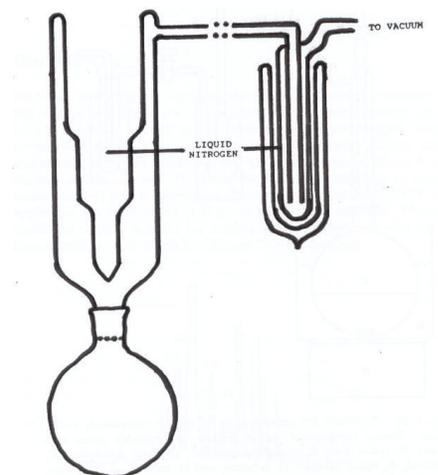


Figura 7: Análise por “headspace” utilizando a técnica por dedo frio (ACREE; TEANISHI, 1993).

3.6.2.1 Análise por “headspace” utilizando a técnica por dedo frio (“cold finger”)

Dentro do balão foi adicionado 20 g de flores de calêndula pulverizadas, e dentro do dedo frio foi adicionado gelo seco, que durante todo o processo foi sendo recarregado. A cada 10 min. procedeu-se a raspagem do dedo frio, lavando com diclorometano e recolhendo o material que foi mantido num frasco hermeticamente fechado. Este procedimento foi realizado a temperatura ambiente (Figura 8).

Este procedimento durou 16 h com intervalo de um dia para o outro, onde o material foi hermeticamente fechado e armazenado em freezer. Obteve-se uma mistura de água e diclorometano que foi separada num funil de separação. À fração diclorometano adicionou-se sulfato de sódio anidro, e concentrou-se esta fração num aparelho de destilação tipo cabeça de Clayssen (Figura 9), até um volume aproximado a 10 ml. À fração diclorometano adquiriu uma coloração esverdeada, parecendo estar saturada de óleo. Uma amostra de 2 μ l foi injetada no cromatógrafo.



Figura 8: Análise por “Headspace” por dedo frio.



Figura 9: Concentração da fração de diclorometano.

3.6.2.2 Análise por “Headspace” por Micro-extração em fase sólida (SPME)

Foi utilizada uma seringa com agulha que guarda em seu interior um bastão de fibra (sílica fundida), com fase estacionária apolar: polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm (Figuras 10 e 11) (TORQUILHO, 2001; JIROVETS et al., 2002).

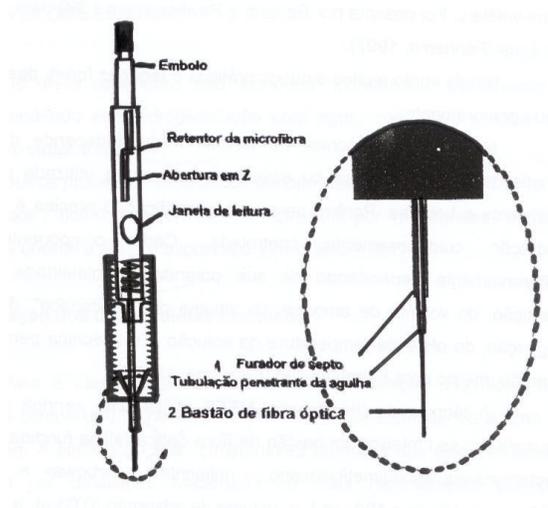


Figura 10: Análise por “Headspace” por SPME.



Figura 11: Análise por “headspace” por SPME.

A seqüência correta para a execução da técnica foi:

- a) Amostra previamente seca e deixado em frasco erlemeyer com volume de 250 ml hermeticamente fechado por 30 minutos a temperatura de 23°C.
- b) A seguir foi introduzido seringa com o êmbolo travado dentro do frasco que continha a amostra como mostra a Figura 11.
- c) Com o êmbolo travado a fibra foi exposta dentro do frasco que continha 22,65 g de flores (líguas) de Calêndula pulverizada.
- d) A fibra ficou exposta à planta (numa altura que não encostasse) por 30 min. para que a mesma ficasse completamente saturada de moléculas odoríficas. Após o término do tempo para a extração a fibra foi retraída para o êmbolo e a seringa retirada do frasco que contém a amostra.
- e) Com a fibra retraída, a seringa foi introduzida no septo do injetor do cromatógrafo, com tempo de exposição de 5 min. de acordo com as condições de análise descritas na Tabela 4 do item 3.8.1.2 como mostra a Figura 12.

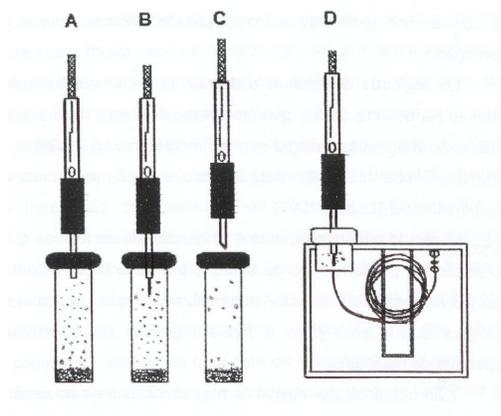


Figura 12: Manuseio da seringa no processo de extração (A, B, C) e dessorção no injetor do cromatógrafo (D).

3.7 Índices físico-químicos do óleo essencial de *Calendula officinalis* obtido por destilação por arraste a vapor.

Foram determinados os índices de refração, rotação ótica e densidade específica do óleo essencial de *C. officinalis*.

3.7.1 Densidade Relativa

A densidade relativa da substância é a razão de sua massa, pela massa igual ao volume de água, ambas a 20° C conforme técnica descrita (FARMACOPÉIA, 1988).

3.7.2 Rotação Ótica

Foi determinada num polarímetro digital modelo WXG-4, (FARMACOPÉIA, 1988).

3.7.3 Índice de Refração

Os índices de refração foram determinados em refratômetro do tipo ABBE, modelo RL 3, marca: PZO warszawa (FARMACOPÉIA , 1988).

3.8 Análise cromatográfica do óleo essencial das flores de *Calendula officinalis*

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *C. officinalis* foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de massas computadorizado CG/EM. O cromatógrafo a gás: Agilent 6890 série GC system acoplado ao detector seletivo de massas 6890 N (Agilent) acoplado a uma estação de trabalho (workstation) para operação e tratamento de dados. Neste microcomputador constam ainda a espectroteca Wiley 275 (PINI, 1995).

A análise cromatográfica foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ sob a orientação da prof^a Dr^a Cláudia Moraes de Rezende.

3.8.1 Instrumentação

As condições cromatográficas para análise da fração volátil estão descritas nas tabelas 3 e 4 e tendo como referência trabalhos realizados por Chalchat et al. (1991); Pini (1995); Radulescu et al. (2000); Porte (2000); Haznedaroglu; Karabay (2001); Jirovets et al. (2002); Boyom et al. (2003); Adams et al. (2004). O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa de alta resolução e por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de massas computadorizado.

3.8.1.1 Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)

As condições de análise estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Condições de análise por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) para análise quantitativa da fração volátil de *C. officinalis* obtido por destilação a arraste a vapor.

Parâmetro	Valor/Unidade
Cromatógrafo	Agilent 5890 Series II
Integrador	Agilent modelo 3396 A
Gás de arraste / vazão	Hélio: 1 ml / min
Coluna capilar de sílica fundida	Comprimento: 12 m Diâmetro interno: 0,2 mm Diâmetro do filme: 0,33 µm
Fase estacionária	HP-1 (metil silicone)
Detector	Detector de Ionização em chama (DIC) a 300°C, sendo os gases de combustão H ₂ , ar sintético e gás auxiliar N ₂ .
Injetor	“Split/splitless”, operando em “Splitless” (0,5 min) a 250°C.
Volume injetado	1,0 µl de amostra em splitless (0,5 min.)
Tempo inicial	0 minuto
Tempo final	52.58 min
Temperatura inicial	35° C (1 min)
Progressão do aquecimento (rampa)	Rampa 1= 35° C / min. até 60° C Rampa 2= 3° C / min. até 170° C Rampa 3= 8° C / min. até 200 ° C Rampa 4= 15° C / min. até 280° C (5 min)
Temperatura final	280°C

3.8.1.2 Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM).

As condições de análise estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de análise por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR –EM) para análise qualitativa da fração volátil de *C. officinalis* obtido por destilação a arraste a vapor, análise por “*headspace*” (dedo frio, SPME).

Parâmetro	Valor/Unidade
Cromatógrafo	Agilent 6890 Series II
Detector seletivo de massas	MSD-6890 computadorizado (Agilent 7958)
Gás de arraste / vazão	Hélio / 1 ml / min
Coluna capilar de sílica fundida	Comprimento: 30 m Diâmetro interno: 0,25 mm Diâmetro do filme: 0,25 µm
Fase estacionária	DB5-MS 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano
Injeção	Manual / 1,0 µl de amostra / splitless (0,5 min.)
Ionização	Impacto de elétrons a 70 eV
Analizador de íons	Quadrupolo (150°C)
Tempo inicial	0 minuto
Tempo final	52.58 min
Temperatura inicial	35° C / 1 min.
Progressão do aquecimento (rampa)	Rampa 1= 35° C/ min. até 60° C Rampa 2= 3° C / min. até 170° C Rampa 3= 8° C / min. até 200 ° C Rampa 4= 15° C / min. até 280° C (5 min)
Temperatura final	280° C
Temperatura da interface	290°
Temperatura linha de transferência	280°C
Temperatura fonte de íons	230°C
Padrão de hidrocarbonetos	Hidrocarbonetos lineares n-C ₉ a n-C ₃₀ (Aldrich)

3.9 Pesquisa de Padrão Interno

Para saber qual o padrão interno a ser injetado com a amostra, foi necessário identificar primeiramente a que classe pertenciam os compostos majoritários do óleo essencial de *C. officinalis*. Através dos dados obtidos no cromatograma, verificou-se que os componentes majoritários eram sesquiterpenos (C₁₅). Foram testados três hidrocarbonetos padrões: n-dodecano (C₁₂), n-tridecano (C₁₃) e n-tetradecano (C₁₄). Estes foram diluídos na

proporção de 1µl de cada hidrocarboneto (P.A) em 1,0 ml de diclorometano e injetou-se 1µl desta mistura no cromatógrafo nas condições acima descritas a fim de verificar o tempo de retenção de cada hidrocarboneto e comparar com o cromatograma do óleo essencial de *C. officinalis* a fim de escolher qual seria o melhor para ser utilizado como referência na identificação dos componentes do óleo.

3.10 Quantidade do óleo essencial de *C. officinalis* e do padrão interno a serem injetados no cromatógrafo

Para esta análise, foi preparada solução do óleo essencial de *C. officinalis* em diclorometano (P.A). Foram feitas várias diluições e injeções com o intuito de saber qual a concentração ideal de óleo, padrão interno e solvente para obter boa resolução dos picos. Estes dados não se encontram na literatura, tornando-se necessários vários testes. A concentração ideal encontrada foi: 47,2 mg de óleo essencial de *C. officinalis* em 1,5ml de diclorometano.

Foi pipetado 10 µl da solução acima e misturado a 10 µl de tridecano (padrão interno). Desta mistura foi injetado 1µl no cromatógrafo, seguindo a programação descrita na tabela 2.

3.11 Análise quantitativa dos constituintes químicos da fração volátil obtida por arraste a vapor.

Utilizou-se a CGAR com detector de ionização em chama (DIC) e as condições de análise estão descritas na Tabela 1.

Foi injetado 1,0 µl da amostra contendo 5,0 % do padrão interno n-tridecano.

As quantidades foram calculadas em função da área total de cada constituinte químico no cromatograma e da quantidade do padrão interno n-tridecano adicionado na amostra e sua área no cromatograma.

3.12 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *C. officinalis*.

A identificação dos constituintes químicos foi feita através de:

- Comparação dos espectros de massas das substâncias encontradas com espectros de massas da espectroteca Wiley 275 e da literatura (CHALCHAT et al., 1991; RADULESCU et al., 2000).
- Cálculo dos índices de retenção relativo (IRR) e comparação com índices de retenção relativo (IRR) encontrados na literatura (ADAMS, 1995).

O Índice de Retenção Relativo (IRR) das substâncias do óleo essencial de *Calendula officinalis* foi obtido através da equação 3.12 (SANDRA; BICCHI, 1987).

$$\text{IRR} = \left[\frac{\text{Log } t_{R'} \text{ subst} - \text{Log } t_{R'} n}{\text{Log } t_{R'} (n + 1) - \text{Log } t_{R'} n} + n \right] \times 100 \quad (\text{equação 3.12})$$

Onde:

IRR= índice de Retenção Relativo.

$t_{R'} \text{ subst}$ = Tempo de Retenção corrigido da substância.

$t_{R'} n$ = Tempo de Retenção corrigido do n-alceno imediatamente inferior ao tempo de retenção da amostra.

$t_{R'} (n + 1)$ = Tempo de retenção corrigido do n-alceno imediatamente superior ao tempo de retenção da amostra.

n = número de carbono n-alceno imediatamente inferior ao tempo de retenção da amostra.

Para o cálculo dos índices de retenção relativa (IRR) utilizou-se uma série de hidrocarbonetos homólogos: n-nonano (C9) a n-triacontano (C30) (SIMÕES et al., 2001). Foi

injetado 0,5 µl desta mistura homóloga no cromatógrafo seguindo a programação descrita na Tabela 2.

3.13 Ensaios microbiológicos.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. officinalis* foi determinada pelos métodos de microdiluição em caldo e por difusão em disco. Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia aplicada aos produtos naturais e sintéticos do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

3.13.1 Microorganismos utilizados e condições de crescimento.

Os microorganismos utilizados para ensaios foram as bactérias *Escherichia coli* ATCC 23110, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e a levedura *Candida albicans* ATCC 577. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente (DIFCO®) à 37°C e mantidas em ágar nutriente inclinado à temperatura ambiente (LORIAN, 1996) com exceção do *Streptococcus pyogenes* que foi cultivado em ágar sangue. A levedura *Candida albicans*, foi mantida em ágar sabouraud dextrose ASD inclinado (MERCK®).

3.13.2 Padronização da Suspensão bacteriana e fúngica.

Para cada amostra bacteriana foi realizada uma suspensão padronizada a partir da cultura de 24 h em caldo Müeller Hinton CMH (DIFCO®). Em um tubo contendo salina estéril (NaCl 0,85%) foi adicionada gota a gota, a cultura de bactéria até a obtenção de uma

turvação idêntica aquela comparada ao tubo 0,5 da escala de McFarland (suspensão de BaSO₄ que corresponde a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Posteriormente foi realizada uma diluição 1:10 em tubo eppendorf contendo CMH, de modo a obter uma suspensão bacteriana de 10^7 UFC/mL, cujo inóculo foi utilizado no ensaio para determinação da CIM. Para o *Streptococcus pyogenes* utilizou-se a mesma padronização descrita acima, sendo acrescido de 10% de sangue de carneiro desfibrinado no ágar Mueller Hinton.

A levedura foi padronizada a partir da cultura de 24 h em caldo Sabouraud (DIFCO®). Em um tubo contendo salina estéril, foi adicionada gota a gota a suspensão de levedura até a obtenção de uma turvação, padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (1 a 5×10^6 UFC/mL). Após foi realizado uma diluição 1:100 em tubo eppendorf contendo caldo Sabouraud, de modo a obter uma suspensão de 10^4 UFC/mL, cujo inóculo foi utilizado no ensaio para determinação da CIM.

3.13.3 Preparo das drogas controle

As drogas utilizadas como controle foram: Penicilina para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*; Vancomicina para o *B. subtilis*; Tetraciclina para *E.coli* e *P. aeruginosa* e Nistatina para a levedura *C. albicans*. Para a técnica de microdiluição em caldo as drogas foram preparadas da seguinte forma:

Para a penicilina (CRISTALPEN®), preparou-se uma solução A de 5,0 mg/mL (0,001 g em 200,0 µL de água destilada), em seguida esta solução foi diluída 1:100 em água destilada (solução B: 0,05 mg/mL), por fim a solução B foi diluída 1:10 em CMH, obtendo

uma concentração de 5,0 µg/mL no tubo eppendorf, desta diluição foi transferida para o poço G da microplaca (100,0 µL), obtendo uma concentração de 2,5 µg.

A vancomicina (LIBRA[®]) e a tetraciclina (SIGMA[®]) foram preparadas através da diluição de 5 mg das respectivas drogas em 100,0 µL de água destilada (solução A). Esta foi diluída 1:100 em água destilada (solução B: 0,5 mg/ mL) e a solução B foi diluída 1:10 em CMH, sendo então transferida para o poço G da microplaca (100,0 µL), obtendo uma concentração de 25 µg/mL.

A nistatina (SIGMA[®]) utilizada como controle para as leveduras *C. albicans*, foi preparada a partir de uma solução estoque de 1,024 mg diluída em 200,0 µL de DMSO (INLAB[®]). Posteriormente foi realizada uma diluição 1:10 em caldo Sabouraud (solução A). 100,0 µL da solução A foram adicionados em 300,0 µL de caldo Sabouraud (solução B). Esta solução B foi transferida para o poço G da microplaca (100,0 µL), obtendo assim uma concentração de 64,0 µg/ mL.

Para a técnica de difusão em disco, utilizou-se vancomicina (30 µg / 15 µl); tetraciclina (30 µg / 15 µl) e penicilina (10U=6,53 µg / 15 µl). Foram preparadas soluções em água destilada e foram impregnados 15 µl de cada antibiótico no disco de papel (LORIAN, 1996).

3.13.4 Método de Microdiluição em Caldo.

3.13.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs do óleo essencial de *C. officinalis*, assim como dos antibióticos de referência (penicilina, vancomicina e tetraciclina) foram determinados pela técnica de microdiluição em CMH para as bactérias e em caldo sabouraud para fungos (NCCLS-M7-A5, 2000; NCCLS-M27-A2, 2002).

Para a determinação da CIM, inicialmente foi preparada uma solução estoque do óleo essencial a partir de 40 mg do óleo, densidade 0,96 mg/mL dissolvidos em 960 µl de tween 80 sol. a 2% , obtendo-se uma concentração final de 40,0 mg/mL (40.000 µg / mL) Em seguida diluiu-se esta solução estoque 1:10 em tubo de eppendorf contendo CMH e outro com caldo Sabouraud.

Utilizando uma microplaca com 96 poços, adicionou-se 100,0 µl de meio de cultura (CMH ou caldo Sabouraud), em todos os poços de acordo com as diluições a serem realizadas. A seguir pipetou-se 100,0 µl da solução estoque (1:10) no primeiro poço, onde obteve-se uma concentração inicial de 20000 µg/ ml. Foi realizado a partir do primeiro poço uma diluição seriada, homogeneizando e transferindo 100,0 µl do primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente como mostra a figura 13. Em cada poço foi adicionado 5,0 µl da suspensão de bactérias preparadas como descrito acima (10^7 UFC/mL) ou de leveduras (10^4 UFC/mL). As microplacas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h.

A CIM é definida como a maior diluição do óleo onde ocorreu inibição do crescimento, ou seja ausência de turvação, quando comparado com o controle de crescimento bacteriano ou de levedura. (NCCLS- M7-A5, 2000; NCCLS-M27-A2, 2002).

3.13.4.2 Determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM ou CFM).

Para a realização da determinação CBM e da CFM, foram realizadas subculturas de todos os poços onde ocorreu inibição do crescimento microbiano e do poço controle da bactéria ou do fungo. Estas foram semeadas com alça calibrada de 10,0 µL, em placas de Petri 100 x 15 mm contendo AMH ou de ASD. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. As CBMs e as CFMs foram definidas como a menor concentração que produziu subculturas negativas ou somente uma colônia (NCCLS-M27-A2, 2002).

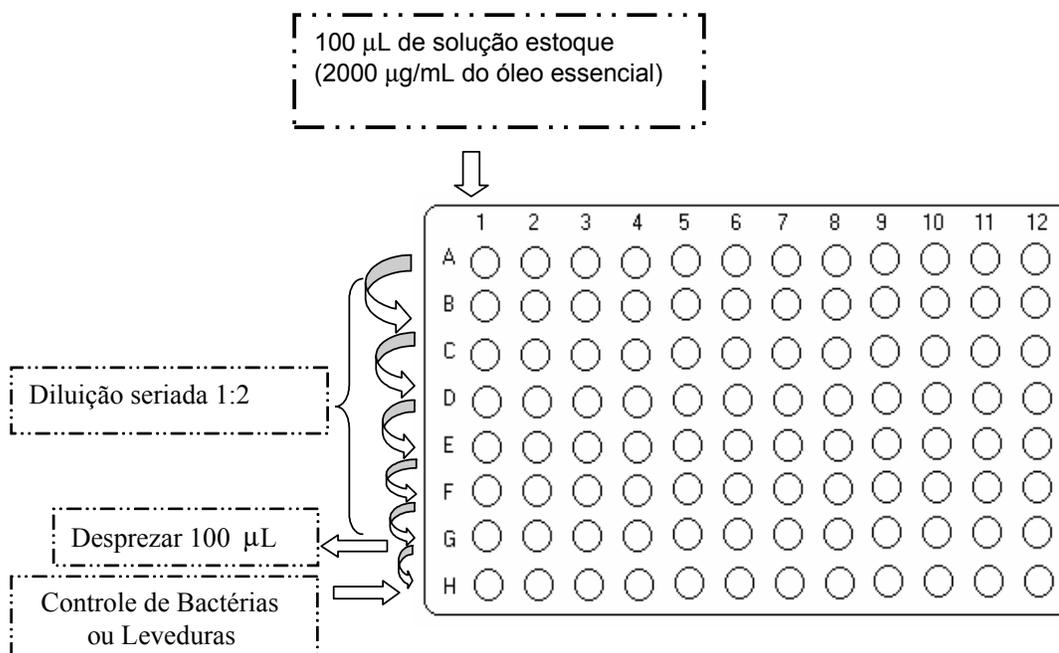


Figura 13: Esquema para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em microplaca.

3.13.5 Método de difusão em disco de papel.

O meio sólido utilizado foi AMH contendo ágar-agar na concentração de 1,5% e uma espessura de 4 mm nas placas para ter maior difusão do óleo. Foi feito a semeadura das bactérias nas placas com zaragatoa. As bactérias semeadas foram *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (meio de cultura ágar Mueller-Hinton).

3.13.6 Padronização do inóculo

Para cada amostra bacteriana foi realizada uma suspensão padronizada a partir da cultura de 24 h em CMH (DIFCO®). Em um tubo contendo salina estéril (NaCl 0,85%) foi adicionada gota a gota, a cultura de bactéria até a obtenção de uma turvação idêntica aquela comparada ao tubo 0,5 da escala de McFarland (suspensão de BaSO₄ que corresponde a 1,0 x 10⁸ UFC/mL).

Discos com 6,25 mm de diâmetro foram saturados com 15 µl de óleo essencial . Utilizou-se como padrão o óleo mineral também em volume de 15 µl. Foram deixados por 24 h para completa impregnação no disco. Os antibióticos foram impregnados no dia. Em seguida, estes discos foram colocados em placas, tomando-se cuidado de deixar uma distância de 3 cm entre cada disco.

Incubou-se por 24h a 37° C, e fez a leitura medindo o diâmetro do halo de inibição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Correção do Solo

Os valores de pH e as concentrações dos elementos químicos encontrados no solo estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Análise do solo: pH.

Nº da amostra	PH		cmol _c dm ⁻³					Mg dm ⁻³		g dm ⁻³	
	CaCl ₂	H ₂ O	Al ⁺⁺⁺	H ⁺ +Al ⁺⁺⁺	Ca ⁺⁺ +Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	K ⁺	P	C		
01	4,8	5,7	0,00	2,94	2,48	1,82	0,14	19	6,59		
02	5,6	6,5	0,00	2,54	4,08	3,18	0,71	49	7,75		

Fonte: Laboratório de solos-Cela-PR. Deptº de Agronomia UEM (2003) Laudo em anexo

Tabela 4: Análise do solo: concentração de elementos químicos.

Nº da amostra	Mg dm ⁻³			
	Fe	Cu	Zn	Mn
01	133,32	4,27	1,34	116,40
02	150,36	6,35	1,66	170,94

Fonte: Laboratório de solos-Cela-PR. Deptº de Agronomia UEM (2003) Laudo em anexo

A adubação dos canteiros foi realizada conforme os resultados da análise de solo, seguindo a orientação do Engenheiro Agrônomo Gilberto Alves Ferreira. A necessidade de calagem foi na ordem de 1,34 toneladas/ ha. Utilizou-se adubo orgânico (esterco de gado curtido) na dosagem de 2,0kg/m². O calcário e o adubo orgânico foram misturados à terra numa profundidade de 20cm permanecendo por uma semana descansando antes de iniciar o plantio.

4.1 Plantio

O plantio foi feito no início do outono, coincidindo com período de temperaturas mais amenas, visto que nesta região as temperaturas são muito elevadas, daí ser uma cultura típica de inverno, pois trata-se de uma planta anual, raramente bienal (PDR, 2000), que não

tolera temperaturas elevadas (SILVA, et al., 1995). É cultivada em toda zona temperada do mundo e resistente a geadas leves (CORREA JÚNIOR et al., 1991). As mudas foram obtidas a partir de sementes. As mais indicadas para o cultivo comercial foram aquelas cujas flores apresentavam-se uniformemente alaranjadas e cheias, não deixando o miolo à vista como a “balls orange”, “golden king”, “midas”, “orange guitana” e “persimmon beauty” (MONTANARI JUNIOR, 2000). Escolheu-se trabalhar com a variedade “orange guitana” de acordo com pesquisas realizadas na Estação Experimental de Plantas Medicinais Dr. Juan Tomás Roig CIDEM em Cuba, onde verificou-se que esta variedade alcançou maior altura (72,33 cm), possui folhas mais curtas (11,5 cm) e estreitas (2,39 cm) e desenvolve maior quantidade de inflorescência (FIALLO et al., 2000). Sementes de plantas européias como a *Calendula officinalis*, que não produzem sementes no Brasil, geralmente são encontradas em revendedores de sementes de olerícolas ou empresas especializadas em importação (CORREA JÚNIOR et al., 1991). A *C. officinalis* apresenta dois tipos principais de sementes: cor cinza, mais pequenas e mais pesadas (116/g) (Figura 14) (FIALLO et al., 2000) e de cor bege a caramelo claro, de maior tamanho e menor peso (202/g) (Figura 15). As sementes utilizadas no experimento foram as de cor cinza, menores e mais pesadas (Figura 14).



Figura 14: Semente variedade “orange guitana” cor cinza.



Figura 15: Semente variedade “orange guitana” cor caramelo claro.

4.2 Germinação e Inflorescência.

A sua germinação é bastante rápida, (3 a 5 dias), tornando visível as linhas de semeadura. É uma planta bastante vigorosa, fazendo com que o fechamento das entrelinhas ocorra rapidamente (cerca de 30 dias). A calêndula começa a florescer cerca de 90 dias após sua semeadura, atingindo seu pico de produção aos 120 dias.

Estudos realizados por Kasprzyk et al. (1968) mostram que há uma variação nos níveis de esteróis livres, esteróis ésteres e esteróis glicosídeos durante o período vegetativo da calêndula. Durante o período germinativo verificou-se a hidrólise dos ésteres em esteróis livres; no período de inflorescência os esteróis foram acumulados principalmente nas flores e no período de amadurecimento da planta, verificou-se a hidrólise dos esteróis ésteres resultando na importância em se manter condições adequadas de luminosidade e solo, para o correto desenvolvimento das mesmas.

Kasprzyk et al. (1970) analisaram a variação de triterpenóides durante o desenvolvimento das flores de calêndula com botão (5 dias), flores desenvolvidas (8, 12 e 17 dias), flores totalmente desenvolvidas (21 dias) e totalmente secas (27 dias), chamando atenção sobre a época ideal para coleta das plantas, pois influem na quantidade de triterpenos monoálcoois e triterpenos diálcoois que são mais limitados nas flores, não ocorrendo sua síntese em outras partes da planta. Já a síntese de beta-amirina e eritrodiol ocorrem no estágio botão (Figura 16).

Numa determinada espécie, a concentração de cada um dos constituintes do seu óleo volátil pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. No *Coriandrum sativum* (coentro) por exemplo, o teor de linalol é 50% maior nos frutos maduros do que nos verdes (SIMÕES, 2001).



Figura 16: Flores de *C. officinalis* em diferentes estágios de desenvolvimento.

4.3 Controle de Pragas e Doenças

É muito comum, durante a inflorescência a presença de pulgões, vaquinhas, lagartas e abelhas. Por se tratar de uma cultura totalmente orgânica, utilizou-se para o combate das mesmas, macerado de fumo (10 cm de fumo de corda em um litro de água) pulverizado sobre as plantas quantas vezes se fez necessário para o controle das mesmas (CORREA JÚNIOR et al., 1991).

4.4 Coleta

Segundo CORREA JÚNIOR et al., (1991), as flores devem ser coletadas na época da polinização como pode ser verificado na Figura 17. Em alguns casos, prefere-se o instante em que se encontram em floração plena, quando estão bem abertas e desenvolvidas (OLIVEIRA, 1998).



Figura 17: Flores em estágio de desenvolvimento ideal para coleta.

Uma série de constituintes químicos varia na planta conforme as horas do dia. Por exemplo, a quantidade de óleo essencial é mais reduzida ao redor das 12 h (OLIVEIRA, 1998). O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influenciam sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime dos ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície, como é o caso do óleo essencial produzido pela calêndula. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos voláteis é mais constante. Deve-se preferencialmente, coletar plantas ricas em óleos voláteis bem cedo pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal (SIMÕES, 2001).

Segundo LOPES et al., (1997) observou-se variação na composição do óleo essencial das folhas de *Virola surinamensis* coletadas durante as estações das chuvas (Inverno) e estação das secas (verão). Verificou-se que há uma prevalência de monoterpenos nas folhas coletadas no período de seca, e uma prevalência dos sesquiterpenos nas folhas coletadas no período de chuvas.

Cada vegetal ou parte do vegetal possui um método adequado de colheita. As flores de *Calendula* foram colhidas manualmente, com o pedúnculo o mais curto possível e completamente abertas (Figura 18) (MONTANARI JUNIOR, 1992).



Figura 18: Estágio de desenvolvimento da flor para a coleta.

4.5 Secagem

A secagem é o tratamento mais comum e seu objetivo é eliminar certa quantidade de água do órgão vegetal. Este tipo de tratamento, além de diminuir o volume da droga, facilita a conservação. O teor de umidade nas flores frescas varia entre 60% a 95%; e o teor de umidade permitido nas flores secas deve permanecer entre 8 a 15% como pode ser verificado na tabela 5 (OLIVEIRA, 1998).

Tabela 5: Variações do teor de umidade em órgãos frescos e órgãos transformados em drogas.

Órgão Vegetal	Umidade no órgão fresco	Umidade permitida na droga
CASCA	50 a 55%	8 a 14%
ERVA	50 a 90%	12 a 15%
FLOR	60 a 95%	8 a 15%
FRUTO	15 a 95%	8 a 15%
RAIZ	50 a 85%	8 a 14%
RIZOMA	50 a 85%	12 a 16%
SEMENTE	10 a 15%	12 a 13%
FOLHA	60 A 98%	8 A 14%

Fonte: (OLIVEIRA, 1998).

4.5.1 Perda de água por secagem.

A determinação da perda por secagem foi realizada à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com as flores frescas, coletadas em agosto de 2003. Durante a secagem não houve períodos de chuva. Foram utilizadas cinco (5) amostras de flores frescas e a estabilização do processo de secagem ocorreu após dez dias (Tabela 6). Segundo Oliveira et al. (1998), para drogas constituídas de flores o teor de umidade permitido deve ser menor que 15%, pois valores mais altos podem favorecer o crescimento microbiano, principalmente por fungos, desta forma seu estado de conservação pode estar mais suscetível a alterações.

Flores frescas geralmente apresentam de 60 a 98% de umidade (OLIVEIRA et al., 1998). A avaliação da perda de água e/ou substâncias voláteis da droga vegetal é importante para a produção em nível industrial.

A umidade média encontrada nas cinco amostras de flores foi de 85%, e encontra-se dentro dos valores médior encontrados em flores secas como pode ser verificado na Tabela 5.

Tabela 6: Determinação da perda por secagem das flores de *C. officinalis*.

Amostra (<i>n</i>)	Planta fresca (g)	Planta seca (g)
1	27,084	4,035
2	27,077	4,094
3	27,044	4,105
4	27,310	4,040
5	27,010	4,023
Média (g)	27,105	4,059
Média (%)	100,0	14,97

4.5.2 Determinação da perda por dessecação.

Na determinação da perda por dessecação, cinco (5) amostras de flores secas de *C. officinalis* foram submetidas a secagem em estufa à 105 °C; a quantidade de massa seca está expressa na Tabela 7. Foram realizadas 5 pesagens, para obtenção do peso constante, isto é, até que a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedesse a 5 mg (FARIAS, 2000), o que foi obtido após as 2 primeiras horas de secagem.

Tabela 7: Determinação da perda por dessecação das flores de *C. officinalis*.

Média das pesagens	Amostra	Amostra dessecada	Planta seca %
1	21,0059	20,7924	11,44
2	23,1796	22,9392	11,76
3	25,4970	25,2429	12,17
4	20,1162	19,8904	11,23
5	21,8071	21,5730	11,43
Média (%)	22,3212	22,0876	11,6

Os cuidados durante as etapas de secagem do material vegetal, devem ser considerados pois o excesso de água remanescente no vegetal, pode favorecer a proliferação microbiana e alterar os constituintes químicos, favorecendo a ação de enzimas autolíticas presentes no vegetal e dessa forma alterar substâncias que possam apresentar alguma atividade biológica.

4.6 Extração do óleo essencial das flores de *C. officinalis* por destilação por arraste a vapor

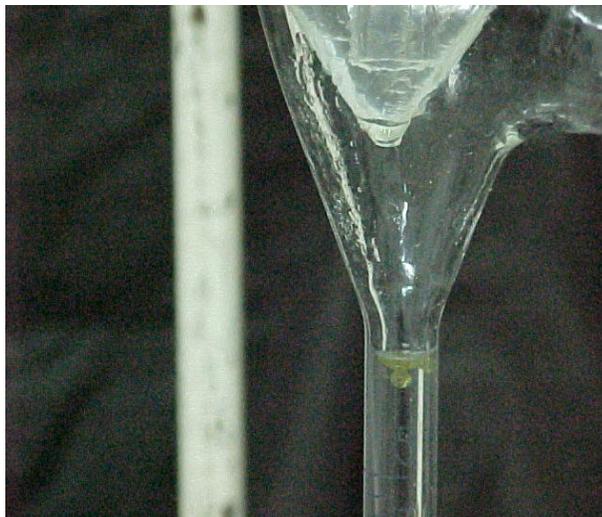


Figura 19: Destilação do Óleo essencial de *C.officinalis* por destilação por arraste a vapor.

As lígulas das flores de *C. officinalis* foram separadas do receptáculo floral. Foi feita a destilação com as flores inteiras e somente as lígulas para avaliar o rendimento da destilação, e verificou-se que a destilação feita somente com as lígulas proporcionou um rendimento maior de óleo, devido à diferença no peso do material a extrair. Em trabalho publicado por Radulescu et al. (2000) os autores sugeriram a pulverização das flores, porém foi também feito testes utilizando-se lígulas pulverizadas e lígulas íntegras e não observou-se diferença no rendimento da quantidade de óleo obtida no processo de destilação.

A quantidade de droga utilizada deve ser suficiente para obter 0,1-0,3 ml de óleo essencial. A amostra varia de 10 a 50 g dependendo do tipo de planta e para um rendimento de 0,3% de óleo, se utilize 50g de amostra (WAGNER et al.,1984). O rendimento encontrado em literatura para o óleo essencial de *Calendula officinalis* é de 0,3% (CHALCHAT et al.,

1991) e 0,2% (ALONSO, 1998; PDR, 2000). No experimento utilizou-se 50g da planta seca para 500ml de água destilada (10% da planta em relação à água). A velocidade da destilação não deve ser superior a 2-3 ml/min e o tempo decorrido da destilação deve continuar entre 1 ½ h a 4 h (WAGNER et al., 1984). Para a extração do óleo, foram feitas várias destilações com a finalidade de determinar qual o melhor tempo de extração. Os parâmetros de tempo utilizados foram: 2 h; 2,5 h; 3 h; 3,5 h; 4,0 h; 5,0 h. Verificou-se que com 3 h de extração consegue-se um rendimento máximo do óleo. Para a quantidade de planta descrita no experimento, obteve-se uma média de 0,1% de óleo em cada extração.

Após a destilação o óleo foi retirado do aparelho com hexano e filtrado com Na₂ SO₄ anidro (SIMÕES, 2001), armazenado em frasco escuro, sob refrigeração e aberto para evaporar o hexano e assim obter o óleo essencial livre de solvente e água.

4.7 Índices físico-químicos

Tabela 8: Índices físico-químicos do óleo essencial de *Calendula officinalis*.

Óleo essencial	Índices físico-químicos		
	Índice de Refração	Rotação ótica	Densidade relativa
	n_D^{20}	$ \alpha _D^{20}$	d_{20}^{20}
	1,4898	Levógira - 0,80°	0,965

Os padrões de destilação seguidos durante o experimento estão na tabela 9.

Tabela 9: Padrões de destilação (rendimento de óleo na planta/ quantidade de amostra/ quantidade de água/ tempo de destilação/ rendimento de óleo essencial/ min).

Planta	Concentração Óleo Essencial (ml/100g)	Amostra (g)	Água (ml)	Tempo (h)	Destilado (ml/min)
<i>Absinthii herba</i>	0,3	50	300	3	2-3
<i>Anisi fructus</i>	2,0	25	200	2	2-3
<i>Anthemidi flos</i>	0,7	30	300	3	3-5,5
<i>Aurantii percapium</i>	1,0	20	250	1,5	2-3
<i>Carvi fructus</i>	4,0	10	200	1,5	2-3
<i>Curcumae rhizoma</i>	3,5	10	200	3	3-4
<i>Foeniculi fructus</i>	4,0	10	200	2	2-3
<i>Juniperi fructus</i>	1,0	20	200	1,5	3-4
<i>Matricariae flos</i>	0,4	50	500 ^a	4	3-4
<i>Melissae folium</i>	0,05	40	400	2	2-3
<i>Menthae folium</i>	1,2	50	500	2	3-3,5
<i>Salviae offic.folium</i>	1,5	50	500	1,5	2-3
<i>Salviae trilb.folium</i>	1,8	50	500	1,5	2-3
<i>Thymi herba</i>	1,2	20	300	2	2-3

Destilado com solução 1% de NaCl.

Fonte: Wagner et al. (1984).

4.8 Análise cromatográfica do óleo essencial das flores de *C. officinalis*.

Os propósitos da análise de óleos essenciais são numerosos; por exemplo, pode-se querer estabelecer a composição química parcial ou completa dos óleos ou testar suas qualidades e pureza, ou determinar as quantidades de alguns componentes (PINI, 1995).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) reúne até o presente momento a melhor técnica de identificação e separação de misturas complexas como os óleos essenciais (SANDRA; BICCHI,1987). Historicamente os componentes dos óleos essenciais eram identificados por espectrometria de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN), mas raramente por ultravioleta (ADAMS, 1995).

A cromatografia gasosa é usada quase que exclusivamente para as análises qualitativas de substâncias voláteis. O tempo de retenção utilizado é um critério primário para a identificação dos picos. Sem estes dados preliminares a identificação é praticamente impossível. O espectrômetro de massas acoplado ao cromatográfico oferece dados adicionais

para a identificação das substâncias separadas. A grande resolução dos novos equipamentos de CG/EM tem disponibilizado um aumento grande de picos a serem identificados. O método de identificação mais frequente é a comparação dos registros dos espectros com o banco de dados da espectrometria de massas que contém diversos espectros (GARCIA et al.,1993; OPREAN et al.,1998; ALIGIANNIS et al., 2001; RASOOLI; MIRMOSTAFA, 2003).

4.9 Instrumentação

Para a análise cromatográfica de amostras cujos componentes possuem uma larga faixa de pontos de ebulição deve-se utilizar programação de temperatura, isto é, a mudança controlada de temperatura da coluna durante a análise. A programação de temperatura é utilizada para simplificar e/ou acelerar a separação, que é condição básica para quantificação e identificação dos componentes da amostra. Na análise dos óleos essenciais é necessário iniciar com temperaturas baixas para separar os componentes voláteis, que são controladamente para a separação dos componentes de ponto de ebulição mais elevados (COLLINS, et al., 1997). A escolha da fase estacionária depende da polaridade dos óleos essenciais. O óleo essencial de *C. officinalis* é classificado em apolar por possuir sesquiterpenos em sua constituição (PINI,1995).

4.10 Escolha do padrão interno utilizado para análise.

Para a escolha do padrão foi necessário um cromatograma somente do óleo essencial de *C. officinalis* nas condições descritas na Tabela 2, como mostra o cromatograma abaixo.

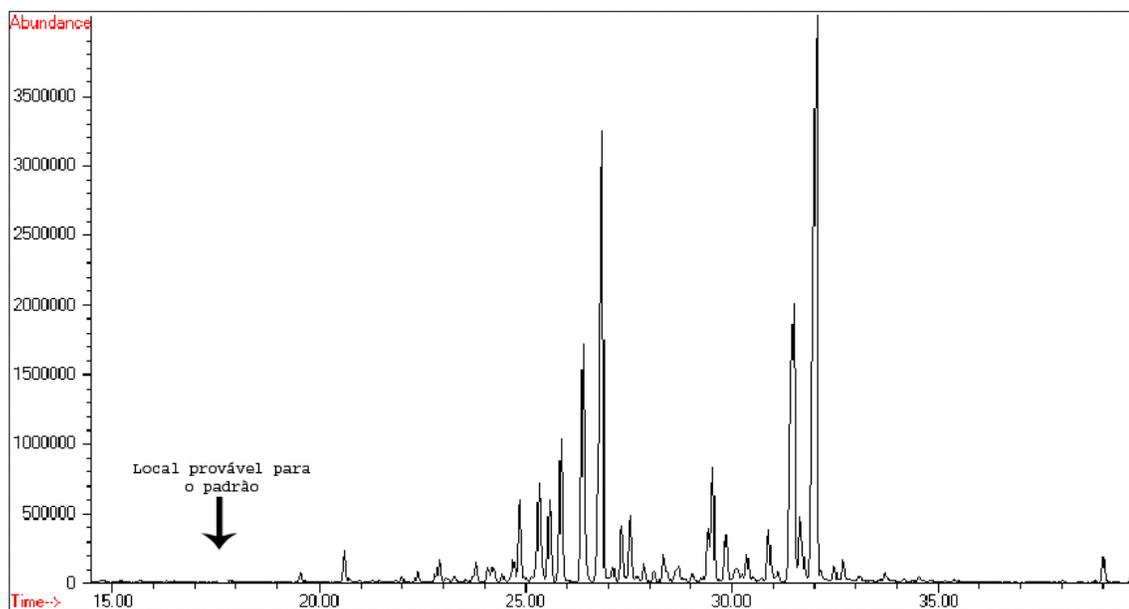


Figura 20: Cromatograma da fração volátil de *Calendula officinalis* indicando o local ideal para adição do padrão interno.

Este cromatograma (Figura 20) mostra o local ideal do pico padrão segundo as características cromatográficas já otimizadas. Para que o mesmo pudesse estar no local indicado, utilizou-se as condições de análise descritas na Tabela 2, e a escolha foi em função do tempo de retenção dos hidrocarbonetos testados.

Foi feita a injeção dos padrões (C12, C13 e C14) juntamente com o óleo para analisar qual dos hidrocarbonetos apresentaram um tempo de retenção mais próximo ao local onde se esperava que saísse o pico. O resultado mostrou que o tridecano (C13) apresentou um tempo de retenção ideal para o local esperado conforme pode ser verificado no cromatograma da Figura 21.

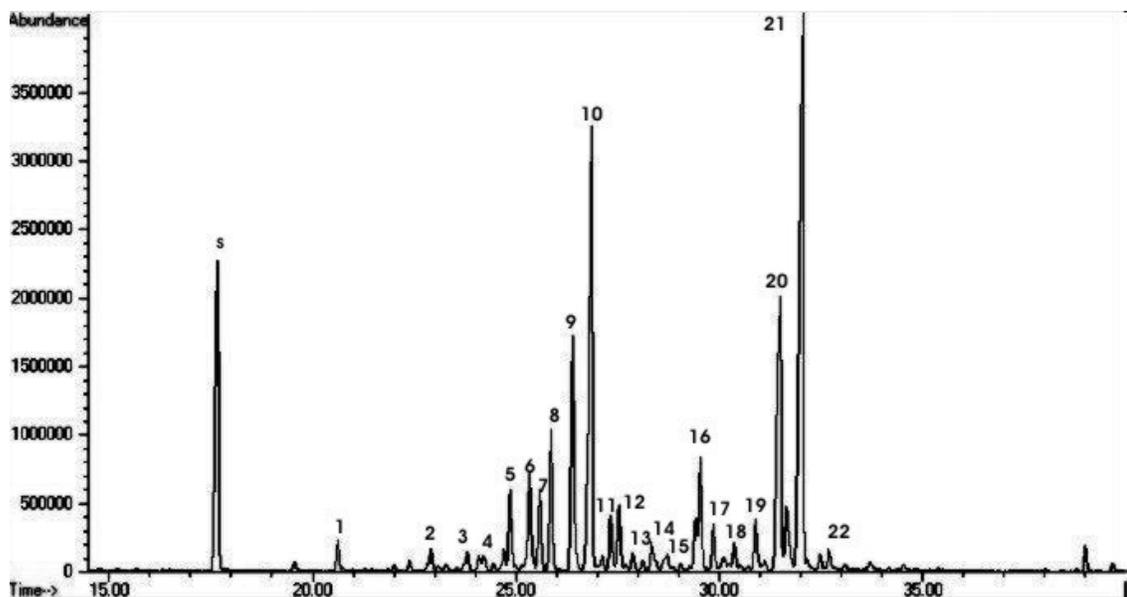


Figura 21: Cromatograma do padrão (tridecano) e do óleo essencial de *C. Officinalis* para identificação dos picos.

4.11 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *Calendula officinalis*.

Em cromatografia expressar os dados de retenção não é trivial, porque estes são muito dependentes de condições operacionais. Vários sistemas foram desenvolvidos, sendo um dos mais lógicos para generalizar os dados de retenção o de expressá-los numa escala de índices de retenção, proposto pela primeira vez por E. Kováts (SANDRA; BICCHI, 1987). O índice de retenção relativo (IRR) expressa a retenção da substância de interesse em uma escala uniforme, determinada por uma série de substâncias padrão, que são hidrocarbonetos normais e saturados (denominados de mistura de referência). A quantidade de carbonos de cada um dos hidrocarbonetos da mistura é multiplicada por 100 e uma escala logarítmica é utilizada no cálculo do índice de retenção, porque, quando se opera em temperaturas isotérmicas do forno da coluna, o logaritmo do tempo de retenção ajustado de hidrocarbonetos normais aumenta linearmente com o comprimento da cadeia (PINI, 1995).

O cromatograma abaixo (Figura 22) refere-se ao tempo de retenção da série homóloga de hidrocarbonetos n-nonano (C_9) a n-triacontano (C_{30}) (SIMÕES et al., 2001), para o cálculo do índice de retenção relativo (IRR).

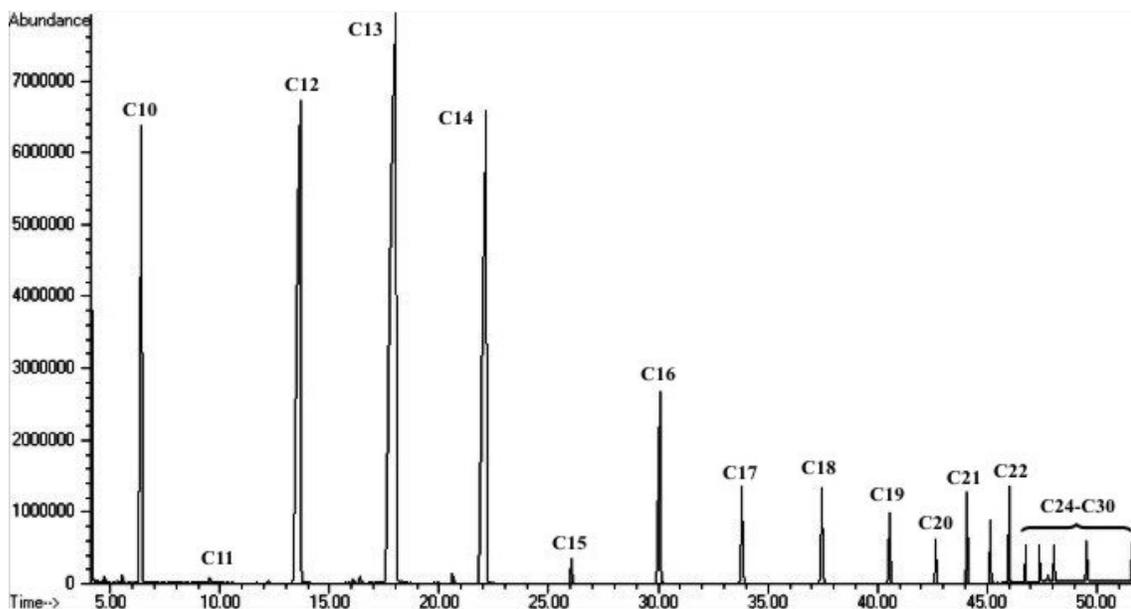


Figura 22: Cromatograma da série homóloga de hidrocarbonetos n- C_9 (nonano) a n- C_{30} (triacontano).

4.12 Identificação dos constituintes químicos da fração volátil de *C. officinalis* obtido pela técnica de arraste a vapor por CGAR-EM.

A identificação deu-se através da comparação com os espectros de massas da espectroteca Wiley 275, e o cálculo do índice de retenção relativo (IRR) que compara os índices de retenção encontrados em coluna capilar com 5% de fenilmetilsiloxane (DB5) com os espectros de massas da literatura (ADAMS, 1995).

Tabela 10: Compostos identificados da fração volátil de *Calendula officinalis*.

No.	Substância	Area %	IRR calculado	IRR literatura
S	n-tridecano	8,945	1300	1300
1	α -copaeno	0,672	1365	1376
2	α -ionona	0,592	1421	1426
3	α -humuleno	0,588	1444	1454
4	Geranilacetona	0,408	1452	1453
5	γ -muuroloeno	2,146	1472	1477
6	β -ionona	3,395	1484	1485
7	Ledeno	2,451	1488	1493
8	α -muuroloeno	4,062	1497	1499
9	γ -cadineno	7,243	1511	1513
10	δ -cadineno	14,334	1522	1524
11	α -cadineno	1,514	1533	1538
12	α -calacoreno	1,817	1539	1542
13	Óxido de cariofileno	0,471	1547	1581
14	Copaen-4- α -ol	0,248	1566	1584
15	β -oplopenona	0,424	1568	1606
16	Viridiflorol	3,074	1585	1590
17	Ledol	1,195	1595	1565
18	1,10-di-epi-Cubenol	0,759	1608	1614
19	1-epi-cubenol	1,614	1621	1627
20	epi- α -muurolol	12,088	1639	1641
21	α -cadinol	20,675	1654	1653
22	Cadalenol	0,679	1671	1674

IRR calc- Índice de retenção relativo calculado em coluna capilar DB5 (5% fenilmetilsiloxane). **IRR lit.-** Índice de retenção relativo encontrado na literatura em coluna capilar DB5. **EM-** Comparação com Espectros de Massas da espectroteca Wiley 275. **Lit.-** Comparação dos Índices de Retenção e/ou dos Espectros de Massas com a Literatura (ADAMS, 1995).

Conforme pode ser verificado no cromatograma (Figura 21) e na tabela 10 os componentes majoritários do óleo essencial de *C. officinalis* por arraste a vapor foram sesquiterpenos hidrocarbonetos: δ -cadineno (14,33%), γ -cadineno (7,24%), α -muuroloeno (4,06%) e sesquiterpenos álcoois: Epi- α -muurolol (12,09%) e α -cadinol (20,67%).

4.13 Análise quantitativa dos constituintes químicos da fração volátil obtida pela técnica de arraste a vapor em função área total % e da quantidade do padrão tridecano (CGAR).

Para a análise quantitativa dos constituintes químicos da fração volátil obtidos pela técnica de arraste a vapor, foi utilizada a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) com detector de ionização em chama (DIC). Foi injetados 1,0 µl da amostra contendo 5.0 % de padrão interno (tridecano $d= 0.75 \text{ g/cm}^3$) e as condições de análise utilizadas no cromatógrafo estão descritas na Tabela 1.

As quantidades encontradas foram calculadas em função da área total de cada constituinte químico no cromatograma e da quantidade (0.5 µl) do padrão interno (n-tridecano) adicionado na amostra e a área deste no cromatograma.

Tabela 11: Quantificação dos constituintes químicos da fração volátil de *Calendula officinalis* obtido pela técnica de arraste a vapor.

Nº	SUBSTÂNCIA	QUANTIDADE (µg/mL)	ÁREA TOTAL (%)
8	n-tridecano	0,375	15,35
1	α-copaeno	0,028	1,16
2	α-ionona	0,042	1,71
3	α-humuleno	0,035	1,42
4	Geranilacetona	0,019	0,81
5	γ-muuroleno	0,058	2,38
6	β-ionona	0,064	2,60
7	Ledeno	0,027	1,09
8	α-muuroleno	0,116	4,77
9	γ-cadineno	0,172	7,03
10	δ-cadineno	0,460	18,85
11	α-cadineno	0,025	1,02
12	α-calacoreno	0,043	1,75
13	Óxido de cariofileno	0,023	0,93
14	Copaen-4-α-ol	0,027	1,09
15	β-oplopenona	0,014	0,56
16	Viridiflorol	0,063	2,57
17	Ledol	0,022	0,92
18	1-10-di-epi-cubenol	0,015	0,61
19	1-epi-cubenol	0,028	1,14
20	Epi-α-muurolol	0,238	9,77
21	α-cadinol	0,657	26,90
22	Cadalenol	0,008	0,35

4.14 Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *C. officinalis* obtido por análise por “headspace”.

As análises por “headspace” são muito importantes para identificar compostos voláteis (ACREE, 1993); esta técnica permite identificar alguns compostos voláteis que têm oxigênio em suas moléculas (1-butanal, isovaleraldeído, 2-propanol, ácido acético, 3-hidroxi-2-butanona, furfúril álcool, 5-metil-furfural), que normalmente são perdidos pela destilação por arraste a vapor (RADULESCU et al., 2000).

4.14.1 Análise por “headspace” obtido pela técnica de dedo frio (cold finger)

Consiste numa técnica simples por condensação, que pode ser utilizada para coletar compostos voláteis de flores. As flores são acondicionadas dentro de um frasco de vidro (round-bottom flask), e é introduzido nitrogênio líquido dentro de um dedo frio “cold finger”. Este dedo servirá de armadilha para aprisionar as moléculas voláteis presentes nas plantas (ACREE;TERANISH, 1993). Em trabalho publicado por Rezende et al. (1999) utilizou esta técnica também conhecida por “headspace” estático criogênico para identificar as substâncias de maior impacto no aroma de seis variedades de mangas comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. Ainda, Rezende et al. (2004) utilizou esta técnica para determinação dos constituintes químicos voláteis das flores do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.).

O cromatograma abaixo (Figura 23) refere-se à fração volátil da *Calendula officinalis* obtida pela técnica de “headspace” por dedo frio “cold finger”, utilizando as condições de análise descritas na Tabela 2 e para o cálculo do Índice de Retenção Relativo IRR os dados obtidos no cromatograma da Figura 22.

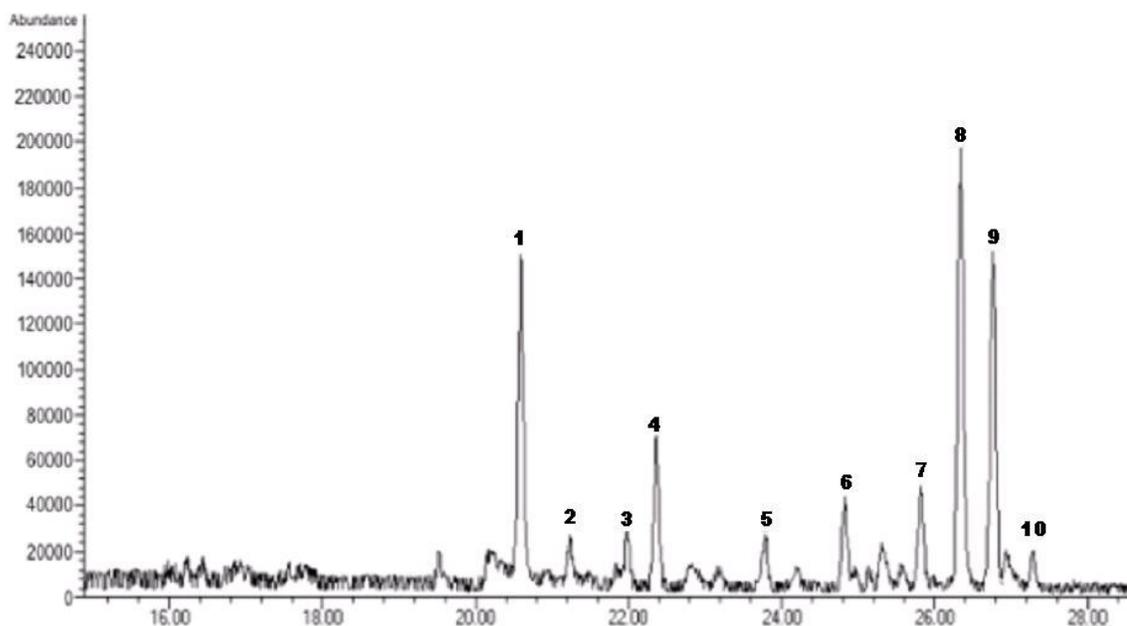


Figura 23: Cromatograma da fração volátil da *Calendula officinalis* obtido pela técnica de headspace por dedo frio.

Tabela 12: Identificação da fração volátil da *C. officinalis* pela técnica de headspace por dedo frio.

No	Substância	Area %	IRR calculado	IRR literatura
1	α -copaeno	16,572	1398	1376
2	β -cubebeno	3,320	1343	1390
3	α -gurjuneno	3,765	1394	1409
4	β -cariofileno	7,708	1407	1418
5	α -humuleno	3,528	1445	1454
6	γ -muuroleno	4,269	1471	1477
7	α -muuroleno	5,188	1495	1499
8	γ -cadineno	2,502	1507	1513
9	δ -cadineno	16,780	1519	1524
10	α -cadineno	2,075	1531	1538

IRR calc- Índice de retenção relativo calculado em coluna capilar DB5 (5% fenilmetilsiloxane). **IRR lit.-** Índice de retenção relativo encontrado na literatura em coluna capilar DB5. **EM-** Comparação com Espectros de Massas da espectroteca Wiley 275. **Lit.-** Comparação dos Índices de Retenção e/ou dos Espectros de Massas com a Literatura (ADAMS, 1995).

De acordo com a Figura 23 e Tabela 12 os compostos majoritários obtidos pela técnica HS-Dedo frio foram α -copaeno (16,57%), γ -cadineno (22,50%) e δ -cadineno (16,78%).

4.14.2 Análise do headspace pela técnica de micro-extração em fase sólida (SPME)

A micro-extração em fase sólida é uma técnica nova e rápida de análise sem solvente com pré-concentração dos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. Foi descrita por Berlardi e Pawliszyn em 1990 para análise química da água.

É uma técnica muito utilizada para análise dos constituintes químicos voláteis de alimentos, bebidas e plantas. Muitos trabalhos foram publicados sobre a aplicação prática desta técnica como pode ser visto em Garcia et al. (2004) em que foram analisadas por SPME várias amostras de óleo de oliva classificados de virgem e extra virgem e verificaram que 90% estavam classificados corretamente. Baranauskienė et al. (2004) utilizaram a técnica de SPME para identificar os constituintes voláteis dos óleos essenciais que foram microencapsulados de tomilho, orégano e cassia. Esta técnica também foi utilizada por Isidorov et al. (2003) para identificar os constituintes voláteis do *Pinus sylvestris* e *Picea exelsa* sendo identificados 60 substâncias orgânicas de diferentes classes. Deng et al. (2004) utilizou SPME para identificar os constituintes químicos voláteis de duas variedades das flores de osmanthus; o *Osmanthus fragrans* var. *latifolius* e *Osmanthus fragrans* var. *thunbergii* e os autores identificaram 40 constituintes químicos de ambas as variedades, destes, verificou-se diferença quantitativa dos constituintes majoritários presentes em ambas as variedades. Frank et al. (2003) identificaram o odor característico de três variedades de queijos: “cheddar”, “hard grating” e “mold-ripened blue” pela técnica de SPME verificaram que ácido butanóico, dimetil trissulfeto, metional e metanotiol estavam presentes nas três variedades pesquisadas. Boison; Tomlinson (2002)

publicaram experimento onde identificaram o aroma característico do vinho “Cabernet Sauvignon” realizando extração dos constituintes voláteis da *Vitis vinifera* a baixas temperaturas, identificando o 2-metoxi-3-isobutilpirazina responsável pelo aroma característico deste vinho. Wilkes et al. (2000) identificaram por SPME o odor produzido em alimentos como peixes, queijos, sucos de frutas, óleo de oliva, linguiça, leite, mel, quando estes foram atacados por microorganismos, ou sofreram oxidação lipídica foram decompostos por reações enzimáticas endógenas. Ainda na análise do aroma dos alimentos, foram realizados estudos analisando por SPME trufas conservadas a + 4°C por um período de poucos dias. Os resultados demonstraram que cinco dias foram suficientes para alterarem a composição química das mesmas analisando o aroma por SPME (FALASCONI et al., 2004). Ainda na área de alimentos, Mazida et al. (2004) realizou trabalhos analisando os constituintes voláteis do *Capsicum annuum* (chilli) por SPME durante os estágios de maturação dos frutos quando estes estavam verdes, intermediário e vermelho. Durante a maturação, verificou-se a presença de hexanal e 2-isobutil-3-metoxipirazina que foram decrescendo. No fruto maduro verificou-se a presença de 2,3-butanodiona, 3-careno, *trans*-2-hexenal e linalol, concluindo a importância da técnica utilizada para a qualidade comercial do chilli. Aumatell et al. (2004) analisaram por SPME sucos de frutas de apricot, pera e pêssigo no intuito de determinar se estes eram naturais (orgânicos) ou se eram adicionados flavorizantes. Identificaram norisoprenóides (naftalenos) presentes nas frutas do apricot e pêssigo, além de identificarem 97 ésteres, aldeídos, álcoois, terpenóides, lactonas e derivados isoprenóides. Fucci et al. (2003) utilizaram a técnica de SPME para determinar a presença de drogas consideradas abusivas na saliva, dentre estas cocaína, anfetaminas, cannabidiol dentre outras. Fustinoni et al. (2005) pesquisaram a presença de orto-cresol e meta-cresol metabólitos minoritários do tolueno com atividade neurotóxicológica em urina em humanos que trabalham com exposição ao tolueno. Em outro trabalho Domeno et al. (2005) utilizaram

esta técnica para determinação de esteróis em amostras de sangue. Os autores identificaram três precursores da biossíntese do colesterol (desmosterol, latosterol e lanosterol) e dois fitoesteróis (sitosterol e sitostanol). Ainda em relação ao meio ambiente, a técnica de SPME foi utilizada por Albanis et al. (2003) para fazer o monitoramento de pesticidas nas águas do rio Kalamas na região Epirus, noroeste da Grécia por 12 meses. A frequência maior detectada foram herbicidas comuns utilizados como trifluralin, atrazine e inseticidas como o carbofurano, diazinon, disulfoton, entre outros relatados no artigo. Já Sanusi et al. (2003) analisaram por SPME por quanto tempo os vapores de pesticida (diclorvos) ficam presentes na atmosfera e qual a quantidade presente.

SPME é uma técnica de equilíbrio que independe da matriz a ser analisada: sólida, líquida ou gasosa. Cada componente da amostra comporta-se diferentemente dependendo de sua polaridade, volatilidade, coeficiente de partição, volume da amostra, velocidade de agitação, pH e temperatura (TORQUILHO, 2001).

A técnica de análise por “headspace”: SPME utiliza uma seringa com agulha que guarda em seu interior um bastão de fibra (sílica fundida) de várias fases estacionárias e diferentes diâmetros (7-100 μm) e volumes de adsorção (0,03 – 0,7 μl). A fibra é recarregável, tem o poder de adsorção e de dessorção dos compostos voláteis da matriz sem perdas, permite injeção automática e manual em aparelhos de cromatografia gasosa (GC) (JIROVETS et al., 2002).

A tabela 13 mostra as fases estacionárias e suas recomendações de uso.

Tabela 13: Tipos de fases estacionárias para agulhas de SPME

Fase Estacionária	Uso
Polidimetilsiloxano (PDMS)	
100 µm	GC/HPLC
30 µm	GC/HPLC
7 µm	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	
65 µm	GC
60 µm	HPLC
Stable flex	
65 µm	GC
Poliacrilato	
85 µm	GC/HPLC
Carboxeno/ Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)	
75 µm	GC
Stable flex	
85 µm	GC
Carbowax / Divinilbenzeno (CW/DVB)	
65 µm	GC
Stable flex	
70 µm	GC
Carbowax / Resina temperada (CW/TPR)	
50 µm	HPLC
Stableflex/ Divinilbenzeno/ Carboxeno/PDMS (DVB/CAR/ PDMS)	
50/30 µm	GC
50/30µm	GC

Fonte: Sigma-Aldrich Co. (1999).

O cromatograma abaixo Figura 24 refere-se aos constituintes da fração volátil da calêndula utilizando a técnica de análise por “headspace” por SPME.

Para o cálculo do índice de Kováts, foi utilizado o cromatograma da série homóloga de hidrocarbonetos n-C9 a n-C30 (Figura 22) utilizado para a análise dos constituintes da fração volátil obtida por HS-SPME como pode ser observada na Tabela 14.

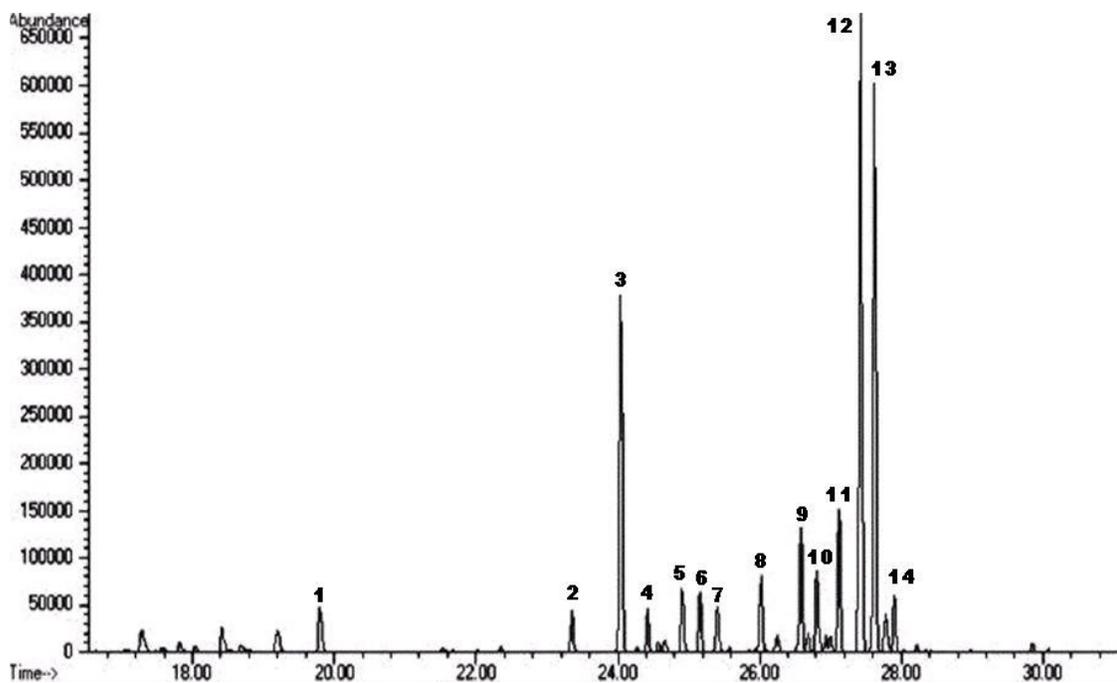


Figura 24: Cromatograma da fração volátil obtida por HS-SPME.

Tabela 14: Identificação da fração volátil da *C. officinalis* por HS-SPME

No	Substância	Area %	IRR calculado	IRR literatura
1	β -ciclocitral	2,059	1200	n.f
2	α -cubebeno	1,780	1338	1351
3	α -copaeno	15,120	1364	1376
4	β -cubebeno	1,807	1378	1390
5	α -gurjuneno	2,687	1396	1409
6	β -cariofileno	2,693	1400	1418
7	α -ionona	2,294	1420	1426
8	α -humuleno	3,955	1448	1454
9	γ -muuroleno	5,287	1474	1477
10	β -ionona	3,930	1485	1485
11	α -muuronelo	6,182	1500	1499
12	γ -cadineno	25,488	1516	1513
13	δ -cadineno	22,117	1525	1524
14	α -cadineno	2,280	1538	1538

IR calc.- Índice de retenção calculado em coluna capilar DB5 (5% fenilmetilsiloxane). **IR lit.**- Índice de Retenção encontrado na literatura em coluna capilar DB5. **EM**- Comparação com Espectros de Massas da espectroteca Wiley 275. **Lit.**- Comparação dos Índices de Retenção e/ou dos Espectros de Massas com a Literatura (ADAMS, 1995).

Conforme pode ser verificado no cromatograma Figura 24 e na Tabela 14 os componentes majoritários da fração volátil obtida por análise por “headspace”: SPME foram sesquiterpenos hidrocarbonetos: α -copaeno (15,12%), γ -cadineno (25,49%) e δ -cadineno (22,12%).

4.14.3 Estudo comparativo da identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* pelas técnicas de: Arraste a vapor e Análise por “Headspace” utilizando as técnicas de SPME e Dedo Frio “cold finger”.

Técnicas diferentes de separação são utilizadas no intuito de identificar os constituintes da fração volátil de várias espécies de plantas.

Em trabalho publicado por (KIM; LEE, 2002) intitulado “comparação de diferentes métodos de extração para a análise da fração volátil da *Lavandula angustifolia* por CG/EM”, utilizaram quatro técnicas diferentes para identificar os constituintes químicos da fração volátil da espécie *Lavandula angustifolia*: análise por “headspace” por SPME, e “cold finger”, destilação por arraste a vapor a pressão reduzida e destilação por arraste a vapor com extração de solvente e identificados por CG/EM.

Os resultados obtidos mostraram que dependendo da técnica utilizada para separação dos constituintes químicos, apresentou diferença na quantificação dos constituintes majoritários da *Lavandula angustifolia*. Pela técnica de análise por “headspace” por dedo frio verificou-se 35,44% de acetato de linalina e 18,70% de linalol. Já as técnicas de destilação por arraste a vapor com pressão reduzida e destilação por arraste a vapor com extração de solvente apresentaram concentrações de 2,63-4,04 e 36,80- 43,47% respectivamente.

Em outro trabalho publicado por Lee et al. (2003) intitulado “estudos comparativos de técnicas de extração para a determinação dos componentes voláteis do alho coreano por

CG/EM” os autores utilizaram técnicas de destilação por arraste a vapor, destilação por arraste a vapor com extração de solvente, análise por “headspace” por SPME.

Os resultados obtidos mostraram que os componentes majoritários foram dialil sulfito, alil sulfito e dialil trisulfito. Quando utilizou-se a técnica de destilação por arraste a vapor com extração de solvente, obteve-se: dialil sulfito 57,88%; alil sulfito 23,59% e dialil trisulfito 11,40%. Quando utilizou-se a técnica de destilação por arraste a vapor, obteve-se 89,77%, 2,43% e 3,89%. Para a técnica de análise por “headspace” por dedo frio, os resultados foram 97,77%, 0,17% e 0,10% e para a técnica de análise por “headspace” por SPME obteve-se 97,85%, 0,01% e 0,01% respectivamente.

Os cromatogramas das Figuras 21, 23 e 24 mostram que a técnica de extração é fundamental para a correta identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis*. A técnica por arraste a vapor identificou na fração volátil a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois. Já as técnicas de análise por “Headspace” por SPME e Dedo Frio, evidenciaram a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos.

Há, entretanto, uma concordância entre as três técnicas utilizadas quanto aos componentes majoritários, conforme pode ser verificado na Tabela abaixo:

A Tabela 15 faz um comparativo entre os constituintes majoritários e sua áreas (%) nas três técnicas de obtenção da fração volátil das flores de *C. officinalis*.

Tabela 15: Comparação dos constituintes químicos da fração volátil da *C. officinalis* obtidos pelas três técnicas de separação.

SUBSTÂNCIAS	ARRASTE A VAPOR (ÁREA %)	HS-SPME (ÁREA %)	HS-DEDO FRIO (ÁREA %)
α -copaeno	0,67	15,12	16,57
α -humuleno	0,58	3,95	3,52
γ -muuroleno	2,14	5,28	4,27
α -muuroleno	4,06	6,18	5,19
γ -cadineno	7,24	25,48	22,50
δ -cadineno	14,33	22,11	16,78
Viridiflorol	3,07	0,00	0,00
Epi- α -muurolol	12,09	0,00	0,00
α -cadinol	20,67	0,00	0,00

4.15 Fórmula estrutural, espectro de massa obtido por CG/EM e espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995) dos componentes majoritários da fração volátil obtida por arraste a vapor e headspace.

4.15.1 Alfa-muuroleno

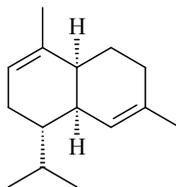


Figura 25: Estrutura química do alfa-muuroleno.

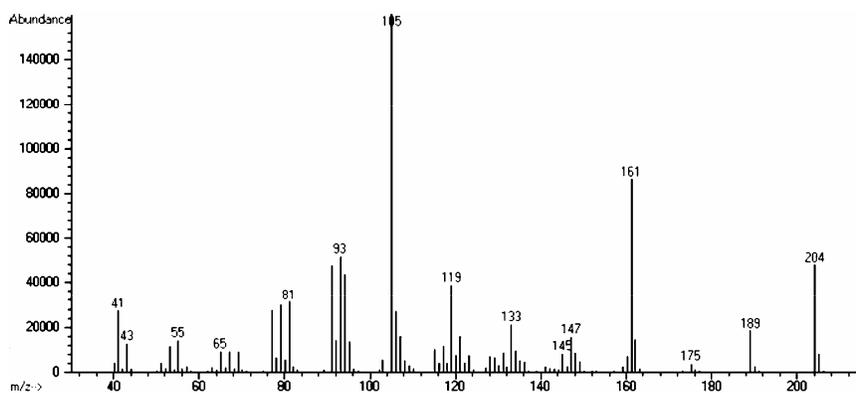


Figura 26: Espectro de massa do alfa-muuroleno obtido por CG/EM.

4.15.2 Gama-cadineno

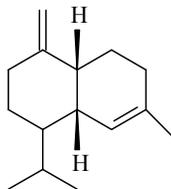


Figura 27: Estrutura química do gama-cadineno.

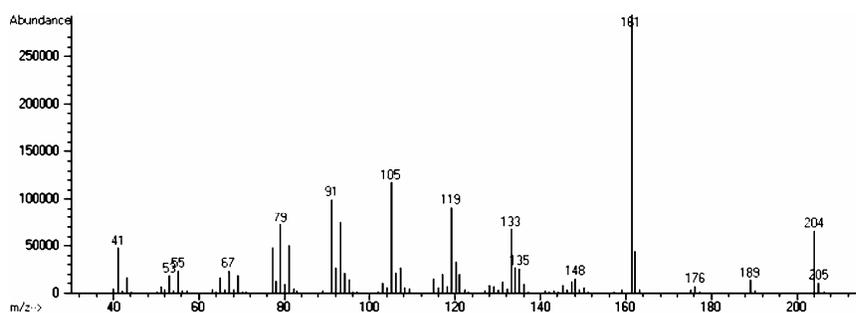


Figura 28: Espectro de massa do gama-cadineno obtido por CG/MS.

4.15.3 Delta-cadineno

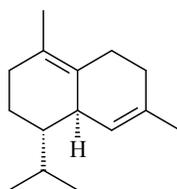


Figura 29: Estrutura química do delta-cadineno.

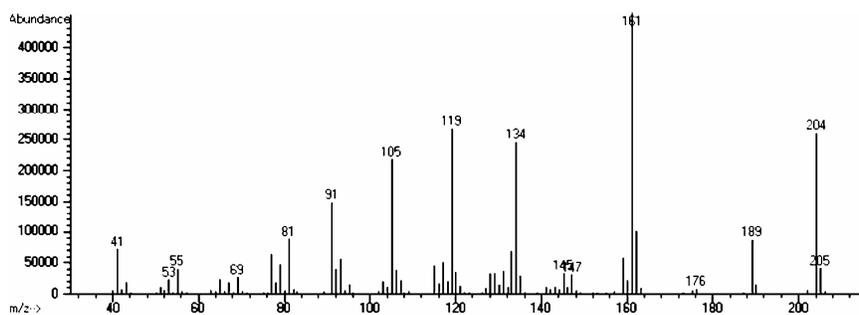


Figura 30: Espectro de massa do delta-cadineno obtido por CG/MS.

4.15.4 Viridiflorol

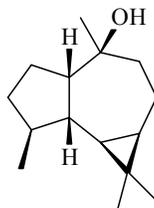


Figura 31: Estrutura química do viridiflorol.

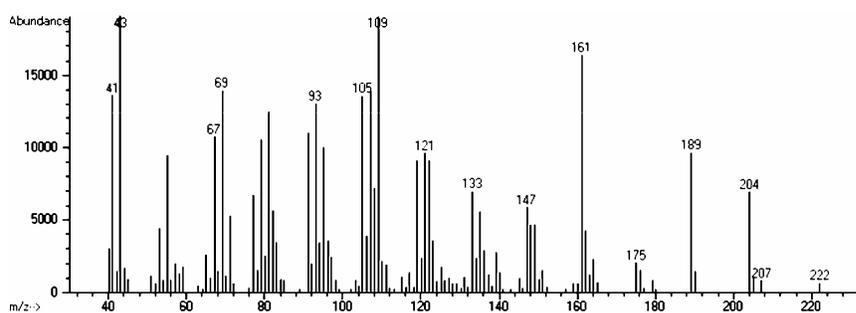


Figura 32: Espectro de massa do viridiflorol obtido por CG/EM.

4.15.5 Epi-alfa-muurolool

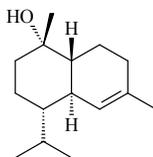


Figura 33: Estrutura química do epi-alfa-muurolool.

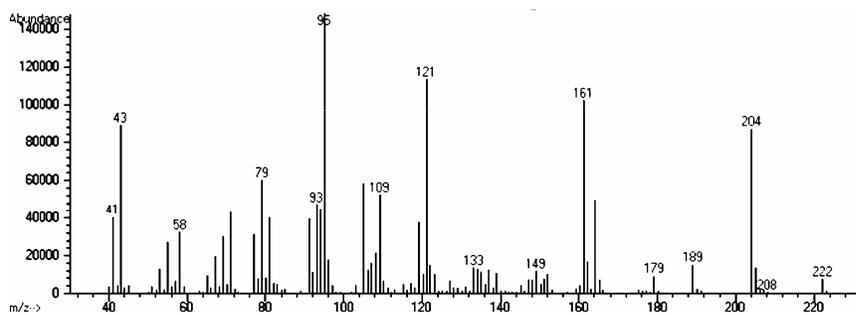


Figura 34: Espectro de massa epi-alfa-muurolool obtido por CG/MS.

4.15.6 Alfa-cadinol.

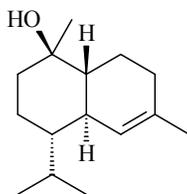


Figura 35: Estrutura química do alfa-cadinol.

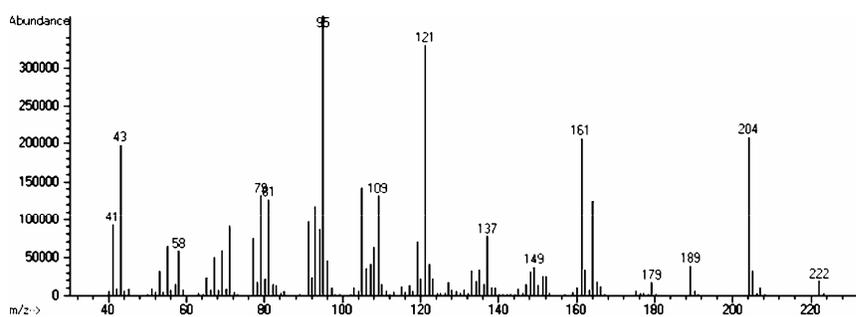


Figura 36: Espectro de massas do alfa-cadinol obtido por CG/MS.

4.15.7 Alfa-copaeno

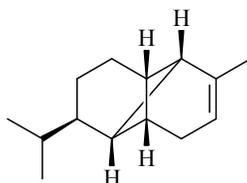


Figura 37: Estrutura química do alfa-copaeno.

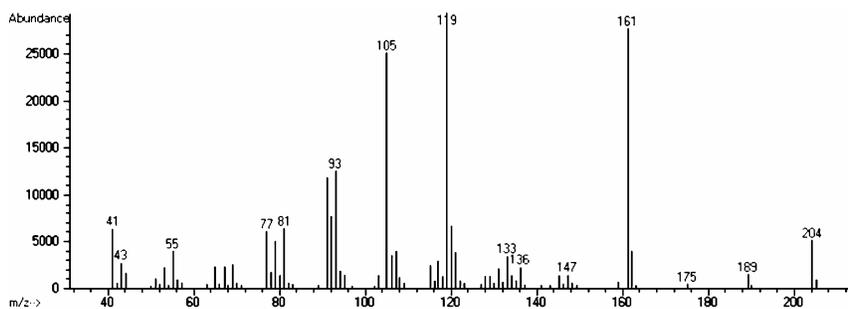


Figura 38: Espectro de massa do alfa-copaeno obtido por CG/MS.

4.15.8 Gama-muuroleno

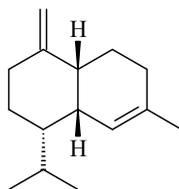


Figura 39: Estrutura química do gama-muuroleno.

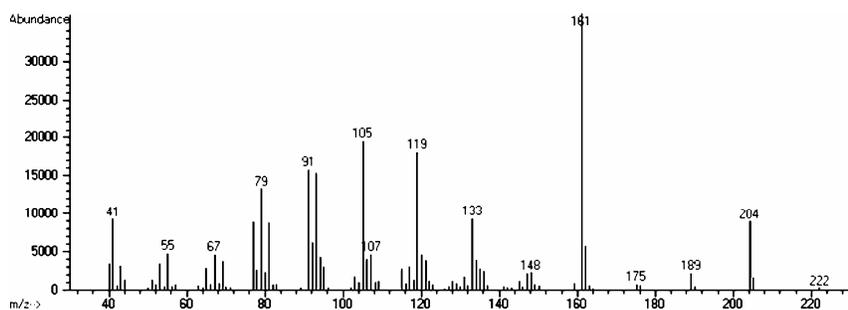


Figura 40: Espectro de massa do gama-muuroleno obtido por CG/MS.

4.15.9 Beta-cariofileno

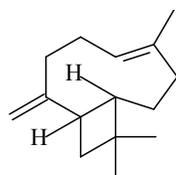


Figura 41: Estrutura química do beta-cariofileno.

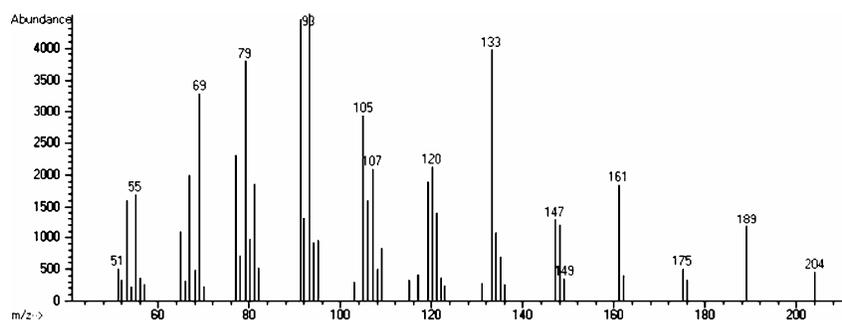


Figura 42: Espectro de massa do beta-cariofileno obtido por CG/MS.

4.16.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. officinalis* pelo método de difusão em disco.

Trata-se de uma técnica simples, rápida e muito utilizada que visa a capacidade de um composto se difundir no meio, e o resultado é obtido pelo halo de inibição deste composto. Para verificar a atividade do composto frente aos microorganismos, é importante levar em consideração a natureza do ágar-agar (LORIAN, 1996). A técnica utilizada para este experimento está descrita no NCCLS M7-A5 (2000). A atividade antimicrobiana do óleo foi verificada usando difusão em discos de papel de filtro. A inibição foi determinada, medindo o diâmetro do halo de inibição nas placas, como mostram as figuras abaixo.

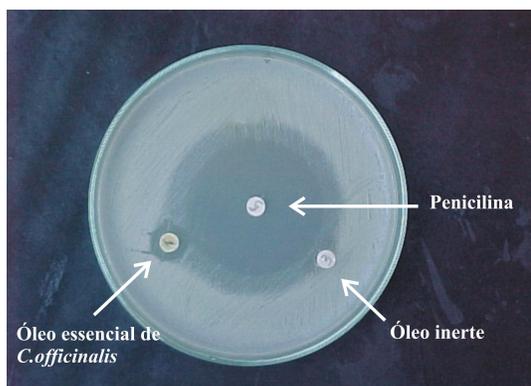


Figura 43: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de *Calendula officinalis* em *S. aureus*.

Discos impregnados de óleo essencial de *Calendula officinalis*¹, óleo mineral (inerte)³ e penicilina⁵.

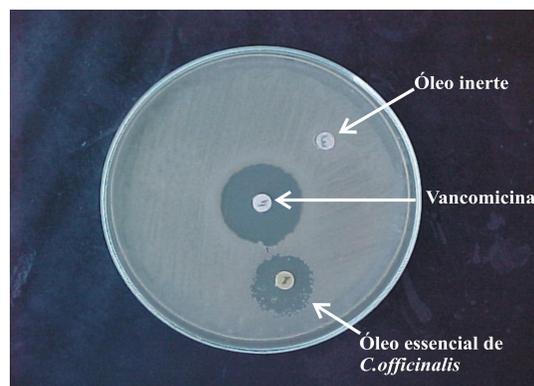


Figura 44: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de *Calendula officinalis* contra *B. subtilis*.

Discos impregnados de óleo essencial de *Calendula officinalis*¹, óleo mineral (inerte)³ e vancomicina⁴.

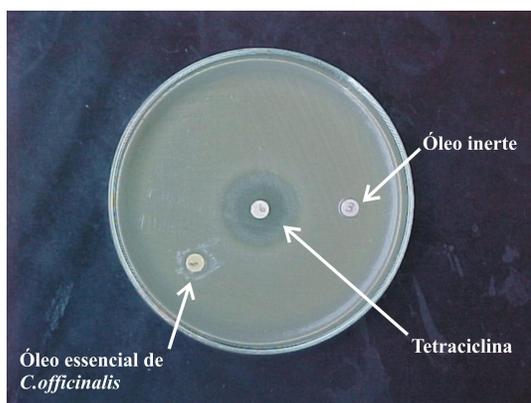


Figura 45: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de *Calendula officinalis* contra *E.coli*.

Discos impregnados de óleo essencial de *Calendula officinalis*¹, óleo mineral (inerte)³ e tetraciclina⁶.

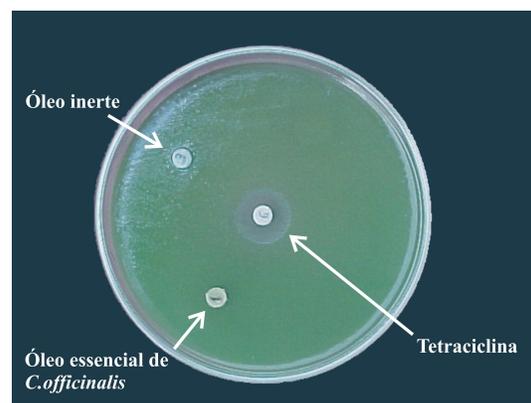


Figura 46: Determinação da atividade antimicrobiana em disco do óleo essencial de *Calendula officinalis* contra *P. aeruginosa*.

Discos impregnados de óleo essencial de *Calendula officinalis*¹, óleo mineral (inerte)³ e tetraciclina⁶.

A Tabela 17 complementa os dados das figuras acima, mostrando que o óleo essencial de *C. officinalis* proporcionou uma inibição de 11 mm para *S. aureus* conforme Figura 43 e 19 mm para *B. subtilis* Figura 44. Entretanto, para *E. coli* e *P. aeruginosa* não houve inibição como mostram as Figuras 45 e 46.

Tabela 17: Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. officinalis*

Substâncias	Atividade antimicrobiana (halo de inibição em mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Óleo essencial puro	11	19	00	00
Padrão: óleo Mineral	00	00	00	00
Penicilina	43	-	-	-
Vancomicina	-	24	-	-
Tetraciclina	-	-	22	43

4.17 Comparação dos constituintes químicos encontrados na fração volátil pesquisada com a literatura (CHALCHAT et al., 1991).

Na pesquisa, é importante comparar resultados no intuito de padronizar a metodologia empregada e obter resultados parecidos aos já citados na literatura. No caso da *Calendula officinalis* foi uma preocupação muito grande por esta planta ser de climas temperados, originária da região mediterrânea da Europa e aclimatada nas regiões sul e sudeste do Brasil. Fornecer condições de cultivo foi essencial para obter resultados semelhantes como pode ser visto nos trabalhos publicados por Chalchat et al. (1991).

4.17.1 Cromatograma da fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).

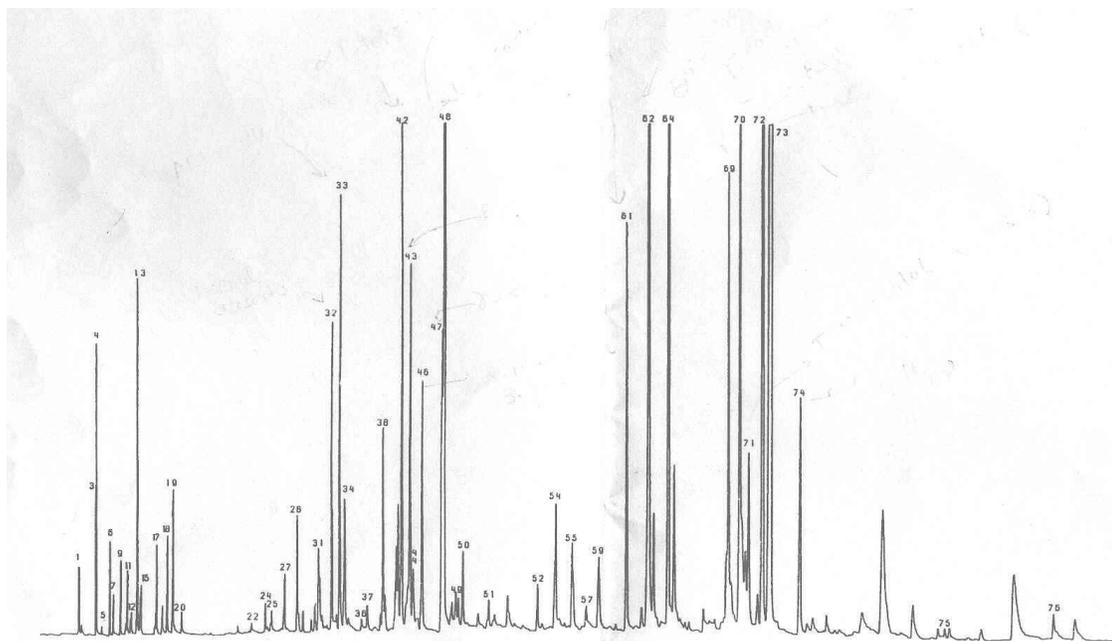


Fig. 1. Gas chromatogram of essential oil of *Calendula officinalis* L. (lot no. 1, flowers not immersed, decanted essential oil.)

Figura 47: Cromatograma da fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).

4.17.2 Identificação das substâncias presentes na fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).

Tabela 18: Identificação das substâncias presentes na fração volátil obtida por arraste a vapor (CHALCHAT et al., 1991).

No.	Substância	Área (%)	No.	Substância	Área (%)
1	Butanona	0,20	39	γ -amorfeno	0,10
2	Pentan-2-ona	0,04	40	β -farneseno	0,22
3	α -pineno	0,20	41	γ -muuroleno	0,45
4	β -fencheno	0,65	42	α -patchouleno	2,93
5	Canfeno	0,02	43	β -cubebeno	2,53
6	β -pineno	0,24	44	γ -cadineno	0,31
7	Sabineno	0,11	45	γ -patchouleno	n.o
8	C ₁₀ H ₂₄	n.o	46	α -muuroleno	1,54
9	Δ^3 -careno	0,21	47	γ_2 -cadineno	0,50
10	α -felandreno	0,02	48	δ -cadineno	12,10
11	Mirceno	0,17	49	Cubebeno	0,17
12	α -terpineno	0,12	50	α -cadineno	0,46
13	Limoneno	1,17	51	Calameneno	0,10
14	1,8-Cineola	n.o	52	C ₁₅ H ₂₆ O	0,28
15	β -felandreno	0,25	53	Calacoreno	n.o
16	<i>Cis</i> - β -ocimeno	n.o	54	Desconhecido	1,00
17	γ -terpineno	0,37	55	Desconhecido	n.o
18	<i>Trans</i> - β -ocimeno	0,40	56	Desconhecido	0,78
19	<i>p</i> -cimeno	0,59	57	Desconhecido	0,13
20	Terpinoleno	0,09	58	C ₂₀ H ₃₈	0,65
21	C ₁₀ H ₁₆ O	n.o	59	Desconhecido	n.o
22	Mentona	0,05	60	Desconhecido	n.o
23	α -copaeno	n.o	61	Desconhecido	2,76
24	Desconhecido	0,12	62	Nerolidol	8,14
25	β -ilangene	0,13	63	Cubenol	0,59
26	Cânfora	n.o	64	Epicubenol	7,26
27	Desconhecido	0,32	65	Desconhecido	0,04
28	α -gurjuneno	0,58	66	Desconhecido	0,12
29	β -cubebeno	0,11	67	Óxido de bisabolol	0,12
30	C ₁₀ H ₁₈ O	0,06	68	C ₂₁ H ₄₄	n.o
31	C ₁₀ H ₁₈ O	0,15	69	Epi- α -cadinol	3,21
32	Acetato de bornila	1,37	70	α -muurolol	5,67
33	Aromadendreno	2,25	71	Epi- α -muurolol	1,06
34	<i>Trans</i> -cariofileno	0,82	72	Eudesmol	7,83
35	Terpineno-4-ol	0,04	73	α -cadinol	25,50
36	Isômeros de γ -cadineno	0,07	74	C ₂₃ H ₄₈	0,14
37	Isômeros de γ -cadineno	0,13	75	<i>n</i> - C ₂₅ H ₅₂	0,10
38	α -humuleno	0,94	76	<i>n</i> - C ₂₇ H ₅₆	0,16

A calêndula utilizada no experimento realizado por Chalchat et al. (1991) foi cultivada na região de Massif Central, França, a técnica de extração foi por destilação por

arraste a vapor . Os constituintes majoritários encontrados foram δ -cadineno (12,10%) e α -cadinol (25,50%) conforme pode ser observado na Tabela 18.

5 CONCLUSÃO

A *Calendula officinalis* cultivada na região noroeste do Paraná mostrou possuir semelhanças da produzida na Europa no que diz respeito à composição química da fração volátil como pode ser visto pela comparação dos cromatogramas obtidos pelas técnicas de arraste a vapor. Conclui-se que oferecendo à planta condições ideais de plantio, coleta, secagem e extração, é possível obter fração volátil com constituintes químicos semelhantes àqueles obtidos de plantas produzidas em outros países.

A comparação das técnicas de extração da fração volátil da *C. officinalis* por destilação por arraste a vapor e análise por “headspace” utilizando as técnicas por SPME e “dedo” frio permitiram identificar 27 compostos através da comparação dos espectros de massas das substâncias encontradas com os espectros de massas da espectroteca Wiley 275 e do cálculo dos índices de retenção relativo (IRR) e comparação com os índices de retenção encontrados na literatura.

A extração por destilação por arraste a vapor permitiu identificar sesquiterpenos hidrocarbonetos (68% da área total, compostos de 1 a 15 e 22) e sesquiterpenos álcoois (27% da área total, compostos de 16 a 21). Os compostos majoritários foram: δ -cadineno (14,3%) e α -cadinol (20,7%). Analisando estes dados com os encontrados por Chalchat et al., (1991), que identificou os constituintes químicos da fração volátil da *C. officinalis* produzida na região de Massif central, França utilizando a técnica de arraste a vapor; verifica-se uma semelhança entre os dois experimentos dos componentes majoritários encontrados: δ -cadineno (12,10%) e α -cadinol (25,5%). Já em trabalho publicado por Radulescu et al. (2000) utilizando Calêndula produzida em Bucharest- Romênia e também utilizando a técnica de extração por

arraste a vapor, obteve como constituintes químicos majoritários: δ -cadineno (2,43%) e α -cadinol (4,88%) e α -muurolol (41,46%).

As técnicas de extração de análise por “headspace” SPME e dedo frio permitiram identificar sesquiterpenos hidrocarbonetos (100% do total da área) tendo como constituintes majoritários α -coapeno (15,12 e 16,57%), α -muuroleno (6,18 e 5,18%), γ -cadineno (25,48 e 16,78%) e δ -cadineno (22,12 e 16,78%) respectivamente.

A metodologia empregada foi eficiente ao comparar os resultados com os dados já descritos na literatura; observa-se que há uma semelhança na identificação das substâncias principalmente na identificação dos constituintes majoritários: α -cadinol e δ -cadineno. Isto sem dúvida deve-se aos cuidados em reproduzir as mesmas condições de plantio de seu habitat natural. Através das técnicas utilizadas conseguiu-se um óleo com os mesmos padrões do obtido na Europa. Isto é muito importante quando se quer padronização.

Quanto à atividade antimicrobiana, o óleo mostrou moderada atividade contra as bactérias *S. aureus* e *B. subtilis* nas duas técnicas utilizadas: microdiluição e difusão em disco de papel, podendo ter utilização na preservação de alimentos, uma vez que o *B. subtilis* é um contaminante de alimentos e o óleo possui odor compatível com alimentos.

Através da cromatografia gasosa de alta resolução CGAR e da utilização de um padrão interno (tridecano) foi possível quantificar os constituintes químicos da fração volátil das flores de *C. officinalis*: δ -cadineno (0,460 μg); γ -cadineno (0,172 μg); epi- α -muurolol (0,238 μg) e α -cadinol (0,657 μg).

A utilização do óleo essencial de calêndula na perfumaria pode ser comprovada através de seus constituintes majoritários, sesquiterpenos hidrocarbonetos como o δ -cadineno responsável pelo odor verde, doce e refrescante e pelo sesquiterpeno álcool o α -cadinol responsável pelo odor amadeirado presentes nas flores de calêndula.

6 REFERÊNCIAS

ACREE, T. E.; TERANISHI, R. *Flavor science: Sensible principles and techniques*. Washington: American Chemical Society, 1993. 351p.

ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy*. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995. 467p.

ADAMS, R. P.; HATBE, M.; PARK, S.; DAFFORN, M. R. Preliminary comparison of vetiver root essential oil from cleansed (bacteria-and fungus free) versus non-cleansed (normal) vetiver plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, Richmond, v. 32. p.1137-1144, 2004.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, H.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of asteraceae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, London, v. 43, n.6, p. 1255-1260, 1996.

ALBANIS, T. A.; LAMBROPOULU, V. A.; SAKKAS, V. A.; HELA, D. Monitoring of priority pesticides using SPME (solid phase microextraction) in river water from Greece. *Water Suppl*, Athens, v. 3. n. 1-2. p. 335-342, 2003.

AUMATELL, M. R.; CASTERALLI, M.; TAMAMES, E. L.; GALASSI, S.; BUXADERAS, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juice and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Ourense, v. 87. p. 627-637, outubro, 2004.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistr*, Ourense, n. 49. p. 4168-4170, 2001.

ALONSO, J. R. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998. 327-330p.

AMIRGHOFAN, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M. H. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal. *Journal of ethnopharmacology*, Leiden, v. 72. p. 167-172. 2000.

ARCTANDER, S. *Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*. Elizabeth, New Jersey: Ed. Deamark, by det Hoffensbergske Etablissement , 1960.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P. R.; GALDIKAS, A.; SENULIENE, D.; SETKUS, A. Testing of microencapsulated flavours by eletronic nose and SPME-GC. *Food Chemistry*, Whiteknights, v. 92. p. 45-54, 2004.

BOISON, J. O. K.; TOMLINSON, R. H. New sensitive method for the examination of the volatile flavor fraction of cabernet sauvignon wines. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 522. p. 315-327. novembro, 1990.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*, London, v. 64. p.1269-1275, 2003.

CRABAS, N.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PIVETTA, T.; PORCEDDA, S. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula alis* L. And *Aloysia triphylla* (L'Her). Britton by supercritical CO₂. *J. Essentiol Oil Res.*, Oregon, v. 15. p. 350-355, 2003.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. PH.; MICHET, A. Chemical Composition of Essential Oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour and Fragrance Journal*, Glasgow, v. 6. p. 189-192, 1991.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7. Ed. Campinas:Unicamp, 1997. 279p.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. *Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas*. Emater, 162 p. 1991.

DAVIS, G. D.; ESSENBERG, M. (+)- δ -cadinene is a product of sesquiterpene cyclase activity in cotton. *Phytochemistry*, London, v. 39. n. 3. p. 553-559, 1994.

DAVIS, E. M.; TSUJI, J.; DAVIS, G. D.; PIERCE, M. L.; ESSENBERG, M. Purification of (+)- δ -cadinene synthase, a sesquiterpene cyclase from bacteria-inoculated cotton foliar tissue. *Phytochemistry*, London, v. 41. n. 4. p.1047-1055, 1995.

DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, ST.; ISAAC, D. The role of triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta medica*, Münster, v. 60. p. 516-520, 1994.

DENG, C.; SONG, G.; HU, Y. Application of HS-SPME and GC-MS to characterization of volatile compounds emitted from *Osmanthus* flowers. *Annali di Chimica*, Torino, v. 94. n. 12. p. 921-7, dezembro, 1994.

DOMENO, C.; RUIZ, B.; NERIN, c. Determination of sterols in biological sample by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, v. 381. n. 8. p. 1576-83, 2005.

DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALANSAR, 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 françai*, Paris, v. 38. n. 6. p. 493-4, 1980.

ELIAS, R.; DE MÉO, M.; OLLIVIER, V. E.; LAGET, M.; BALANSARD, G.; DUMENIL, G. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L., and *Hedera helix* L. *mutagenesis*, Richmond, v. 5, n. 4 p. 327-331, 1990.

EL-SHAZLY, A. M.; HUSSEIN, K. T. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leuocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Richmond, v. 32. p. 665-674, 2004.

FALASCONI, M.; PARDO, M.; SBERVEGLIERI, G.; BATTISTUTTA, F.; PILONI, M.; ZIRONI, R. Study of white truffle aging with SPME-GC-MS and the Pico2-eletronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Milan, v. 106. p. 88-94. abril, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FIALLO, V. R. F.; HÉRNANDEZ, C. L. M.; REYES, M.; JORRIN, G, M.; BORREGO, J. C. A .; FERRADÁ, C. A . R. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L.. *Revista Cubana Planta Medica*, Havana, v. 5. n.1. p. 14-6 2000.

FRANCO, L. L. *As sensacionais 50 plantas medicinais, campeãs de poder curativo*. Curitiba: O naturalista Editora de Livros e Revista, 1999. p. 87.

FRANK, C. D.; OWEN, C. M.; PATTERSON, J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, Dordrecht, v. 37. p. 139-154. março, 2004.

FUCCI, N.; GIOVANNI, N.; CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva sample by SPME technique. *Forensic Science International*, Leiden, v. 134. p. 40-45. junho, 2003.

FUSTINONI, S.; MERCADANTE, R.; CAMPOS, L.; SCIBETTA, L.; VALLA, C.; FOA, V. Determination of urinary ortho- and meta-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass spectrometry. *Journal Chromatography B Analyt. Technol. Biomed Life Sci.*, Amsterdam, v. 817. n. 2. p. 309-17. Março, 2005.

GARCIA, G. D. L.; BARIE, N.; RAPP, M.; APARICIO, R. Analysis of virgin olive oil volatiles by a novel electronic nose based on a miniaturized SAW sensor array coupled with SPME enhanced headspace enrichment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Ourense, v. 52. n. 25. p. 7475-9. dezembro, 2004.

GARCIA, V. C.; FERRERES, F.; BARBETAN, F. A. T. Study of canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Z. Naturforsch*, Palo Alto, v.15. p. 731-735, 1993.

GRACZA, L. Oxygen-Containing Terpene Derivatives from *Calendula officinalis*. *Chemisch- Pharmazeutische*, Hannover, Co. n. 532. P. 227, 1987.

GRIEVE, M. A modern herbal. Ed. Dover Publication, inc. v. II, p.517-18.

HAMBURGER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; FÖRG, A.; WEINREICH, B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, Heidelberg, v. 74. p. 328-338, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, Belfast, The Society For Applied Microbiology. n. 86. p. 985-990, 1999.

HAZNEDAROGLU, M. Z.; KARABAY, N. U.; ZEYBEK, U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, Milan, v. 72. p. 829-831, 2001.

HELALY, F. M.; AHMED, A. A.; EL-GHAFFAR, M. A. A. Natural rubber base matrix containing *Calendula officinalis* plant as a source of molluscicidal saponin. *Journal of Controlled Release*, Boston, v. 57. p.1-7. 1999.

HINO, J. B.; HARVALA, C. E.; HINO, B. Antimicrobial activity screening of 32 constituents of essential oil. *Pharmazie*, Gainesville, v. 44. n. 4, Pireaus, 1989.

HOFFMANN, F. L.; SOUZA, S. J. F.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; DUTRA, A. L. Determinação da atividade antimicrobiana “ in vitro” de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. Curitiba, v. 17. n. 1. p. 11-20, jan/jun. 1999.

HSIEH, P. C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effects of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, Illions, v. 18. p. 35-43, 2001.

IZIDOROV, V. A. ; VINOGOROVA, V. T.; RAFAOWSKI, K. HS-SPME analysis of volatile organic compounds of coniferous needle litter. *Journal Atmospheric Environment*, Norwich, v. 37, 2003.

JIROVETS, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M. B.; GEISLER, M. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oil from Cameroon using solid-phase microextraction-gas chromatography, solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A.*, Amsterdam, v. 976. p. 265-275, 2002.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed. Pharmacother.*, Moulineaux, v. 51. p. 176-180, 1997.

KASPRZYK, Z.; PYREK, J.; TUROWSKA, G. The Variation of free and bound sterols in *Calendula officinalis* during vegetation. *Acta Biochimica Polonica*, Warszawa, v. 15 . n. 2, 1968.

KASPRZYK, Z.; TUROWSKA, G.; GRYGIEL, E.; KANABUS, M. The Variation in the Content of Triterpenoids in the Developing Flowers of *Calendula officinalis* L. *Acta Biochimica Polonica*. Polônia, v. 17, n. 4, 1970

KIM, N. S.; LEE, D. S. Comparision of different extraction methods for the analysis of fragances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, Amsterdam, v. 982. p. 31-47, 2002.

KLEPSEK, M. E.; BANEVICIUS, M. A.; QUINTILIANI, R.; NIGHTINGALE, C. H. Characterization of Bacterial Activity of Clindamycin against *Bacteroides fragilis* via Kill Curve Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Boston, v. 40. n. 8. p. 1941- 1944. Aug, 1996.

LEE, S. N.; KIM, N. S.; LEE, D. S. Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, v. 377. n. 4. p. 749-56, 2003.

LOPES, N. P. Circadian and Seasonal variation the Essential Oil from *Virola surinamensis* leaves. *Phytochemistry*, London, v. 46. n. 4. p. 689-693, 1997.

LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

MANGANI, G.; BERLONI, A.; MAIONE, M. "Cold" solid-phase microextraction method for the determination of volatile halocarbons present in the atmosphere at ultra-trace levels. *Journal of Chromatography A.*, Amsterdam, v. 988. p. 167-175. fevereiro, 2003.

MAZIDA, M. M.; SALLEH, M. M.; OSMAN, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *Journal of Food Composition and Analysis*, Rome, v. 18. P. 427-437. 2004.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, Copenhagen, v.16. p.337-342, 1992.

MONTANARI JUNIOR I. Aspéctos do Cultivo Comercial de Calêndula. *Revista Agroecologica Hoje*. Brasil. v. II abril/2000.

MONTANARI JUNIOR I.; FIGEUIRA, G. M.; MAGALHÃES, P. M.; PEREIRA, B.; ARCHÂNGELO JUNIOR U. Técnicas de Cultivo de *Calendula officinalis*. In: XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. Belo Horizonte, 1992.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards For Antimicrobial Testing. Twelfth Informational Supplement. Pennsylvania: Wayne. v. 22, no.1, 136p. Jan. 2000.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. approved standards. M7-A5. 5. ed. v. 20. n. 2. Jan. 2000.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. approved standards. M2- A7. 7. ed. v. 20. n. 1. Jan. 2000.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast standard*. M27-A2. 2. ed. v. 22. n. 15, 2002.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. 1.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. p. 5-111.

OPREAN, R.; TAMAS, M.; SANDULESCU, R.; ROMAN, L. Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Georgia., n.18, p. 651-657, 1998.

PATRICK, S.; WONG, Y.; FUKUTO, J. M. Reaction of organic nitrate esters and S-nitrosothiols with reduced flavins: A possible mechanism of bioactivation. *Drug Metabolism and Disposition*, Bethesda, v. 27. p. 502-509. abril, 1999.

PDR for Herbal Medicine. 2nd ed. New Jersey: Montvale, 2000. p. 497-99.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTARIS, A. H. *Journal of Immunological Methods*, New York, v. 208. n.151, 1997

PEREZ, M. P.; NAVAS-CORTES, J. A.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; CASTILLO, P. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology*, Faisalabad, v. 52, n. 3, p. 395-401, Jun, 2003.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (miq.) C. var. *pallenscens* (C. DC) yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98. n. 8. p. 1115-1120, dez. 2003.

PIETTA, P.; BRUNO, A.; MAURI, P.; RAVA, A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 593. p.165-170. 1992.

PIETTA, P.; FACINO, R. M.; CARINI, M.; MAURI, P. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of flavonol glycosides from medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 661. p.121-126, 1994.

PINI, G. F. Estudo da Classificação de Óleos Essenciais com uso combinado de Cromatografia Gasosa e Métodos Quimiométricos. 1995. Dissertação(mestrado)-Departamento de química, Universidade de Campinas, Campinas, 1995.

PORTE, A. Estudo de Óleos Essenciais de Três Plantas Condimentares da Família Lamiaceae: *Rosmarinus officinalis* L. *Salvia officinalis* L. *Thymus vulgaris* L. 2000. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2000.

RADULESCU, V.; DONEANU, C.; LOLOIU, T. CGC Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. *Revue Roumaine de Chimie*, Bucarest, v. 45. n. 3. p. 271-275, 2000.

RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, Leiden, v. 61. p. 49-55, 1988.

RASOOLI, I.; MIRMOSTAFA, S. A. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Ourense, n. 51. p. 2200-2205, 2003.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. Chemical and Aroma Determination of the Pulp and Seeds of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.). *Journal Brazilian of Chemistry Society*, Campinas, v. 11. n. 3. p. 425-28, 2003.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). *Química Nova*, São Paulo, v. 27. n. 3. p. 414-416, 2004.

REZENDE, C. M.; LOPES, O. C.; FRAGA, S. R. Principais substâncias responsáveis pelo aroma de mangas comerciais brasileiras identificadas por cromatografia gasosa de alta resolução/ olfatometria/ espectrometria de massas. *Química Nova*, São Paulo, v. 22. n.1. p. 31-36, 1999.

REZNICEK, G.; ZITTERL-EGLSEER, K. Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts. *Scientia Pharmaceutica*, Viene, 2003. 71:2. 121-128

SALLÉ, J. L. *O Totum em fitoterapia*. Robe editorial. São Paulo, 1996. 116p.

SANDRA, P.; BICCHI, C. *Capillary Gas Chromatography In Essential Oil Analysis*. New York: Huethig Heidelberg, 1987.

SANUCI, A.; FERRARI, F.; MILLET, M.; MONTURY, M. Pesticide vapours in confined atmospheres. Determination of dichlorvos by SPME-GC-MS at the microg m(-3) level. *Journal Environmental Monitoring*, Cambridge, v. 5. n. 4. p. 574-7. Agosto, 2003.

SCHULS, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. São Paulo: Ed. Manole, 2002. 316p.

SILVA, I. et al. Noções sobre o organismo humano e utilização de Plantas Medicinais. Cascavel: ed. Assoeste, 1995. p. 106-107.

SILVA JUNIOR, A. A. –CD de plantas medicinais. Ed. A. Epagri S.A- Windows 95 e Word 97

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. cap.18, Óleos Essenciais. 3. ed. Porto Alegre: Florianópolis: ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina. 2001.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. Edinburgh, n. 26. p. 118-122, 1998.

STEVENSON, R. Some constituents of *Calendula officinalis*. *Helvetica Chimica Acta*. Waltham: Brandeis University. v.31. p.1815, 1961.

SUR, S. V.; TULJUPA, F. M.; SUR, L. I. Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 542. p. 451-458, 1991.

TARLE, D.; DVORZAK, I. Antimicrobiana activity the calêndula flowers. *Farm. Vestn.*, Slovenia, v. 40. p.117-120, 1989.

TISSERAND, R. A Arte da Aromaterapia. São Paulo: Roca, 1993.

TORQUILHO, H. S. Composição química, atividade antiinflamatória, tripanomicida e antineoplásica do óleo essencial de *Tetradenia riparia* hochstetter codd. Dissertação (Mestrado)- Instituto de ciências exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2001.

VARGAS, R. S.; ZAVALA, M. A. S.; PÉREZ, C. G.; PÉREZ, R. M. G.; PÉREZ, S. G. Preliminary Study of antidiarrhoeic activity in five mexican plant species. *Phytoterapy Research.*, Hoboken, v. 12. p. 47-48, 1998.

VEIGA JR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytoterapy Researc*, Whiteknights, v. 15, n. 6. 476-480, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p. 1-49. 1983.

WANG, Y. H.; DAVILA-HUERTA, G.; ESSENBERG, M. 8-Hydroxy-(+)- δ -cadinene is a precursor to hemigossypol in *Gossypium hirsutum*. *Phytochemistry*, London, v. 63. p. 219-225. 2003.

WILKES, J. G.; CONTE, E. D.; KIM, Y.; HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J. B.; MILLER, D. W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in food. *Journal of Chromatography A.*, Amsterdam, v. 880. p. 3-33. Junho, 2000.

WILKOMIRSKI, B. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry*, London, v. 24. n. 12. p. 3066-3067, 1985.