

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***Calendula officinalis*: CONSTITUINTES QUÍMICO, EFEITOS NA
HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA E ANTINOCICEPÇÃO**

Dissertação apresentada por Ana Márcia de Matos Volpato como requisito para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Curi Pedrosa

ANA MÁRCIA DE MATOS VOLPATO
FLORIANÓPOLIS / SC
2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***Calendula officinalis*: CONSTITUINTES QUÍMICO, EFEITOS NA
HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA E ANTINOCICEPÇÃO**

Orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e

Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Curi Pedrosa

ANA MÁRCIA DE MATOS VOLPATO
FLORIANÓPOLIS / SC
2000

***Calendula officinalis*: CONSTITUINTES QUÍMICO, EFEITOS NA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA E ANTINOCICEPÇÃO**

Ana Márcia de Matos Volpato

Esta Dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da banca Examinadora

Prof. Dr. Rosendo A. Yunes
Orientador

Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. ROSENDO A. YUNES
Universidade Federal de Santa Catarina

PROF. DR. VALDIR CECHINEL FILHO
Universidade do Vale do Itajaí

PROF^a. DR^a. ROSÂNGELA CURI PEDROSA
Universidade Federal de Santa Catarina

PROF. DR. MARCUS MANDOLESI SÁ
Universidade Federal de Santa Catarina

PROF. DR. CARLOS CESAR STADLER
Universidade Estadual de Ponta Grossa

“ A beleza e a vitalidade são presentes da natureza para aqueles que vivem segundo suas leis.“

Leonardo da Vinci

“ A terra não pertence ao homem;

O homem pertence à terra.

O que acontecer à terra recairá sobre os
filhos da terra.

Da terra devemos olhar aos céus e
agradecer a Deus por toda esta dádiva que
recebemos.“

Ao Paulo, meu esposo: agradeço imensamente por ter transformado o meu sonho em nosso sonho. Por ter criado condições para que este sonho se transformasse em realidade.

Ao Guilherme e Amanda, meus filhos, meus grandes companheiros e a maior razão da minha vida. Na inocência da pouca idade que possuíam, foram capazes de compreender a minha ausência e sempre me receber com a alegria de quem entra numa festa.

Ao meu pai Jair (*in memoriam*), que iniciou a jornada junto a mim e não pode concluí-la, e minha mãe Anna pelo apoio eterno.

A realização deste trabalho foi possível graças ao empenho e dedicação dos queridos Mestres e Amigos: Professores Doutores Rosendo A. Yunes, Valdir Cequinel Filho e Rosangela Curi Pedrosa. A eles o meu “Muito Obrigada”!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Obdúlio Gomes Miguel*, pela amizade e sugestões neste trabalho;

Ao Prof. Dr. *Carlos Cesar Stadler*, Coordenador do Mestrado Inter-institucional UEPG-UFSC, pelo empenho, esforço e dedicação dispensado, visando sua concretização;

Aos amigos de batalha neste Mestrado Inter-institucional: *Rosi, Dione, Lourdes, Julho, Marcela, Salete, Amauri, Vanessa, Luciane e Adriane*

Aos colegas de laboratório: *Tânia, Ângela, Louisiane, Guedes, Cristiane, Fabiane e Niero*. Obrigada pela acolhida calorosa e pelas brilhantes colaborações oferecidas em momentos de incertezas.

Em especial à *Tânia, Ângela e Louisiane*. Graças aos momentos colaboração mútua, formamos uma bela amizade.

A Prof. Dr^a *Márcia* pelos testes biológicos realizados

À secretaria da Pós-Graduação da UFSC, em especial nas pessoas de *Graça e Jadir*, pela eficiência e apoio.

Aos ensinamentos obtidos junto a cada um dos professores, quer diretamente em disciplinas cursadas ou indiretamente com suas pessoas e/ou trabalhos realizados;

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e discussão do tema desenvolvido nesta dissertação;

A todos aqueles que estiveram presentes neste período de convívio;

À CAPES e ao Projeto Inter-institucional UFSC-UEPG pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 - Introdução	01
2 - Objetivos	04
3 - Revisão Bibliográfica	05
3.1 - Considerações gerais sobre a Família Asteraceae	05
3.2 - Considerações gerais sobre o Gênero <i>Calêndula</i>	06
3.3 - Considerações sobre a Espécie <i>Calendula Officinalis</i>	07
3.3.1 - Descrição Macroscópica das Flores de <i>C. officinalis</i>	07
3.3.2 - Descrição Microscópica das Flores de <i>C. officinalis</i>	08
3.3.3 - Visão geral das Flores de <i>C. officinalis</i>	09
3.3.4 - Características Botânicas Gerais de <i>C. officinalis</i>	10
3.3.5 - Características de Cultivo	11
3.3.6 - Posição Taxonômica	13
3.3.7 - Nomenclatura popular	13
3.4 - Atividade Farmacológica / Emprego Popular	13
3.5 - Estudos Científicos da Atividade Farmacológica de <i>C. officinalis</i>	18
3.6 - Composição Química de <i>C. officinalis</i>	21
4 - Hiperplasia Benigna de Próstata	31
5 - Parte Experimental	35
5.1 - Material e Métodos	35
5.2 - Coleta e Identificação do Material Botânico	37
5.3 - Extração e Obtenção do Extrato Metanólico Bruto	37
5.4 - Separação do Extrato Metanólico Bruto	38
5.5 - Fracionamento do Precipitado	38
5.6 - Isolamento e Identificação do PPT 1	39
5.7 - Isolamento e Caracterização do PPT 8	39
5.8 - Hidrólise da Saponina	39
5.9 - Outras Frações	40
5.10 - Filtrado	40
5.11 - Fração Hexânica	41
5.12 - Fração Diclorometano	41
5.13 - Fração Acetato de Etila	41
5.14 - Fração Butanólica	41
5.15 - Purificação das Frações Hex, DCM, AcEt, But	42
5.15.1 - Fração Hexânica	42
5.15.2 - Fração Butanólica	42

6 - Ensaio Farmacológico	44
6.1 - Preparo do Extrato para os Testes Farmacológicos	44
6.2 - Análise Farmacológica	44
6.2.1 - Estudos Biológicos da HBP	44
6.2.1.1 - Ensaio Biológicos	44
6.2.1.2 - Modelo Experimental	44
6.2.1.3 - Dosagens Bioquímicas	45
6.2.2 - Atividade Antinociceptiva	46
6.2.2.1 - Animais	46
6.2.2.2 - Testes de contorções Abdominais - Mod. Ác. Acético	46
6.2.2.3 - Dor induzida pela Formalina	47
6.2.2.4 - Dor induzida pela Capsaicina	48
6.2.2.5 - Drogas e soluções utilizadas	49
6.2.2.6 - Análise Estatística	49
7 - Resultados e Discussão	51
7.1 - Identificação dos Compostos Isolados	50
7.1.1 - Identificação do Composto PPT 1	50
7.1.2 - Identificação do composto BUT 4	56
7.1.3 - Resultados Obtidos por CG-MS da Fr. Hexânica	60
7.1.3.1 - Identificação do Espectro de Massas para o HEX 1	60
7.1.3.2 - Identificação do Espectro de Massas para o HEX 2	60
7.2 - Estudos Biológicos da HBP	65
7.2.1 - Hiperplasia Benigna de Próstata	65
7.2.1.1 - Análise do Peso da Próstata	66
7.2.1.2 - Análise dos níveis da Fosfatase Ácida	66
7.2.1.3 - Análise dos níveis de Testosterona	67
7.2.1.4 - Análise dos níveis do Colesterol	68
7.2.2 - Análise dos resultados Antinociceptivos	73
7.2.2.1 - Dor induzida pelo Ác. Acético	73
7.2.2.2 - Dor Induzida pela Formalina	75
7.2.2.3 - Dor Induzida pela Capsaicina	76
8 - Conclusões	79
9 - Referências Bibliográficas	80

RESUMO

O presente trabalho envolveu o estudo da composição química e das atividades biológicas (efeito anti-hiperplásico prostático e antinociceptivo) do extrato obtido das flores de *Calendula officinalis* L (Asteraceae), planta ornamental cultivada na região do estado do Paraná.

Para o estudo fitoquímico foi preparado um extrato metanólico 80% das flores secas de *C. officinalis* e para o estudo das atividades biológicas, um extrato etanólico 50%.

O estudo químico envolveu a extração, isolamento e a identificação de um ácido graxo (ácido palmítico), no precipitado formado durante a evaporação do solvente e um flavonóide (Tyfhaneoside), presente na fração butanólica, ambos compostos já descritos na literatura para a *C. officinalis*. Através de CG-MS foi possível identificar, na fração hexânica, o ácido octadecanóico e uma pequena concentração do ácido palmítico. Foi constatado alta concentração de uma saponina derivada do ácido oleanóico, tendo sido constatado alta toxicidez para este composto.

Nos testes farmacológicos foi evidenciado uma ação antinociceptiva intensa para a fração butanólica, que provavelmente está associada a alta concentração de flavonóides. Foi ainda verificado uma potente ação analgésica para o ácido palmítico, sendo que esta ação ainda não tinha sido investigada para este composto.

Foi estudado o efeito do extrato bruto etanólico sobre a Hiperplasia Benigna de Próstata, onde se constatou um efeito benéfico importante deste extrato para esta patologia, sendo este efeito farmacológico inédito para a *Calendula officinalis*.

ABSTRACT

This thesis develops a study of the chemical composition and the biological activities (prostatic anti-hiperplasic effect and antinociceptive effect) of the extract obtained from flowers of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), an ornamental plant which is cultivated in the area of the state of Paraná.

For the fitochemical study a metanolic extract 80% of *C. officinalis* dried flowers was prepared, and for the study of the biological activities, an etanolic extract 50%.

The chemical study involved the extraction, isolation and identification of a fatty acid (palmitic acid) in the precipitate formed during the evaporation of the solvent and a flavonoid (*Tyfhaneoside*) present in the butanolic fraction. Both of these compounds are described in the literature on *C. officinalis*. CG-MS enabled the identification of octadecanoic acid and a small concentration of the palmitic acid in the hexanic fraction. A high concentration of a saponin derived from the oleanolic acid was found, with the verification that this compound presents a high degree of toxicity.

The pharmacological tests revealed an intense antinociceptive action for the butanolic fraction, which is probably associated with the high concentration of flavonoids. In addition to this, the study detected that the palmitic acid has a powerful analgesic action, a property which had not previously been investigated.

The application of the crude etanolic extract on Prostate Benign Hyperplasia revealed that it exerts an important beneficial effect on this pathology, a finding which represents an unprecedented pharmacological property of *C. officinalis*.

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo o homem aprendeu a utilizar as substâncias naturais, principalmente aquelas de origem vegetal, para tratar suas doenças. Embora mais recentemente a procura por substâncias farmacologicamente ativas tenha aumentado consideravelmente, principalmente através da síntese de milhares de novos compostos, a busca por substâncias naturais bioativas ainda desperta grande interesse (BARREIRO, 1990; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). A fitoterapia brasileira, em conjunto com a de todo o mundo, encontra-se em processo de ampla expansão desde os anos 70. O processo é decorrente de vários fatores, mas principalmente pela consciência atual de que os produtos de origem vegetal são menos agressivos ao organismo humano, e que realmente possuem efeitos terapêuticos (MARQUES, 1999).

Como qualquer outro ser vivo, uma planta interage com o meio onde vive e esta interação se dá através de compostos químicos, sendo que uma espécie vegetal pode produzir em locais, épocas ou até mesmo horas diferentes, substâncias diferentes ou quantidades diferentes de uma mesma substância. Assim, é necessário um controle rigoroso, qualitativo e quantitativo, dos princípios farmacologicamente ativos, presentes no material vegetal utilizado como medicamento (BAUER E TITTEL, 1996).

Além disso, as condições de obtenção, secagem, e estocagem podem influenciar consideravelmente o padrão dos constituintes. A polaridade do solvente, o modo de extração e a instabilidade dos constituintes podem influenciar na qualidade dos extratos. Portanto, a composição química das preparações herbáceas precisam ser caracterizadas e padronizadas antes que qualquer afirmação seja feita com relação à sua eficácia e toxicidade (BAUER e TITTEL, 1996; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

A química de produtos naturais compreende a síntese ou isolamento de compostos, a elucidação ou confirmação de suas estruturas moleculares, a caracterização de propriedades físico-químicas, a determinação da atividade biológica e a exploração dessa atividade à nível molecular pelo estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica (MONTANARI, 1995).

Cabe aos químicos de produtos naturais, através de técnicas instrumentais modernas, conhecer os princípios ativos responsáveis pela cura das enfermidades a fim de analisar e padronizar estes fitofármacos.

Durante os últimos anos, o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina tem encontrado inúmeros resultados promissores, com várias plantas brasileiras, sob os aspectos químico-medicinais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Dando continuidade a estes estudos, selecionou-se, para investigação química e biológica, a planta *Calendula officinalis*, sendo esta muito conhecida e utilizada medicinalmente pela população.

A *C. officinalis* está incluída como planta medicinal no projeto de fitoterapia que está sendo implantado no Sistema Único de Saúde de todo o país. Pertencente à família Asteraceae (Compositae), é conhecida popularmente como Calêndula, Margarida-dourada, Bem-me-quer, entre outros. É uma planta ornamental muito comum em todo o país e amplamente utilizada na medicina popular. Seu maior emprego está relacionada à ação cicatrizante, antisséptica e antiinflamatória (TESKE E TRENTINE, 1994).

Sua rica composição química inclui óleo essencial, flavonóides, ácido oleanóico, saponinas, mono, di, triterpenos, entre outros (FONT-QUER, 1987).

Com o intuito de contribuir com o estudo de produtos naturais, nos propomos a investigar a constituição química da *C. officinalis* que ocorre na região do Paraná e pesquisar novos potenciais farmacológicos desta planta, enriquecendo assim o seu emprego medicinal.

2. OBJETIVOS

- 1 – Testar as atividades farmacológicas do extrato bruto e frações semi-purificadas;
- 2 – Isolar e identificar os compostos responsáveis pelas atividades detectadas;
- 3 - Caracterizar quimicamente a *C. officinalis* paranaense;
- 4 – Contribuir para estudos farmacológicos posteriores das moléculas identificadas e de seus mecanismos de ação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ASTERACEAE

Antiga família Compositae (CORREA, 1994), atualmente classificada como Asteraceae (ESCHRICH, 1997), compreende cerca de 1.100 gêneros e 26.000 espécies, a família Asteraceae é composta por plantas herbáceas e arbustivas, podendo ser anual ou perene (JOLY, 1979).

A grande maioria dos gêneros (cerca de 98%) é constituída por plantas de pequeno porte (JOLY, 1991), somente nas zonas tropicais e subtropicais chegam a formar arbustos e até árvores (SCHULTZ, 1984)

As folhas geralmente são inteiras ou ligeiramente denteadas (SCHEFFER, 1989), imitando a forma de espátula (PENNA, 1921) porém nunca compostas, podendo ser opostas, alternas ou verticiladas. Possuem tricomas glandulares que secretam óleos essenciais. Encontra-se também glândulas no tecido foliar (JOLY, 1979).

A inflorescência é do tipo capítulo, o qual é constituído por um receptáculo achatado, côncavo ou convexo, sobre o qual inserem-se flores sésseis sendo o conjunto envolvido por brácteas involucrais denominadas filárias. As flores são de simetria radial ou zigomorfas até bilabiadas. Os capítulos podem conter só flores tubulosas iguais ou ter flores liguladas nos bordos e tubulosas no centro ou só flores liguladas ou ainda só flores bilabiadas. Os capítulos podem conter só flores hermafroditas, ou as flores dos bordos só femininas e as do disco são hermafroditas, ou as do bordo são femininas e as do disco são só masculinas ou então só contêm flores masculinas ou só femininas em plantas separadas. (JOLY, 1991).

O cálice é profundamente modificado, transformado no papilho ("pappus"), servindo à disseminação do fruto. O papilho pode ser piloso ou às vezes espinhoso (JOLY, 1991).

A corola pentâmera com 5 lobos iguais ou então ligulada ou bilabiada (JOLY, 1979).

O ovário é sempre ínfero, unilocular, bicarpelar e com um só óvulo ereto. Estilete freqüentemente com um anel de pêlos logo abaixo da bifurcação. (JOLY, 1991).

O androceu possui cinco estames, com anteras biloculares e unidas entre si, em redor do gineceu. É este formado de dois carpelos medianos, abertos e concrecentes em ovário de um locelo com óvulo anátropo e inserido na base do carpelo (PINTO, 1995).

O fruto seco tipo aquênio, disperso pelo vento ou excepcionalmente ficando encerrado no capítulo, que então tem brácteas duras e espinhosas (JOLY, 1991).

3.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *CALENDULA*

O nome botânico provém do latim *calendulae* ou *calends* e significa o primeiro dia do mês, enfatizando o longo período de floração (STUART, 1979)

Nas flores observa-se um capítulo com receptáculo uniforme e vários verticilos de flores femininas. É comum serem estéreis na margem da inflorescência. A corola destas flores é ligulada, grande e tem a função de aparelho chamariz, para atrair os insetos, podendo assim imitar as pétalas de uma flor individual. No centro da

inflorescência há hermafroditas, actinomorfas, unicamente destinadas à reprodução. A disposição descrita encontra-se em muitos gêneros, não porém em todas. Existem todas as disposições, teoricamente possíveis, com ou sem diferenciação em aparelho chamariz e reprodutor. Pode haver, no mesmo capítulo flores todas do mesmo sexo, unissexuais e todas iguais entre si, bem como flores femininas e masculinas e ainda podem haver, flores femininas e hermafroditas, ou masculinas e hermafroditas. O cálice das flores individuais é sempre pouco desenvolvido, sendo aderente ao tubo corolínico. Muitas vezes se transforma numa roda de cerdas persistente, destinadas a transportar o fruto, funcionando como um pequeno paraquedas denominado papo. O ovário é ínfero, formado por dois carpelos sincarpous que constituem um ovário unilocular, com um único óvulo. Produz um aquênio de forma variável, conforme a espécie (SCHULTZ, 1986) .

3.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Calendula officinalis*

3.3.1. DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DAS FLORES DE *C. officinalis*

Apresentam capítulos florais largos com uns 4 cm de diâmetro (SCHEFFER, 1989), terminais, solitários, encontrados no alto de cada ramo (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

As folhas apresentam-se oblongas, agudas, um tanto suculentas, largas, um pouco cordatas na base, parte superior lanceolada, margens internas com freqüência hispídas, com pequenos fiapos. O caule errante, com 15-45 cm de altura, possui

numerosas ramificações, apresenta-se estriado, verde, suculento e pubescente. As raízes são fibrosas (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

As flores são desprovidas de ovário, corola amarelo brilhante ou alaranjada, com 15-25 mm de comprimento e 3 mm de largura, 1-3 denteada com quatro a cinco nervuras, margem quase inteira, tubo pubescente freqüentemente fechando os vestígios do estilete filiforme e do estígma bífido; ovário oblongo, 0,5 mm de comprimento, pubescente. Odor fraco e aromático, sabor salgado e levemente amargo (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

3.3.2.DESCRICÃO MICROSCÓPICA DAS FLORES DE *C. officinalis*

Microscopicamente, o fragmento da corola apresenta-se com células da epiderme alongadas e arredondadas, onde o ponto de ligação é em forma de raíz. A epiderme mostra-se de forma irregular com numerosos estômatos dispersos. Apresenta ainda os grãos de pólen em grande número e espinhosos com 40 µm de diâmetro com três poros e exima espinhosa (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953)

Caracteriza-se como pó amarelo, consistindo de fragmentos de flores. Células epidérmicas estreitas, alongadas com paredes sinuosas, cromoplatídeos irregulares e algumas vesículas de óleo, pêlos não glandulares bisseriados, com 1-2 células no ápice de até 900 µm de comprimento; cristais de oxalato de cálcio de 2-6 µm de diâmetro (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

3.3.3. VISÃO GERAL DAS FLORES DE *C. officinalis*



FIGURA 1 - Foto da flor de *Calendula officinalis*

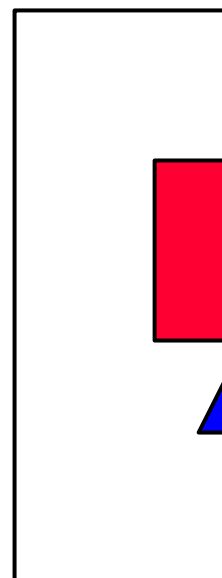




FIGURA 2 - Foto de um canteiro de *Calendula officinalis*

3.3.4. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS GERAIS DA *C. officinalis*

RAÍZ – É considerada uma raiz longa (KEVILLE, 1995). É constituída por uma raiz cabeluda, amarelo pálida, com forma cilíndrica (BALBACH, 1968), haste direita angular e ramosa (PENNA, 1921)

CAULE – apresenta um caule robusto e anguloso (SCHEFFER, 1989) ereto de 35 a 70 cm (CORRÊA, 1984) , podendo ainda ser ramoso e aveludado (CASTRO, 1981), com hastes espessas, onde se inserem as folhas (CORREA, 1994). Possui 15-20 cm de altura (CHATONET, 1983)

FOLHAS - Possui folhas inteiras ou denteada e calosa (FONT-QUER, 1987; Scheffer, 1989), as inferiores oblongas, as superiores espatuladas (CASTRO, 1981),

sendo entradas ligeiramente sinuosas, alterando saliências (URIBE, 1990). As folhas superiores possuem um pouco de pubescência (CORREA, 1994; FONT-QUER, 1987).

FLORES – São cultivadas como planta ornamental, que cresce facilmente e serve para decorar o jardim ou até mesmo pequenos vasos (CORREA, 1994). As flores brotam nas extremidades das hastes e tem 4 a 5 cm de diâmetro (SCHEFFER, 1989). O botão central possui de 15 a 20 lígulas ao redor, muito estendidas ao sol, de coloração amarelo, às vezes alimonado ou alaranjado, de acordo com a variedade. As lígulas produzem fruto e as flores do botão central, não (FONT-QUER, 1987). As pétalas centrais das flores são tubulosas e as periféricas liguetadas (CORREA, 1994). Geralmente se prefere os cultivares dobrados vermelho alaranjado escuros (STARÝ, 1992; VOLÁK e STODOVA, 1990), sendo estas as mais recomendadas pela farmacopéia (CASTELLANI, 1995; ARMOND, 1998). Possui aroma brando e pouco agradável e sabor a princípio adocicado e depois amargo (PENNA, 1921).

SEMENTES - As sementes, que na verdade são frutos, têm uma forma curiosa, arqueada (SCHEFFER, 1989), ligeiramente curvo (PENNA, 1921), em arco ou círculo (CASTRO, 1981)

3.3.5. CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO:

CLIMA - O clima deve ser temperado, aproximadamente 28 °C, solo drenado e rico em nutrientes orgânicos. Deve-se evitar alagamento pois o excesso de água é prejudicial para seu desenvolvimento (ROSESTELATO, 1996).

SOLO - Vegetam facilmente em solos bem estruturados, originários da decomposição orgânica (SCHEFFER, 1989)

ESPAÇAMENTO - recomenda-se 40 a 50 cm de espaçamento (SCHEFFER, 1989)

GERMINAÇÃO - Precisam do escuro para germinar (SCHEFFER, 1989; KEVILLE, 1995), ocorrendo este em 24 dias (SCHEFFER, 1989).

TEMPERATURA - Variando de 20 a 30 °C.

pH DO SOLO - 5,8 (ROSESTELATO, 1996).

COLHEITA - Da calêndula são colhidos somente as flores (capítulos florais). Como a planta emite flores por um longo período, as colheitas devem ser feitas regularmente, colhendo-se somente as flores totalmente desenvolvidas, ainda sem início de formação de "sementes", com um mínimo de pedúnculo. A colheita deve ser feita após a evaporação do orvalho (SCHEFFER, 1989). A colheita das flores promove o florescimento (KEVILLE, 1995)

SECAGEM - A secagem pode ser feita em galpão ou estufa. Nesta, a temperatura não deve ultrapassar 35 graus (SCHEFFER, 1989).

ESSÊNCIA - Contém ao redor de 0,002 % de óleo essencial (SCHEFFER, 1989). Segundo STARÝ, 1992, o teor de óleo essencial varia de acordo com a coloração das flores, sendo que o teor médio de essência obtida das flores amarelas foi de 0,0277 e das alaranjadas de 0,0435.

3.3.5. POSIÇÃO TAXONÔMICA (CRONQUIST, 1988)

REINO – *PLANTAE*

DIVISÃO – *MAGNOLIOPHYTA*

SUB-CLASSE – *ASTERIDAE*

ORDEM – *ASTERALES*

FAMÍLIA – *ASTEARACEA*

GÊNERO - *CALENDULA*

ESPÉCIE – *Calendula officinalis*

3.3.6. NOMENCLATURA POPULAR

Calêndula; maravilha; bem-me-quer; ma-me-quer; mal-me-quer amarelo; margarida dourada; flor de todo ano; maravilha dos jardins; flor de cemitério; ervado-sol (SCHEFFER, 1989; FONT-QUER, 1987; STUART, 1979; CASTRO, 1981; PENNA, 1921; JOLY, 1991).

3.4. EMPREGO POPULAR

Como fitoterápico está indicada em casos de inflamação da pele e da membrana mucosa, queimaduras suaves, escaras, avermelhamento de peles sensíveis e delicadas. No tratamento de feridas purulentas de difícil cicatrização (TESKE e TRENTINE, 1995).

Nas feridas, pode-se usar também o unguento de Calêndula o qual deve, entretanto, ser preferido para as queimaduras (KEVILLE, 1995; ULLMAN, 1988; CAIRO, 1987).

A calêndula tem sido predominantemente empregada externamente pela sua ação cicatrizante, anti-séptica e antiinflamatória na pele e mucosas, no tratamento de absessos e furúnculos (SANTOS, 1995).

O chá das flores é excitante e antiespasmódico, usando-se igualmente contra a icterícia e escorbuto e inflamações purulentas; por via oral, no artrismo, doenças nervosas (CRUZ, 1982).

Tradicionalmente tem sido usada como cataplasma ou chá, para promover a drenagem do inchaço das glândulas do linfo, tal como em amigdalites e como uma parte da terapia para o câncer uterino e o câncer da mama (KEVILLE, 1995)

É ideal para auxiliar os primeiros socorros de pequenas queimaduras (TESKE e TRENTINE, 1995; ULLMAN, 1988), como causadas pela ingestão de alimentos ou de bebidas extremamente quentes, ou pela aspirina, também são aliviados com a tintura de Calêndula. Se a tintura não puder ser obtida de imediato, um chá de Calêndula é igualmente eficaz (DORCSI, 1982), um cataplasma ou compressa, seja qual for o mais apropriado (HOFFMAN, 1996).

Atua também contra úlceras antigas e inflamadas, doloridas com crosta e secreção abundante de pús. Em úlceras varicosas, ulceração dos mamilos e feridas antigas descuidadas, com gangrena ameaçadora (CORRÊA, 1984; VANIER, 1987).

As folhas da Calêndula são contusas e servem para curar verrugas e tumores ulcerados (CORRÊA, 1984; VANIER, 1987; DUKE, 1985)

As úlceras crônicas das pernas melhoram rapidamente com a utilização da pomada de Calêndula, que as limpa dos micróbios, dá-lhes um bom aspecto, promovendo eficaz cicatrização (CAIRO, 1987).

Com a calêndula se fabricam pomadas (CRUZ, 1982; DUKE, 1985) e sabonetes para a limpeza de pele e queimaduras. As folhas são eficientes em aplicações locais em calos e verrugas (CRUZ, 1982) .

O ácido oleanólico possui ação suavizante para peles sensíveis, avermelhadas. Favorece a regeneração de tecidos danificados, e exerce efeito antiséptico. As mucilagens e os flavonóides reforçam a ação cicatrizante (TESKE e TRENTINE, 1995).

Na irritabilidade consecutivas à dor causada por um ferimento (VANIER, 1987). É um ingrediente de cremes porque ela diminui a inflamação de deslocamentos, picadas e outras inchações, suavizam as queimaduras de sol, erupções e irritações da pele (KEVILLE, 1995).

COSMETOLOGIA

Como fitocosmético é indicada no tratamento de acne, eczemas, abscessos e impetigo. Na prevenção de assaduras de crianças e como protetor dos raios UVA e UVB. (TESKE e TRENTINE, 1994).

As flores produzem uma tintura amarela brilhante em espumas de banho. São comercializadas como flores de corte.(KEVILLE, 1995)

MICROBIOLOGIA

Um chá forte pode ser colocado em cima das erupções da pele, inclusive o sarampo. Estudos em laboratório mostram que ocorre inibição de bactérias e fungos. O chá de Calêndula é utilizado com eficiência em afta (uma espécie de fungo cândida) na boca de crianças, ainda essa atividade antifúngica pode ser usada tanto internamente como externamente, para combater infecções (KEVILLE, 1995).

ODONTOLOGIA

A tintura de Calêndula é usada para curar o trauma causado por ferimentos da cavidade bucal (DORCSI, 1982) , bem como no tratamento de hemorragia nas gengivas (DUKE, 1985). É particularmente útil para crianças cujo aparelhos de correção dentária irritam as gengivas ou a boca, ou para pessoas idosas cujas dentaduras não se encaixam bem (DORCSI, 1982)

GINECOLOGIA

A literatura tem citado o emprego da calêndula como regularizadora do ciclo menstrual, para o tratamento de verrugas e câncer de pele (CUBAS, 1990).

Combate o atraso menstrual (KEVILLE, 1995), em geral é um normalizador do processo menstrual (KEVILLE, 1995; TESKE e TRENTINE, 1995; RAUL, 1994)

CULINÁRIA

Na culinária, as pétalas da calêndula fornecem um corante substituto para dar cor às sopas, carnes cozidas e molhos. Poucas pétalas, tiradas da cabeça principal da flor, dão cor e gosto à saladas. As folhas também são usadas em saladas, mas elas são picantes (KEVILLE, 1995; DUKE, 1985).

USO INTERNO

A calendina (substância amarga) ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que possui ação colagoga, favorecendo a produção da bile (TESKE E TRENTINE, 1995)

Internamente age como uma valiosa erva para inflamação digestiva ou úlceras. Deste modo pode ser usado no tratamento de úlceras gástricas e do duodeno. Auxilia nos problemas de escoriações da vesícula e também através desse processo ajudará em muitos dos problemas digestivos, que são chamados de indigestão (HOFFMAN, 1996)

A Calêndula apresenta efeito emenagogo (TESKE E TRENTINE, 1995; DUKE, 1985; DORCSI, 1982) analgésica, antihelmíntica, adstringente, carminativa, depurativa, diurética, embólica, febrífuga, laxativa, estimulante, tônica, antialérgica, suavizante, anti-séptica e antifúngica. (TESKE e TRENTINE, 1995)

3.5. ESTUDOS CIENTÍFICOS DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA *Calendula officinalis*

Um extrato fluído de *C. officinalis* indicou propriedades genotóxica quando ensaiado para a segregação mitótica no modelo D-30 diplóide heterozigoto de *Aspergillus nidulans*, exibiu toxicidade e genotoxicidade dose-dependente (ambos crossing over mitóticos e malsegregação cromossômica observada) para *Aspergillus* na escala de cinco concentrações de 0,1 a 1,0 mg de sólidos/ml esnsaiados. O teste

de mutagenicidade com microssomas de *Salmonella* em cepas TA 1535, TA 1537, TA 98 e TA 100 foi negativa em um protocolo de incorporação de placa com as concentrações de 500 a 5000 µg/placa (+/- S9). A medula óssea de rato, onde o extrato foi administrado oralmente acima de 1 g/Kg por 2 dias, também foi negativo (RAMOS, 1998).

A separação e isolamento de ésteres de faradiol das flores desta planta mostrou em testes farmacológicos atividade antiedematogênica no teste de edema induzido em orelha de rato. Ambos os ésteres do faradiol mostraram quase a mesma atividade antiedematogênica dose-dependente e nenhum efeito sinérgico significativo apareceu com a mistura (ZITTER-EGLESEER, 1997).

Extratos de flores secas de *C. officinalis* foram examinados pela inibição da replicação do vírus HIV-1. Ambos extratos, orgânicos e aquoso, foram relativamente não tóxicos para linfócitos humanos (células Molt-4), mas apenas o orgânico exibiu potente atividade anti-HIV em um ensaio *in vitro* do tipo MTT/tetrazolium. Em adição, na presença do extrato orgânico (500 µg/ml), as células MOLT-4 não afetadas, foram completamente protegidas acima de 24 h de uma infusão e subsequente morte, causada por cocultivação com infecção persistente de células U-937/HIV-1. Foi também encontrado que o extrato orgânico de flores de *C. officinalis* causou um significativo resposta dose e tempo dependente na redução da transcrição de HIV-1 reversa. Um total de 85% de inibição foi encontrada depois de 30 minutos de tratamento com a enzima purificada em um sistema de célula livre. Estes resultados sugerem que o extrato orgânico das flores desta planta possui uma interessante atividade anti-HIV (KAVALTCHEV, 1997)

Através de um bioensaio orientado do extrato de CO₂ das flores desta planta, detectou-se a presença de triterpenóides que possuem efeitos antiinflamatórios. O principal é o monoéster de faradiol, presente em maior quantidade. O faradiol não esterificado, não presente no extrato, é o mais ativo dos compostos testados com atividade igual a da indometacina, onde como lupeol, taraxasterol e beta-amirina são menos ativos que o diol livre (DELLA LOGGIA, 1994).

A análise clínica e histológica do tratamento tópico do creme de calêndula comparativo à associação do creme de calêndula com confrei, própolis e mel, em feridas cutâneas infectadas de ratos, demonstrou que o creme de calêndula, utilizado isoladamente, foi mais eficaz do que a associação, pois promoveu uma reparação mais eficiente à pele lesionada. (CARVALHO, 1991).

Treze saponinas foram isoladas e identificadas de *C. officinalis*, *C. arvensis* e *Hedera helix*. Foram investigadas as atividades antimutagênicas através do teste microsomal de Salmonella usando uma técnica modificada de incubação líquida. Foram ainda usadas cepas TA98+/-S9. Todas as saponinas apresentaram um efeito não tóxico e não mutagênico para doses de 400µg (ELIAS, 1990).

Ferimentos cirurgicamente padronizados na pele de ratos albinos Wistar foram cobertos com um unguento a 5% contendo frações de C₁ e C₂ isolado das flores de *C. officinalis* em combinação com a alantoína. A combinação estimula marcadamente a regeneração e epitelização fisiológica. Este efeito é devido ao metabolismo intenso das glicoproteínas, nucleoproteínas e proteínas colágenas durante o período regenerativo nos tecidos (KLOUSCHEV-POPOVA, 1982).

Em experimentos onde foram induzidas inflamações com injeção de carragenina e prostaglandina E1, o extrato liofilizado desta planta apresentou efeito supressor da infiltração leucocitária e a inflamação (SHIPOCHLIEV, 1981).

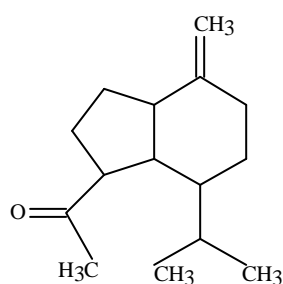
Calendulosídeo-B, um triosídeo do ácido oleanólico, dos rizomas de *C. officinalis*, usado em doses de 5, 10, 20 e 50 mg/Kg exerceu uma ação antiúlcera em 3 modelos de úlcera experimental (caféina-arsênico, butadiona e induzida por ligação do piloro) e também mostrou uma certa ação sedativa e antiflogística. Não houve nenhum efeito no sistema cardiovascular, tono dos músculos intestinais, função diurética renal e excreção de eletrólitos e com as funções bilirrubinogências do fígado. O componente apresenta irritações localizadas, manifesta uma baixa atividade hemolítica e uma significativa toxicidade ambos com administração crônica e administração única (IATSYNO, 1978).

3.6. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *Calendula officinalis*

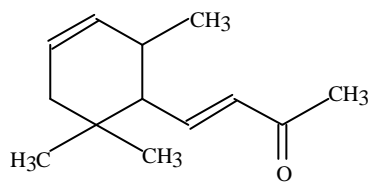
Os princípios ativos extraídos de plantas medicinais tem demonstrado que o teor destes pode variar em função da temperatura, duração da extração e o tipo de solvente (TEGLIA, 1989), além da influência dos fatores ambientais como clima, solo, época de

coleta, estágio de crescimento da planta, que podem influenciar na composição química de plantas (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

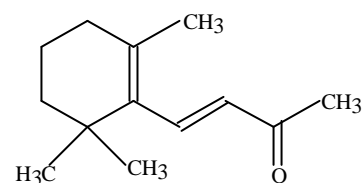
Através de reações químicas de identificação e análises cromatográficas e espectrométricas, foram encontrados diversos grupos de compostos nas flores de *C. officinalis* L.. As flores contém princípio amargo calendulina e calendina, carotenóides (β -caroteno, crisantemoxantina, licopina, flavocromo, mutacromo, violaxantina, rubixantina, neolicocina, citroxantina)(ANDREEVA, 1961); esteróides (fucostanol); sesquiterpenóides (calendrina, liloilido); triterpenoides (heliantrol C, usadiol, 12-ursen-3,16,21-triol)(WILKOMIRSKI, 1985); óleo essencial (pedunculatine; α -e- β -ionona; transcaryophyllo epoxide; carvona; geranylacetona; β -ionona-5,6-epoxide; dihydroactinidiolide; oplopanona; caryophyllo-cetona; dois cadinois (GRACZA, 1987); flavonóides; resinas; mucilago; ésteres de ácidos orgânicos (láurico, málico, mirístico, palmítico, esteárico, etérico)(KASPRZYK, 1970); e ácido pentadecílico e salicílico (KUBO, 1994); glicosídeo triterpênico (calendulosídeos A, B, C, D, G, e H) (WOJCIECHOWSKI, 1971; CUBAS, 1990); álcoois, e triterpenos (campesterol, α e β -amirina, arnidiol, calenduladiol, faradiol, β -sitosterol, stigmasterol, taraxasterol, ursadiol) (KASPRZYK, 1970); saponinas (A, B, C, D, E) (VIDAL OLLIVIER, 1989), taninos (OCIOSZYNSKA, 1977) e os terpenos clofodiol e maniladiol (CUBAS, 1990)



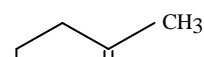
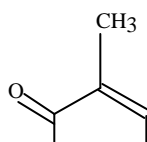
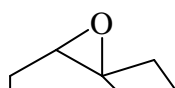
(pedunculatina)



(alfa-ionona)



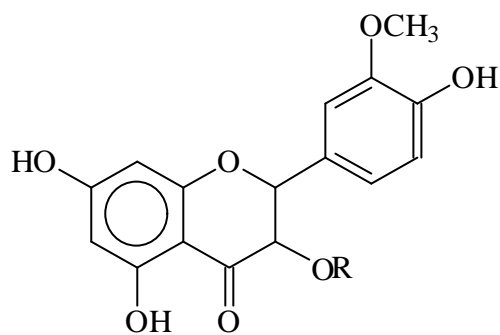
(beta-ionona)



GRUPO DOS FLAVONÓIDES:

Segundo MASTEROVÁ et al. apud BEZAKOVA (1996), os flavonóides glicosídicos são os principais constituintes com efeito antiinflamatório da *C. officinalis*.

Isorhamnetina, isoquercitrina e quercitina são flavonóides já isolados da *C. officinalis* (KOMISSARENKO, 1988), além de glicosídeos flavônicos derivados de isorhamnetina, como por exemplo: isorhamnetina neoheperidosídeo, quercitina neoheperidosídeo, rutina 2^G-rhamnosilrutinosídeo (VIDAL-OLIVIER, 1989), isorhamnetina-3-O-rutino-rhamnosídeo (TEGLIA, 1989), embora os maiores glicosídeos sejam **CAL 1**, **CAL 2** e **CAL 3** (BEZAKOVA, 1996).

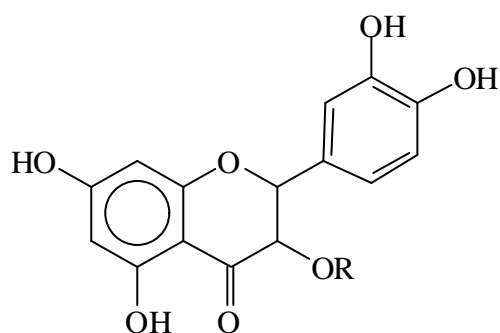


R = H (Isorhamnetin)

R = Glc: Isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside (**CAL 1**)

R = Rha-Glc: Isorhamnetin -3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside (**CAL 2**)

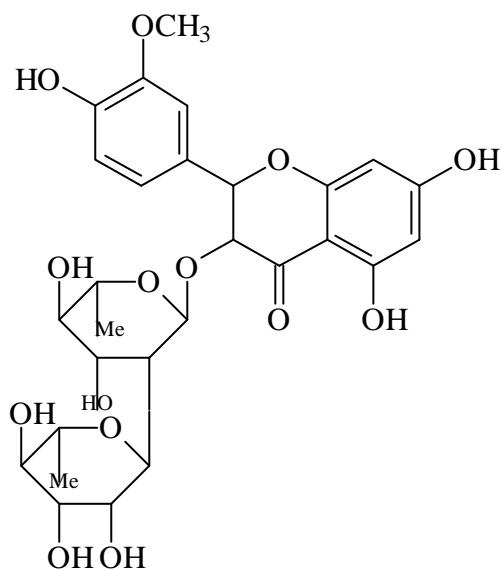
R = Rha-Rha-Glc: Isorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose (**CAL 3**)



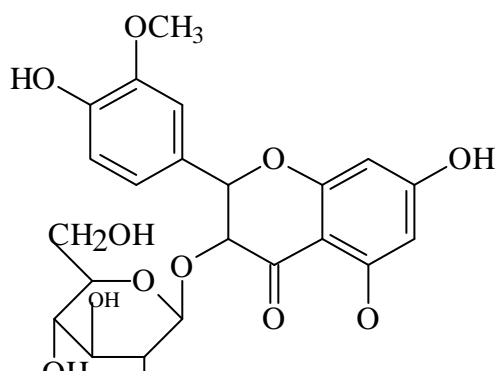
R = H
(QUERCITINA)

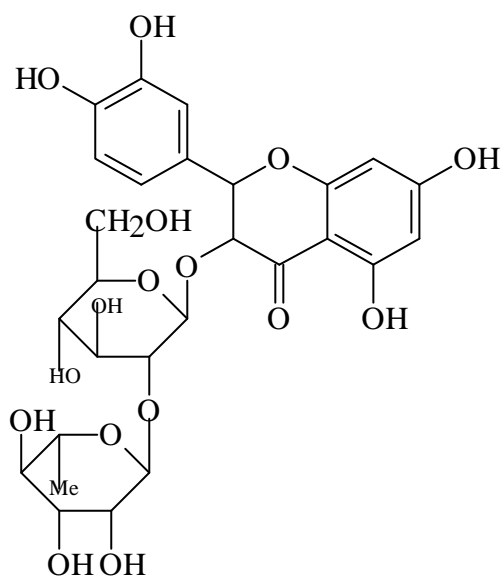
Também foram encontrados dois triglicósidos derivados da isorhamnetina nas flores de *C. officinalis* sendo: isorhamnetina 3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranosídeo e isorhamnetina-3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopiranosídeo (narcissina) (MASTEROVÁ, 1991)

Derivados flavônicos como calendoflasídeo, calendoflavosídeo e calendoflavobiosídeo também foram isolados (KOMISSARENKO, 1988).



(CALENDOFLASÍDEO)



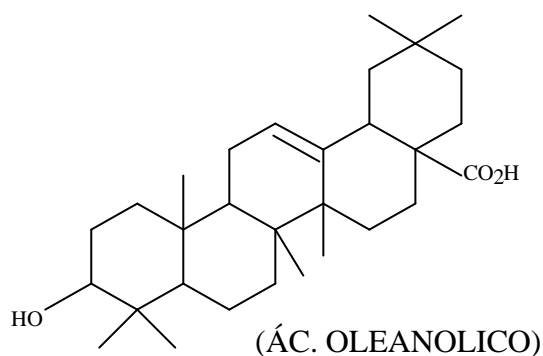


(CALENDOFLAVOBIOSÍDEO)

GRUPO DAS SAPONINAS

VIDAL-OLIVIER (1989) descreve diversas saponinas isoladas das flores de *C. officinalis*, como: calendulosídeo F (nas raízes), saponosídeos A, B, C, D, E identificados por HPLC. Em 1990, VIDAL-OLLIVIER cita que o ácido oleanóico 3-O-beta-D-glucoronídeo é a unidade básica dos saponosídeos.

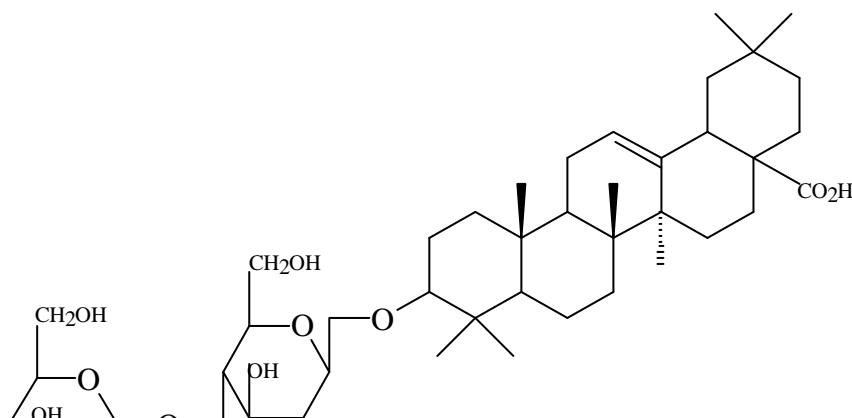
O ácido oleanóico também foi encontrado na forma livre em todas as partes da planta, principalmente nas folhas maduras e durante a floração (a partir daí é transportado para a parte subterrânea da planta). Concluiu-se que a produção deste ácido se dá em todo o crescimento da planta, inclusive submetendo os brotos a diferentes intensidades de luminosidade (CUBAS, 1990).

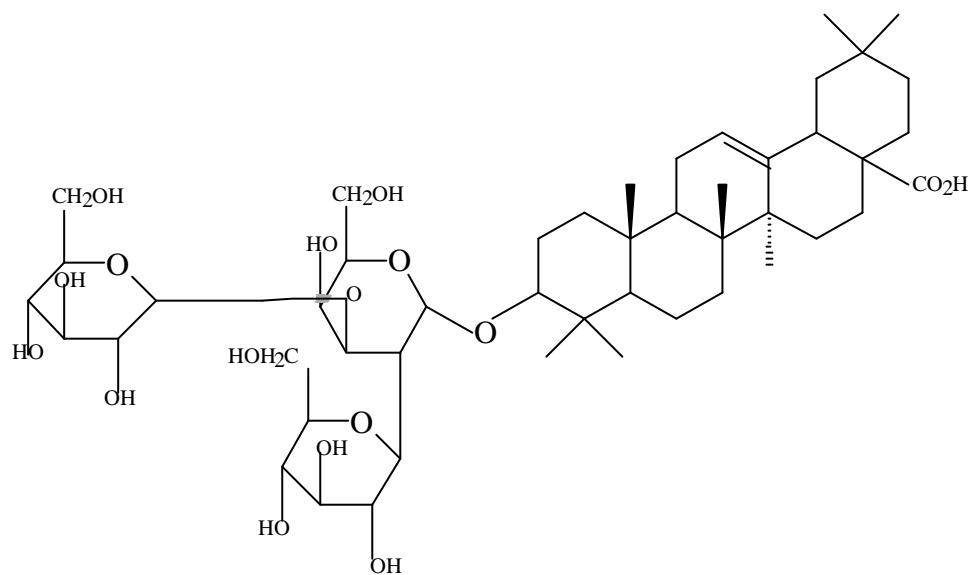


GRUPO DOS TRITERPENOS

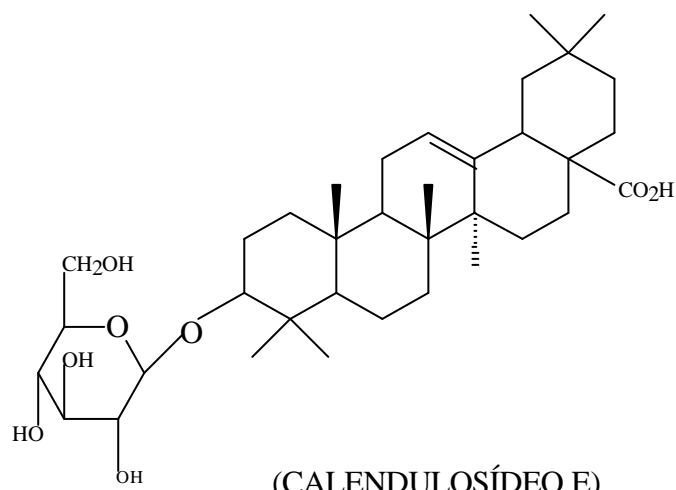
Substâncias próximas às saponinas, os triterpenos são encontrados nos brotos, folhas jovens e botões florais (CUBAS, 1990), sendo importantes princípios antiinflamatórios da *C. officinalis* (DELLA LOGGIA, 1994).

Nas folhas e raízes foram encontrados glicosídeos triterpênicos, chamados calendulosídeo A, C, E, G, H (CUBAS, 1990).





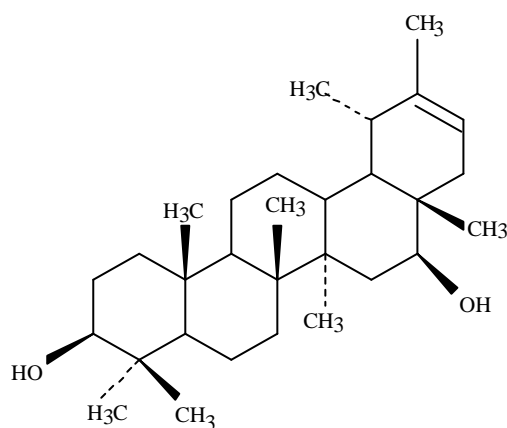
(CALENDULOSÍDEO C)



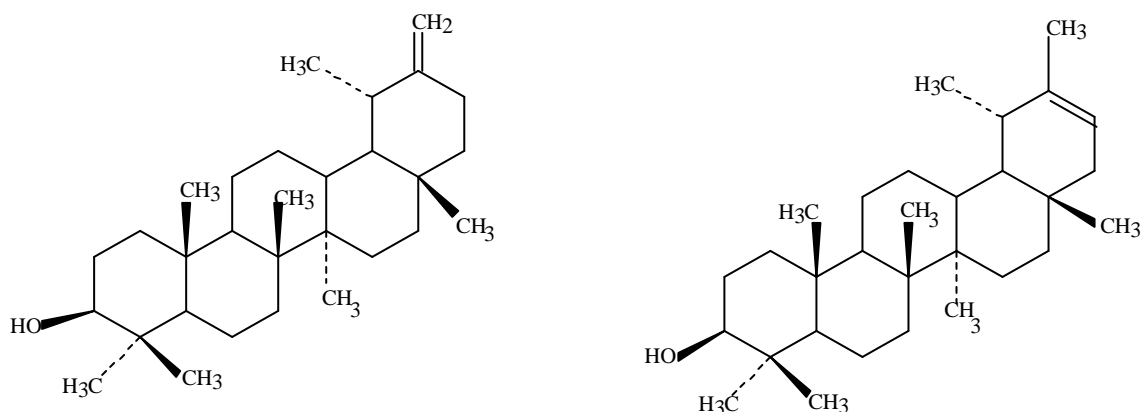
(CALENDULOSÍDEO E)

As sementes germinadas possuem a capacidade de sintetizar compostos triterpênicos com estruturas do tipo oleano, ursano e lupano, além do próprio ácido oleanóico que é transportado das sementes para as raízes da calêndula (CUBAS, 1990).

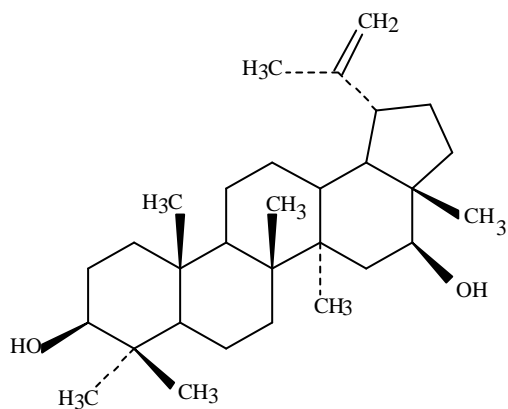
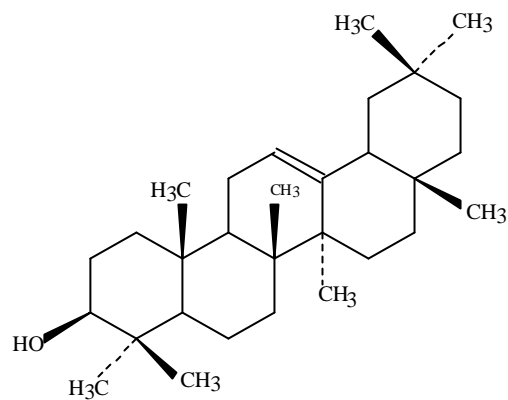
Encontra-se ainda em grande quantidade o faradiol, taraxasterol, Ψ -taraxasterol, calenduladiol, β -amyrin, α -amyrin, arnidiol e lupeol sendo estes menos ativos que o diol livre (DELLA LOGGIA, 1994), faradiol mirístico ester e faradiol palmitico ester (ZITTERL-EGLESEER, 1997)



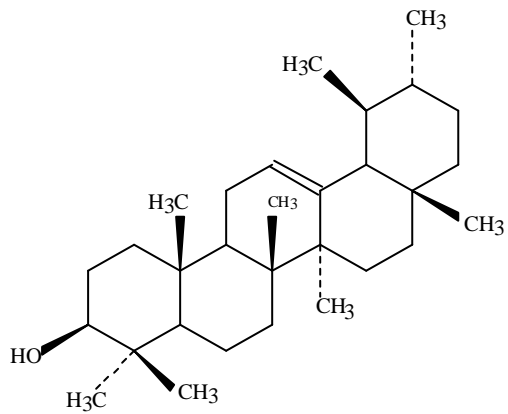
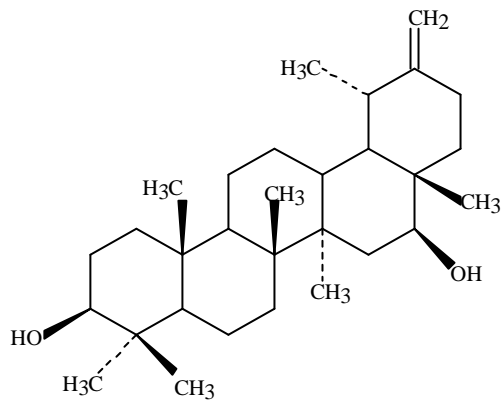
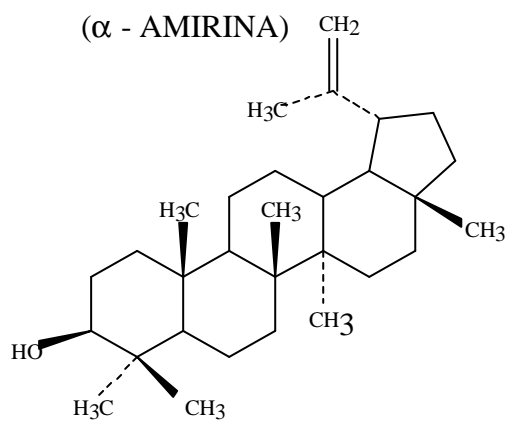
(FARADIOL)



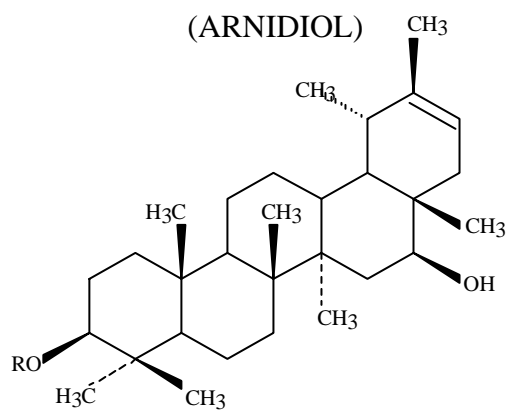
(TARAXASTEROL)

(Ψ - TARAXASTEROL)

(CALENDULADIOL)

(β - AMIRINA)(α - AMIRINA)

(ARNIDIOL)



(LUPEOL)

R = myristyl - faradiol myristico ester
R = palmityl - faradiol palmitico ester

Os terpenos clofodiol e maniladiol também foram isolados e tiveram suas estruturas determinadas. (CUBAS, 1990)

PRINCÍPIO AMARGO

Foi isolado o princípio amargo calendina ($C_{23}H_{38}O_7$) (TESKE e TRENTINI, 1995; WILKOMIRSKI, 1985), encontrado nas folhas num teor de 0,5% de planta fresca (GEDEON, 1954).

Há relatos da presença de ácidos graxos livres (láurico, esteárico, palmitoleico, oleico e linoleico) e triacilglicerol nas sementes formado a partir do ácido linoleico. Além dos ácidos graxos, vários ácidos fenólicos também foram detectados como o p-hidroxibenzóico, p-cumarínico, gentísico, varrílico e cafeico (CUBAS, 1990)

4. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

A Hiperplasia Benigna de Próstata (HBP) é uma patologia que ocorre em aproximadamente 50% dos homens a partir de 50 anos, e em 90% depois dos 80 anos

(MARANDOLA, 1997). A HBP é considerada uma neoplasia benigna que se caracteriza por um alargamento progressivo das estruturas fibromuscular e epitelial dentro da glândula prostática. Em geral, é aceito que existem dois componentes que contribuem com a sintomatologia da patologia: um componente estático, relacionado ao tamanho da massa de tecido prostático (hiperplasia), e um componente dinâmico relacionado com o tônus da musculatura lisa prostática (sintomas urológicos). Segundo alguns pesquisadores, diferentes fatores poderiam concorrer para sua instalação, dentre os quais podemos citar: alteração no metabolismo de hormônios sexuais com o avanço da idade, interação entre estroma e células epiteliais, medidores de processos inflamatórios, fatores de crescimento tecidual, desvios metabólicos na síntese de colesterol, regulação do tônus muscular. Neste conjunto de fatores, aparentemente o metabolismo de hormônios androgênicos tem papel primordial (STEERS, 1995).

A abordagem clássica para o tratamento do componente estático da HBP está associada à hipótese de que o desenvolvimento desta hiperplasia envolve a testosterona, o principal hormônio androgênico circulante, que é metabolizado até dihidrotestosterona (DHT) na glândula prostática pela 5- α -redutase. Duas isoformas desta enzima já foram identificadas e clonadas, a 5- α -redutase 1 (5 α -R1) e a 5 α -redutase 2 (5 α -R2), sendo a principal isoforma humana prostática tem sido caracterizada como a 5 α -R2. A 5 α -R1 tem um padrão de distribuição diferente, sendo mais predominantemente no fígado e na pele, onde a DHT teria ação estimulante sobre as glândulas sebáceas. Já na próstata, a DHT pode ligar-se aos receptores androgênicos das células ao nível da estrutura epitelial e estroma, promovendo a síntese de RNA mensageiro, e conseqüentemente, a síntese protéica e a proliferação celular (THOMAS, 1994). Com base neste conhecimento, foi sintetizado um inibidor específico da 5 α -redutase, a finasterida,

recentemente comercializado com o nome de Proscar®, o qual possui efeito benéfico sobre a proliferação celular e sintomatologia urológica da HBP, mas que apresenta efeitos adversos principalmente sobre a função sexual (KENNEY, 1997).

Uma estratégia alternativa para o tratamento da BHP adotada por vários países europeus inclui a fitoterapia, conduta terapêutica que tem sido eleita por mais de 45% dos casos leves a moderados da doença. Esta escolha deve-se à considerável eficiência dos fitofármacos, principalmente no que se refere à melhoria da sintomatologia urológica e prostática, associada à baixa incidência de efeitos indesejáveis. Dentre os extratos de plantas comumente utilizados, podemos citar os da *U. radiz*, *P. africanum*, *C. pepo* e *S. repens*. Esta última, é a planta mais utilizada no tratamento da BHP, tendo sido recentemente comercializada no Brasil com o nome de Permixon®. Os extratos destas plantas contém princípios ativos como fitoesteróis (particularmente β -sitosterol), triterpenos, álcoois graxos de cadeia longa, ácidos graxos livres e esterificados, flavonóides, carotenóides, lectinas e ligninas. Vários trabalhos tem demonstrado que estes compostos tem atividade antiandrogênica e antiestrogênica, atividade inibitória na síntese de prostaglandinas e leucotrienos (cicloxigenase e lipoxigenase), modificação na síntese de fatores de crescimento (particularmente EGF), inibição das atividades das enzimas 5α -redutase, citocromo P450 aromatase, citocromo P450_{sc}, óxido nítrico sintase, Na⁺/K⁺ ATPase, além de redutores de colesterol e ação sobre espécies reativas de oxigênio (MARANDOLA, 1997; BOMBARDELLI, 1997).

Por outro lado, a acne, uma desordem folicular da pele que ocorre nas unidades pilosebáceas especializadas da face e pescoço, está diretamente associada às alterações hormonais da adolescência. Esta anomalia no epitélio queratinizado deve-se à ação do produto sintetizado e secretado por glândulas sebáceas sensíveis aos efeitos de

hormônios androgênicos, com posterior inflamação induzida por bactérias foliculares, particularmente a *Propionibacterium acnes*. O tratamento da acne geralmente envolve drogas que tenham efeito antibacteriano, antiqueratinizante e ação antiseborréica (KUBO, 1994). Com respeito a esta última ação, as drogas mais efetivas são aquelas que atuam na regulação de andrógenos ativos sobre as glândulas sebáceas, como, por exemplo, compostos inibidores da isoforma R1 da enzima 5α -redutase que é responsável pela síntese periférica da dehidrotestosterona (DHT), hormônio com ação sobre a secreção sebácea. Trabalhos recentes têm demonstrado que fármacos como a finasterida e o extrato lipoesterólico da *Serenoa repens*, são capazes de atuar sobre esta enzima possuindo efeito benéfico no tratamento da acne. Entretanto, como já foi mencionado anteriormente, a conversão excessiva de testosterona a DHT pela 5α -redutase tem sido proposto como o principal mecanismo molecular responsável pelo desenvolvimento da HBP.

As flores de *Calendula officinalis* vem sendo utilizada para o tratamento de distúrbios dérmicos desde a idade média (KLOUSCHEK-POPOVA, 1982). Atualmente, uma boa parte das preparações de produtos cosméticos e dermatológicos para o tratamento da acne apresentam como componente ativo extratos das flores de *C. officinalis*.

A composição química da *C. officinalis* nos leva a considerar que a mesma seria de grande importância no tratamento da HBP, uma vez que já foi demonstrado que o β -sitosterol, presente nesta planta, pode competir com substâncias endógenas envolvidas no metabolismo de compostos androgênicos (BOMBARDELLI, 1997), além de inibir a síntese de prostaglandinas no tecido prostático (GOMES, 1987). Entre vários outros compostos presentes na *C. officinalis*, encontramos inúmeros triterpenos, em especial o

faradiol, o qual apresenta um potente efeito anti-inflamatório tanto tópico (DELLA LOGGIA, 1994) como sistêmico (TOSHIHIRO, 1996). A ação hipolipemiante do β -sitosterol e triterpenos foi comprovada por diversos trabalhos (VALISENKO, 1982; MIRONIVA, 1982). O efeito antiedematogênico do faradiol e outros compostos da *C. officinalis* foram recentemente comprovados (ZITTER-EGLESEER, 1997), assim como a ação inibitória sobre a lipoxigenase de alguns de seus glicosídeos (BEZAKOVA, 1996). Alguns triterpenos, como o taraxastano, apresenta efeito antitumoral (YASUKAWA, 1996). O ácido oleanólico e alguns flavonóides como quercetina e epigenina, presentes na *C. officinalis*, possuem efeito inibitório sobre a síntese de estrógenos (GANBER, 1995). Finalizando, possui efeito benéfico sobre a acne que, em parte, poderia ser explicado por um mecanismo de inibição da 5α -redutase.

5. PARTE EXPERIMENTAL

A metodologia adotada nesta pesquisa está baseada em técnicas específicas para a separação de produtos naturais, como por exemplo: a extração de compostos ou grupos de compostos químicos obtidos e sua purificação ou recristalização através de vários processos cromatográficos. (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

A identificação dos compostos isolados foram realizados através de métodos físico-químicos de análise: Ponto de Fusão, Espectroscopia de Massa, Ultra-Violeta, Infra-Vermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , além de outros.

5. 1. MATERIAL E MÉTODOS

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Para a avaliação preliminar do grau de pureza dos compostos isolados foi empregada cromatografia em camada delgada em placas de vidro com 2,5x7,5 cm, revestidas com sílica gel GF₂₅₄ (Merck) para monitoramento das frações obtidas dos extratos brutos. Os compostos foram aplicados em pontos equidistantes de 0,5 cm e a 1,0 cm da extremidade inferior da placa cromatográfica. Para compostos com alto grau de pureza utilizou-se placas cromatográficas de alta resolução (HRTLC) de sílica gel PF₂₅₄, em folhas de alumínio (Merck).

Para as colunas cromatográficas utilizou-se sílica-gel 60, com granulação 70-230 Mesh (0,063-0,2mm) para o fracionamento do extrato bruto. Nas colunas de purificação utilizou-se sílica-gel 35-70 mesh (0,2-0,5mm).

As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram reveladas sob radiação UV usando MINERLIGHT 254 e 365mm. Também foram empregados reagentes específicos para a revelação dos cromatogramas. A revelação dos cromatogramas foi realizado por aspersão, a uma distância de 15-20 cm, com o

revelador anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento em chapa quente por 10 minutos a 120°C ou com cloreto férrico sem aquecimento. Também foi utilizado a revelação em câmara de iodo (MARINI-BETTÓLO, 1981; UGAZ, 1994).

Os solventes utilizados na cromatografia em camada delgada para purificação dos compostos possuíam grau de pureza analítico de procedência Merck, Grupo Química ou Synth.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em aparelho de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução SHIMADZU-CG 14^A com detector de ionização de chama e registrador chromatopac SHIMADZU- C- R6E . As separações foram em coluna capilar de sílica fundida, 25 m de comprimento, 0,25 mm d. i. e revestida internamente com uma película de 0,25 µm da fase estacionária OV-01, utilizando-se H₂ como gás de arraste, nas condições cromatográficas indicadas em cada experimento.

As determinações dos pontos de fusão das substâncias puras isoladas foram realizadas com Aparelho de Ponto de Fusão APF-301 da marca Microquímica, e não sofreram correções.

Os espectros de absorção na região de Infra-vermelho foram obtidas em espectrofotômetro FT Perkin Elmer 16 PC, com as substâncias incorporadas em pastilhas comprimidas em brometo de potássio (KBr) anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetro recíprocos (cm⁻¹).

Foram obtidos espectros de massa a partir do espectrômetro de massa SHIMADZU – CGMS-QP-2000 A, sob impacto de feixe eletrônico a 70 eV por injeção direta.

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker AC-200F. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais $\delta(\text{ppm})$ em relação a um padrão interno de referência de tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados, todos deuterados, foram adquiridos comercialmente. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais são indicadas como segue: s=singlete; d=duplete; dd=duplodublete; t=tripleto e m=multiplote.

5.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A espécie *C. officinalis* L. foi coletada em setembro de 98, no município de Campo Largo – PR. A identificação do material Botânico foi realizado pela Prof. Dra. Rosemeri Moro, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde há uma excicata depositada no Herbário da UEPG, sob número 6483.

5.3. EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO

As flores e lígulas de *C. officinalis* foram secas em estufa a 40°C por 48 h. Foram moídas até um pó grosso, onde foi obtido 1,3 Kg de material, que foi mantido em maceração com metanol 70% durante 10 dias e posteriormente percolado. Após, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando cerca de 10 a 20% do volume inicial, obtendo-se assim o extrato alcoólico (metanólico) bruto.

5.4. SEPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO

Durante a concentração do extrato bruto, houve a formação de uma grande quantidade de precipitado de coloração marrom. Este precipitado foi separado por

filtração. O resíduo foi levado à secura através de jatos de ar quente e após, pulverizado em grau de porcelana. O filtrado foi particionado fazendo-se uso de solventes adequados.

5.5. FRACIONAMENTO DO PRECIPITADO

Depois de completamente seca, 4 g da fração precipitado foi cromatografada sobre uma coluna (70,0 x 3,0 cm) de silicagel 70-230 mesh (200,0 g), eluída com hexano gradualmente enriquecida com acetato de etila e metanol, coletando-se 45 frações de 75 ml.

Analizadas por CCD, as frações foram reunidas por similaridade de Rf, resultando em 8 conjuntos de frações, como representado na TABELA 1.

TABELA 1: Cromatografia em coluna da fração precipitado:

fração	denominação	peso (g)
2-3	PPT 1	0,232
4-10	PPT 2	-
11-18	PPT 3	-
19-24	PPT 4	-
25-30	PPT 5	-
31-35	PPT 6	-
35-38	PPT 7	-
39-45	PPT 8	0,585

A fração 1 foi recristalizada e identificada como PPT 1, posteriormente identificada como ácido palmítico, com rendimento de 232 mg. O PPT 8 foi purificado e recristalizado com metanol/água 50% em banho maria, resultando em cristais amarelo palha denominados PPT 8, posteriormente identificado como uma saponina derivada do ácido oleanólico, com rendimento de 0,5854g, cuja estrutura não foi totalmente elucidada.

5.6. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PPT 1 (ÁCIDO PALMÍTICO)

A caracterização da fr. 3 se deu por CCD comparativa com padrões, após a realização do espectro de IV. Através de IV - MS suspeitou-se tratar de um ácido graxo de cadeia longa com P. M. 256. A CCD com padrão de referência bem como CG-co-injeção vieram confirmar esta suspeita. Os dados foram confirmados por CG-padrão, EM(ID), PF.

5.7. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PPT 8 (SAPONINA)

O PPT 8 foi recristalizado após solubilização em acetona-metanol 1:1, aquecimento em banho-maria e filtração por papel filtro pregueado.

Foi preparado uma CCD sem eluição, e, quando revelado com anisaldeído sulfúrico apresentou mancha rosa, demonstrando indício de saponina triterpênica glicosilada.

5.8..HIDRÓLISE DA SAPONINA

Cerca de 50 mg do PPT 8 foram submetidas à hidrólise ácida de maneira convencional, onde evidenciou-se a formação do ácido oleanólico, glicose e outros açúcares.

5.9. OUTRAS FRAÇÕES

As outras frações obtidas da CC apresentaram-se em pequena quantidade e numa mistura de vários compostos, inviabilizando a separação e elucidação das mesmas pelos métodos convencionais disponíveis.

5.10. FILTRADO

O filtrado obtido na separação do extrato bruto foi armazenado em refrigerador a 5 °C. Posteriormente, foi deixado a temperatura ambiente, transferido para um funil de separação e particionado com solventes de polaridade crescente: Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e Butanol (fig. 3)

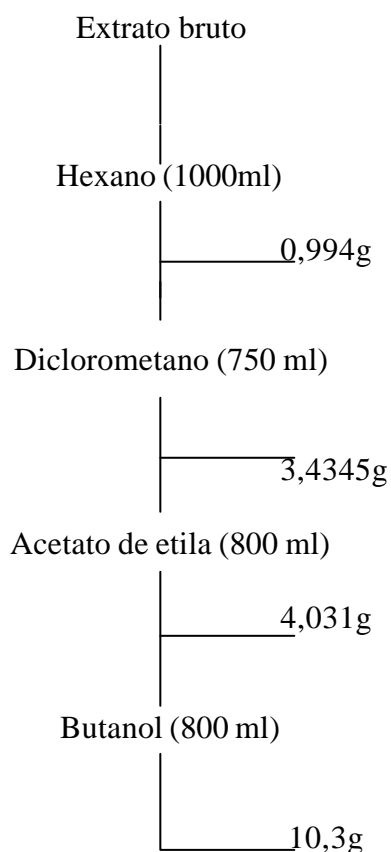


FIGURA 3 - Esquema representando a partição do filtrado.

5.11. FRAÇÃO HEXÂNICA

Foi utilizado 1 litro de solvente, divididos em 5 partições de 200ml. Esta partição caracterizou-se pela intensa emulsão formada durante a partição e pelo baixo rendimento, não somando mais que 994 mg.

5.12. FRAÇÃO DICLOROMETANO

Foi utilizado 750 ml de solvente, divididos em 3 extrações de 200 ml e 1 extração de 150 ml. Quando seco, o extrato apresentou um rendimento de 3,44 g.

5.13. FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Foram utilizados 800 ml de solvente, divididos em 4 extrações de 200 ml. O rendimento total foi de 4,03g.

5.14. FRAÇÃO BUTANÓLICA

Também foram utilizados 800 ml de solvente, divididos em 4 extrações de 200 ml. O rendimento total foi de 10,3 g.

Após concluídas as etapas da partição, as frações foram mantidas em dessecador de vidro com sílica e vácuo.

5.15. IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA E PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BUTANÓLICA

5.15.1. FRAÇÃO HEXÂNICA

A fração hexânica não foi cromatografada em coluna devido ao seu baixo rendimento. Foram identificados alguns compostos presentes nesta fração por CG-MS. Os compostos identificados são: ácido palmítico ($C_{16} H_{32} O_2$) e ácido octadecanóico ($C_{18} H_{36} O_2$).

5.15.2. FRAÇÃO BUTANÓLICA

Depois de completamente seca, 2 g da fração butanólica foram cromatografados sobre uma coluna (70,0 x 3,0 cm) de silicagel 70-230 mesh (200,0 g), eluída com diclorometano gradualmente enriquecida com metanol, coletando-se 42 frações de 75 ml.

Analisadas por CCD, as frações foram reunidas por similaridade de R_f , resultando em 7 frações, de acordo com a TABELA 2.

TABELA 2: Cromatografia em coluna da fração butanólica:

fração	denominação	peso (g)
0-8	BUT 0	-
9-10	BUT 1	0,034
11-14	BUT 2	-
15-20	BUT 3	-
21-25	BUT 4	0,023
26-30	BUT 5	-
31-39	BUT 6	-
40-42	BUT 7	-

A fração 21-25 foi purificada e recristalizada resultando em cristais amarelo claro denominado BUT 4, com rendimento de 23 mg. Posteriormente foi identificada como typhaneoside.

6. ENSAIO FARMACOLÓGICO

6.1. PREPARO DO EXTRATO PARA OS TESTES FARMACOLÓGICOS

As flores de *Calendula officinalis* foram coletadas e secas em estufa com circulação de ar a 40°C durante 48 horas. Posteriormente foram maceradas em etanol a 50% por um período de 10 dias, sendo o solvente concentrado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção do extrato hidroalcoólico bruto, o qual foi usado para os testes biológicos.

6.2. ANÁLISE FARMACOLÓGICA

6.2.1. ESTUDOS BIOLÓGICOS DA HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

6.2.1.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, sob a coordenação da Prof. Dra. Rozângela Curi Pedrosa.

6.2.1.2. MODELO EXPERIMENTAL:

Para o estudo dos possíveis efeitos da *C. officinalis* sobre o processo hiperplásico prostático, foi desenvolvido um modelo experimental para simular uma hiperplasia prostática em ratos. Este modelo parte do princípio que este distúrbio ocorre em células epiteliais e estromais prostáticas, a partir de um desequilíbrio que ocorre originalmente na concentração sanguínea de colesterol e com posterior repercussão nos níveis totais e prostáticos da testosterona, levando, conseqüentemente, a um aumento da síntese de dehidrotestosterona. Os ensaios biológicos foram realizados com ratos

machos púberes (n=7) submetidos à castração, e posteriormente pré-tratados durante 7 dias com 300µg de cipionato de testosterona/100g de rato (IM), para indução da hiperplasia prostática. Os animais foram divididos em 5 grupos e tratados 30 dias com:

- 1) controle I (ratos com **hiperplasia prostática**): 600µg de água destilada (VO) e 300µg de testosterona/Kg de peso (IM).
- 2) controle II (ratos **normais** não castrados): 600µg de água destilada (VO);
- 3) controle III: 2,4 mg de extrato lipoesterólico da *Serenoa repens* (**Permixon®**)/100g de rato (VO);
- 4) grupo tratado: 100 mg de **EH da C. officinalis**/ 100g de rato;
- 5) grupo tratado com **Finasterida** (0,3mg/Kg).

No tempo zero e 30 dias de tratamento foram coletadas amostras de sangue para determinação dos níveis plasmáticos de colesterol, testosterona, atividade da fosfatase ácida. Ao final do tratamento os animais foram sacrificados e o fígado, a próstata e a vesícula seminal foram retirados e pesados. Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela ANOVA, complementado por Turkey-Kramer, admitindo um nível de significância de $p < 0,05$.

6.2.1.3. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Os níveis de colesterol foram determinados no soro pelo método enzimático CHOD-PAP, conforme ALAIN, 1974).

A atividade da fosfatase ácida foi avaliada colorimetricamente segundo ROY, 1971.

A concentração plasmática da testosterona foi determinada pelo método de ELISA, utilizando testosterona conjugada com peroxidase como substrato competitivo (ABRAHAM, 1978).

6.2.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Avaliação da Atividade Antinociceptiva do extrato, frações e compostos puros obtidos de *C. officinalis*

6.2.2.1. ANIMAIS:

Foram utilizados camundongos “Suíços” machos e fêmeas pesando entre 25 a 40 gramas, aclimatizados a temperatura de 22 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 horas mantidos no biotério central da UNIVALI, tratados com ração e água *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Os experimentos foram realizados no Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticos (NIQFAR) da UNIVALI, pela equipe da Prof. Márcia Maria de Souza.

6.2.2.2. Testes de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Preliminarmente foi verificado o efeito do extrato hidroalcoólico da *C. officinalis* no teste das contorções abdominais, que permite avaliar a atividade analgésica de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico.

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (0,9%). Basicamente, as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com

extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (COLLIER, 1968; SANTOS, 1995). Grupos distintos de animais foram pré-tratados com extrato hidroalcoólico obtido das flores secas de *Calendula officinalis* (10-60 mg/Kg, i.p.), com as frações semipurificadas (10-60 mg/Kg, i.p.), ou com composto puro ác. Palmítico (10 mg/Kg, i.p.), 30 min. antes da injeção com ácido acético. Outros grupos de animais foram pré-tratados com aspirina (10-100 mg/Kg, i.p., controle positivo) ou com o veículo (10 ml/Kg, i.p.), utilizado para diluir o extrato, frações e os compostos, 30 min antes da injeção do irritante.

Após a injeção de ácido acético, os camundongos foram observados individualmente, colocados em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com aspirina e/ou com o extrato, frações e compostos obtidos da *Calendula officinalis*, comparando-se com o número das contorções abdominais dos animais controles (veículo).

6.2.2.3. Dor induzida pela formalina

Para a confirmação do efeito analgésico do EH, foi utilizado o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, um modelo mais específico que o teste de contorções abdominais, permitindo avaliar dois tipos de dor: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios).

O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (VAZ, 1996; SANTOS, 1995). Os animais receberam 20µl de formalina a 2,5% (0,92% de

formaldeído) ou salina na região intraplantar das patas posteriores direita e esquerda, respectivamente.

Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados, individualmente, dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após, foi quantificado, durante 30 min, o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse tempo cronometrado e considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Os animais foram pré-tratados com o extrato, frações ou compostos isolados da *Calendula officinalis* (10-60 mg/Kg, i.p.), aspirina (10-100 mg/Kg, i.p., controle positivo) e/ou com o veículo (10 ml/Kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina. Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores direita (injetada com formalina) e esquerda (injetada com salina) cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança analítica para a quantificação do edema induzido pela formalina.

6.2.2.4. Dor induzida pela capsaicina

Este modelo foi proposto recentemente por SAKAMURADA (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos envolvidos na

transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B). Assim, este teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos extratos ou do composto isolado da *C. officinalis* com o sistema taquicinérgico.

Cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20 minutos, que posteriormente, foi utilizado para observar a dor induzida pela capsaicina, cronometrando-se durante 5 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata. Cada animal recebeu 20µl de solução de capsaicina (1,6 µg/pata), injetada intraplantarmante na pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi considerado como indicativo de dor. Os animais foram tratados com o extrato hidroalcoólico e frações obtidos na flores de *Calendula officinalis* (10-60 mg/Kg, i.p.), 30 min antes da injeção da capsaicina. O grupo controle recebeu somente o veículo (10 ml/Kg, i.p.) utilizado para diluir o composto.

6.2.2.5. Drogas e soluções usadas

As seguintes drogas e soluções foram utilizadas: ácido acético, formalina, aspirina e capsaicina (Sigma Chemical Co., St Luis, MO, EUA). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica. Todas as drogas utilizadas foram dissolvidas em salina antes do seu uso, exceto os compostos e a aspirina, que foram dissolvidas em 0,5 % de Tween 80 em salina.

6.2.2.6. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50} (em alguns casos) (que corresponde as doses dos extratos e compostos que reduzirem a resposta para 50% em relação ao grupo controle), que são apresentados com as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ ou menos foram considerados como indicativo de significância. As DI_{50} foram estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica em papel semi-logarítmico.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

7.1.1. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO PPT 1

O composto **PPT 1** foi obtido das subfrações do extrato hidroalcoólico e das subfrações do precipitado formado durante o processo de evaporação do solvente.

As absorções na região espectral do infra-vermelho (fig. 4), característico de ácido graxo, onde são evidenciados as absorções do OH da carboxila em 3000cm^{-1} , e da banda de absorção da carbonila a cerca de 1700 cm^{-1} , além das bandas de CH_2 e CH_3 , nas regiões de 2900 , 1460 e 1370 cm^{-1} .

Os dados observados no Espectro de Massa (fig. 5), permite evidenciar que o referido composto tem peso molecular de 256, sugerindo tratar-se do Ácido Palmítico. Após Co-CCD e CoCG (fig. 6) com o ácido palmítico autêntico, pode-se concluir que são os mesmos compostos.

7.1.1. Identificação do PPT 1 por MS (Ácido Palmítico)

No Espéctro de Massas observamos o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) em 256 e a presença de fragmentos a m/z 228, 214, 200, 186, 172 que representa um espectro característico para ácidos de cadeia longa, devido às séries de aglomerados "hidrocarbônicos" a intervalos de 14 unidades (fig. 7). O pico base ocorre em m/z 60, com intensidade de 100% e deduz-se que é devido ao rearranjo de McLafferty. Outras quebras características para ácido carboxílico de cadeia longa está representado em m/z 73, que é resultante da quebra de cada ligação C-C, com retenção de carga pelo fragmento contendo oxigênio; em m/z 57 pelo mesmo tipo de quebra porém com

retenção pelo radical alquila e em m/z 55 como modelo hidrocarbono de fragmentação.

Todos os dados descritos estão de acordo com os dados da literatura (Silverstein, 1994).

O Ponto de fusão do PPT 1 é 62°C (Literatura - Aldrich = $61-64^{\circ}\text{C}$)

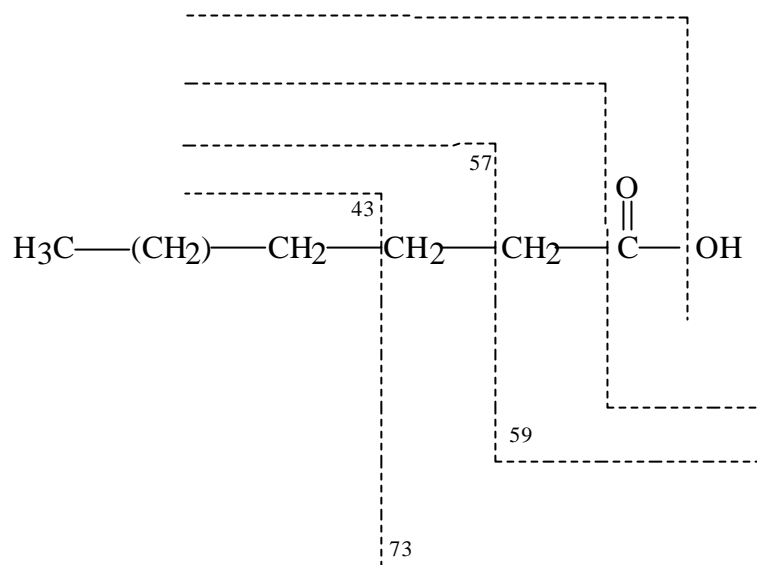


FIGURA 7 - Esquema da fragmentação típica de um ácido graxo

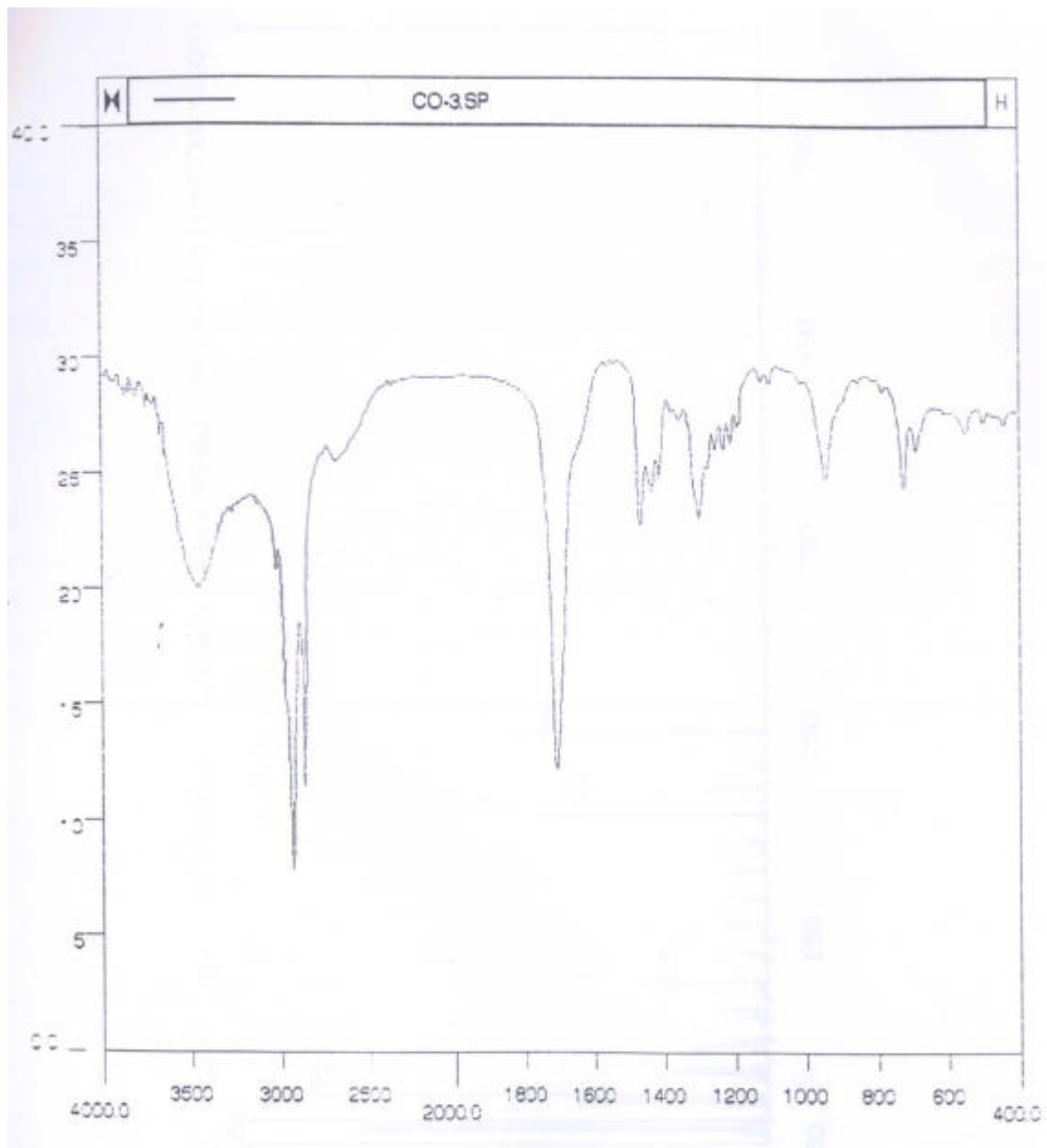
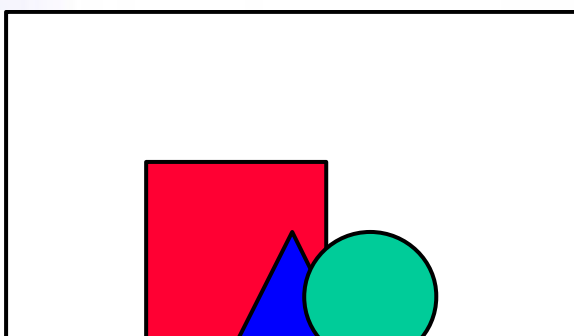
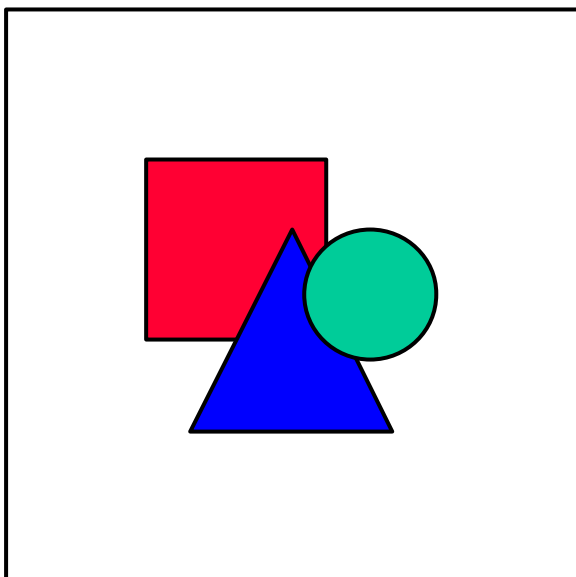


FIGURA 4 - Espectro no IV do composto PPT 1





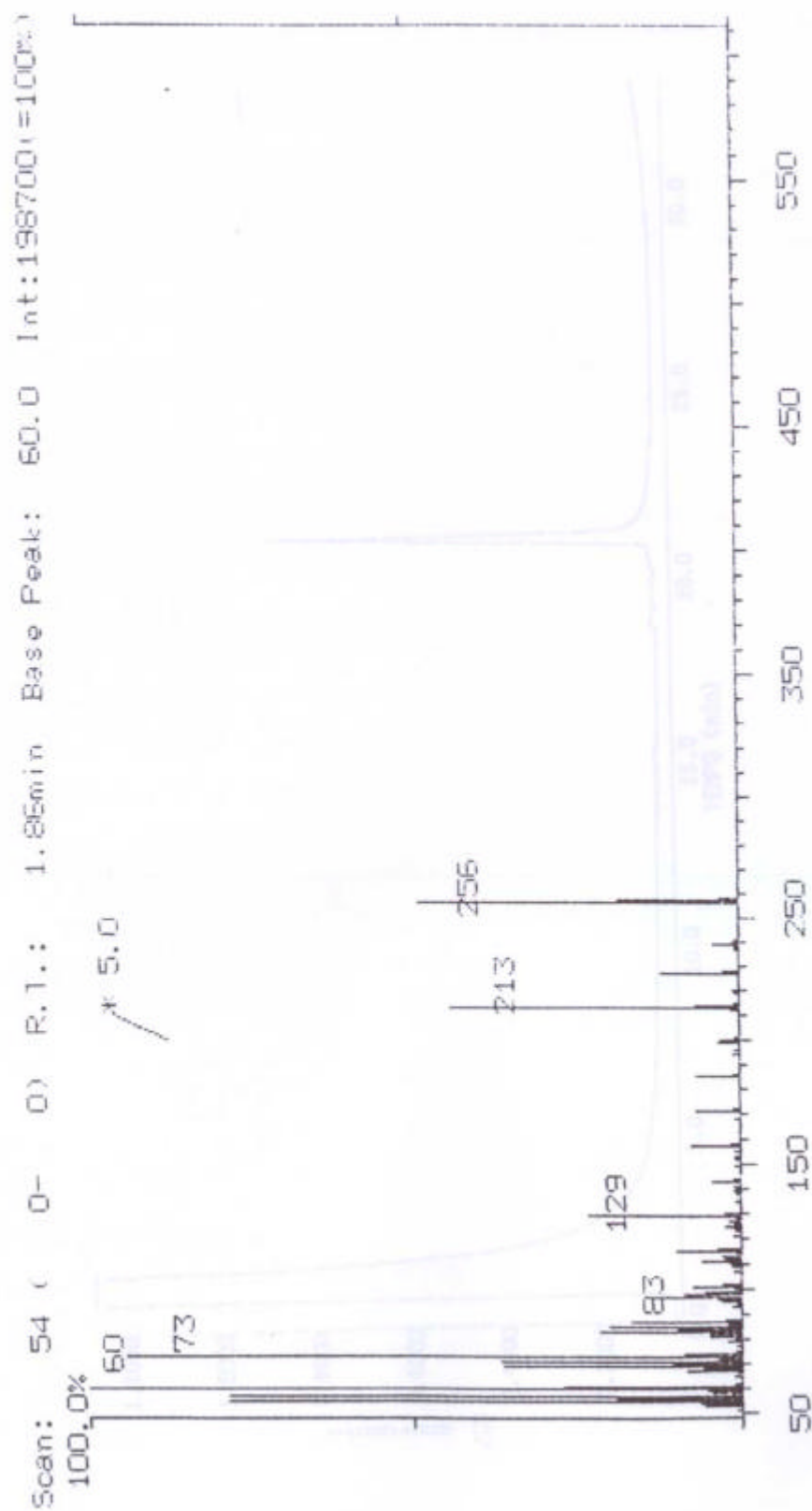


FIGURA 5 - Espectro de massas do PPT 1

O composto BHT-4 foi obtido a partir da fração de Rossmar, obtida por percolação em EtOH das flores de *C. officinalis*.

A) absorções na região espectral de Infravermelho características de ácidos, confirmado através de uma reação de campo com o reativo Fehling-Bertrando et al., 1981; Uggas, 1994). A banda larga na região de 3300 cm⁻¹ corresponde às hidroxilas aromáticas enquanto a banda estreita de 1700 cm⁻¹ é relativa à carbonila querada.

O espectro de RMN-¹H (Fig. 6) indica a presença de ácidos alifáticos relativos à formação glicosídica.

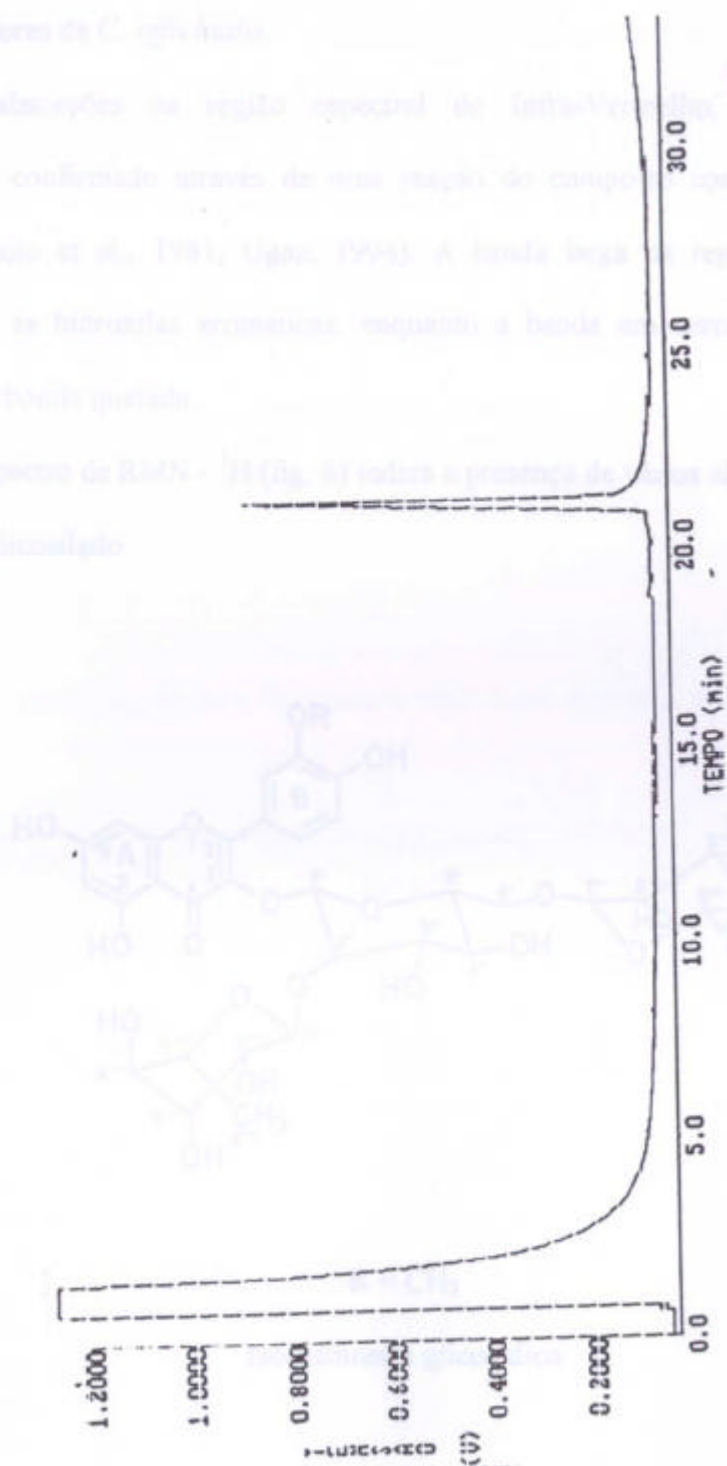


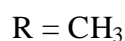
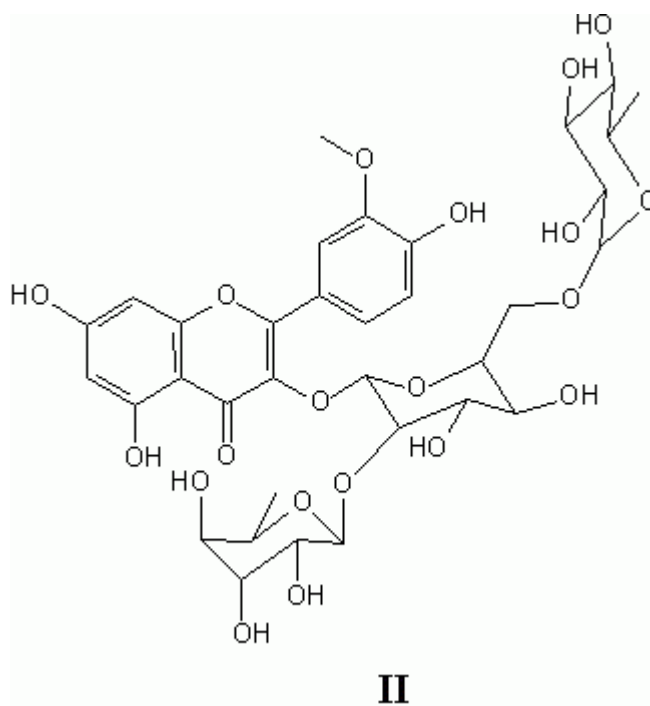
FIGURA 6 - Espectro da co-injeção do PPT e composto autêntico de ácido palmítico

7.1.2. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO BUT 4

O composto BUT 4 foi obtido a partir da fração de Butanol, obtida por partição do EH das flores de *C. officinalis*.

As absorções na região espectral de Infra-Vermelho, são características de flavonóides, confirmado através de uma reação do composto com o reativo FeCl_3 (MARINI-BETTÓLO, 1981; UGAZ, 1994). A banda larga na região de 3500 cm^{-1} corresponde às hidroxilas aromáticas, enquanto a banda em cerca de 1660 cm^{-1} é relativa à carbonila quelada.

O espectro de RMN - ^1H (fig. 8) indica a presença de vários sinais relativos a um flavonóide glicosilado.



Isorhamnetin glicosídico

Em 6,70 e 6,64 ppm, pode ser verificado a presença de 2 dupletos relativos aos prótons do anel A. Na região de 6,40 a 8,50 ppm são evidenciadas os outros prótons do anel B. Na região de 4 a 5,3 ppm são verificados os prótons dos açúcares (glicosídeos), enquanto que a metoxila aparece em 3,97 ppm. Os dupletos relativos às 2 metilas dos açúcares aparecem na região de 1,5 ppm.

O espectro de RMN - ^{13}C (fig. 9) confirma que o BUT 4 trata-se do composto Isorhamnetin - 3 - rutino - rhamnosídeo cujos sinais dos glicosídeos são similares aos da literatura (VIDAL-OLLIVIER ET, 1989) para este composto.

A tabela 3 mostra os dados de RMN - ^{13}C dos compostos em comparação com a literatura.

TABELA 3 - Dados de RMN - ^{13}C para o BUT 4 em comparação com os dados da literatura:

CARBONO	FL ₂ - LITERATURA	BUT 4
1'	100.69	100.49
2'	80.60	80.12
3'	77.61	77.24
4'	72.81	72.09
5'	79.27	78.86
6'	68.67	68.18
1''	102.48	102.40
2''	72.81	72.39
3''	72.81	72.31
4''	74.48	73.95
5''	70.24	69.91
6''	18.06	17.82
1'''	102.80	102.77
2'''	72.55	72.09
3'''	72.48	72.02
4'''	74.25	73.77
5'''	70.09	69.78
6'''	17.77	17.46

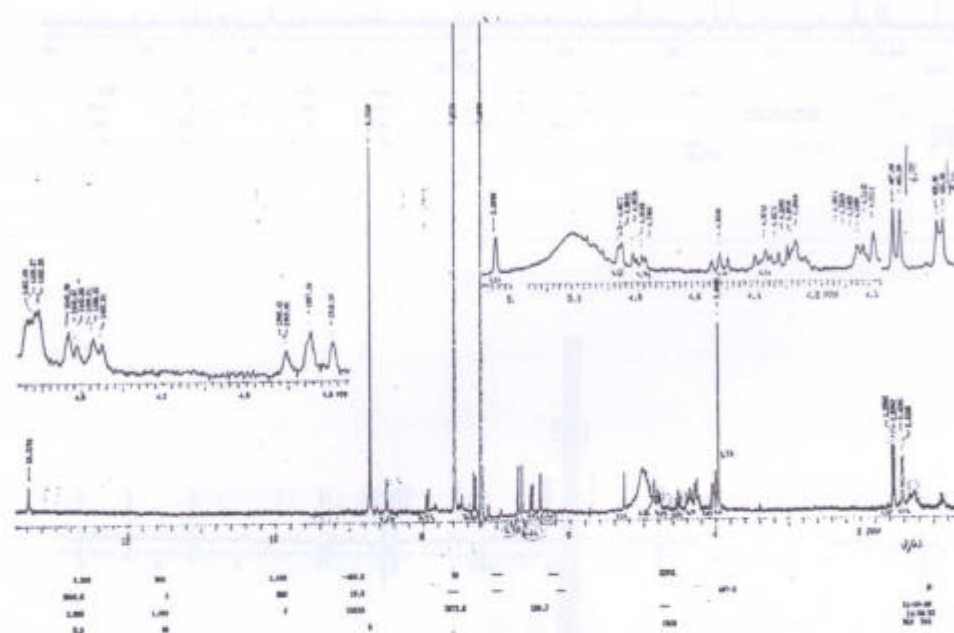
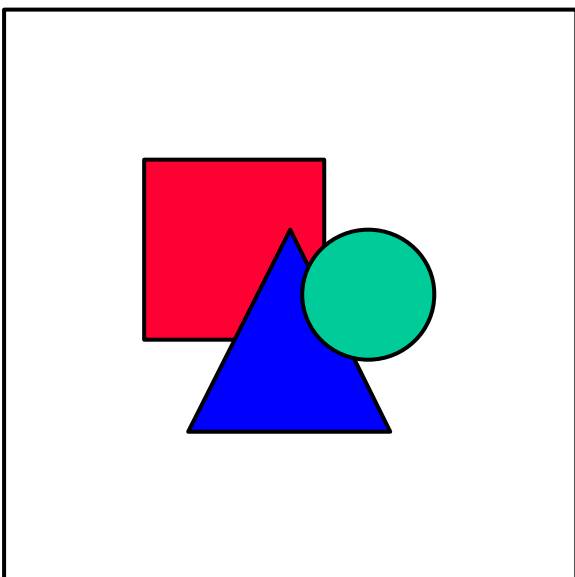
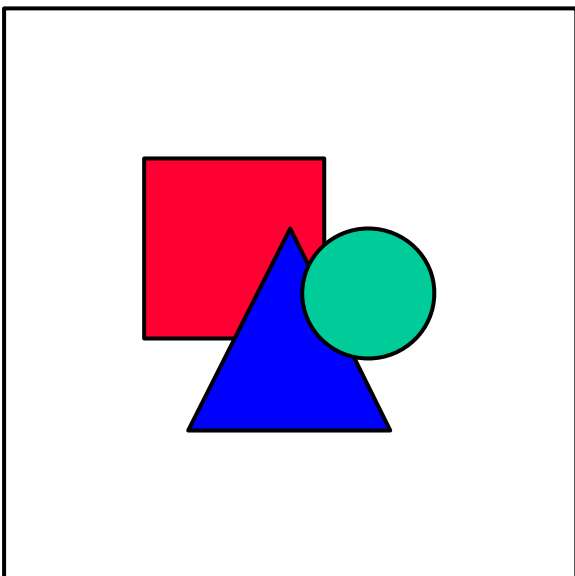


FIGURA 8 - Espectro de RMN de ^1H do composto BUT 4



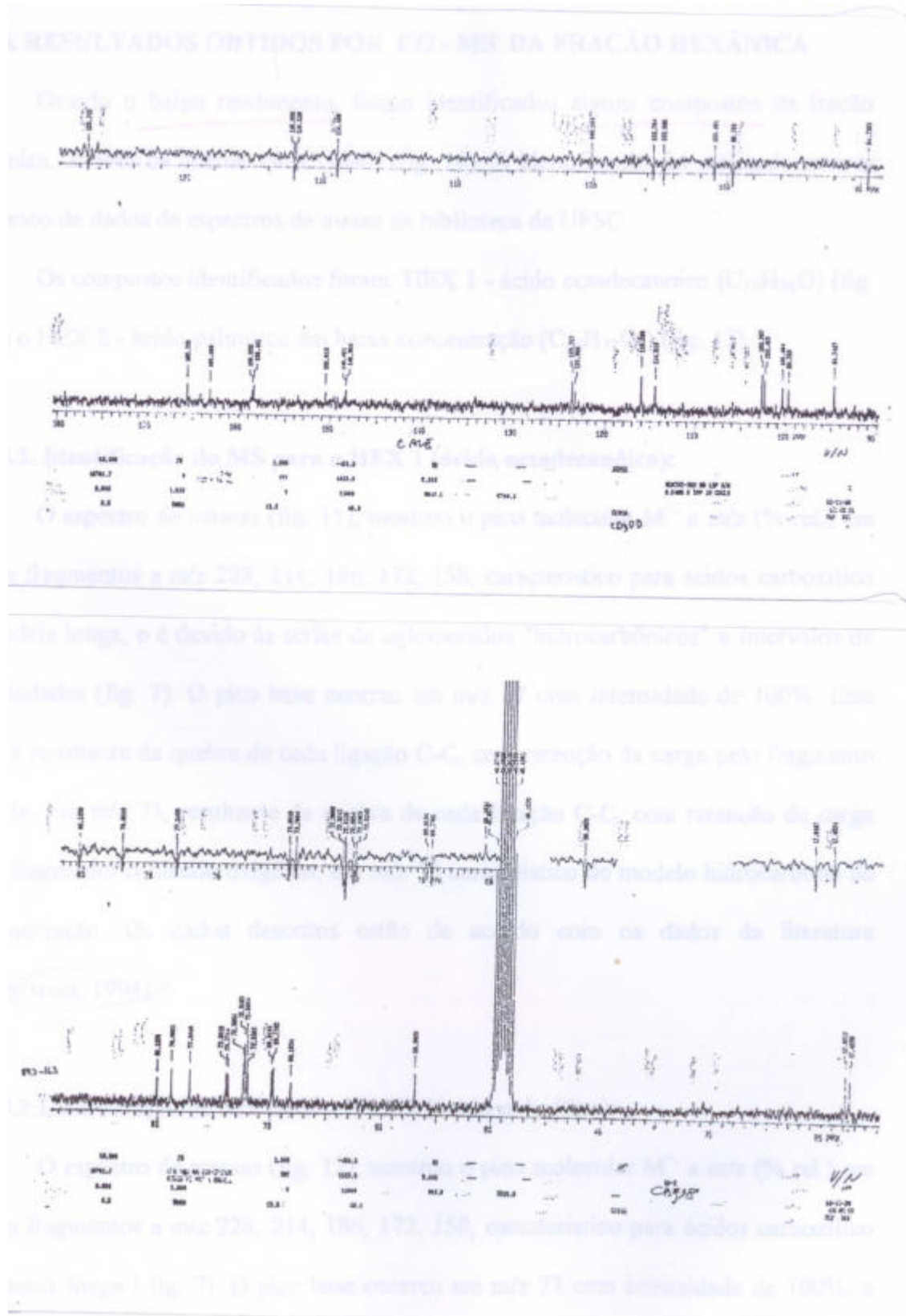


FIGURA 9 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto BUT 4

7.1.3. RESULTADOS OBTIDOS POR CG - MS DA FRAÇÃO HEXÂNICA

Devido o baixo rendimento, foram identificados alguns compostos da fração hexânica, através da análise em CG-MS (fig. 10). A identificação foi realizada através do banco de dados de espectros de massa da biblioteca da UFSC.

Os compostos identificados foram: HEX 1 - ácido octadecanoico ($C_{18}H_{36}O$) (fig. 11) e o HEX 2 - ácido palmítico em baixa concentração ($C_{16}H_{32}O_2$) (fig. 12).

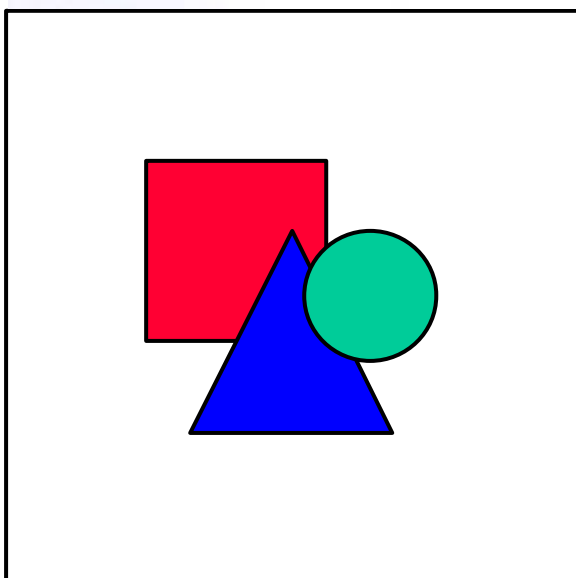
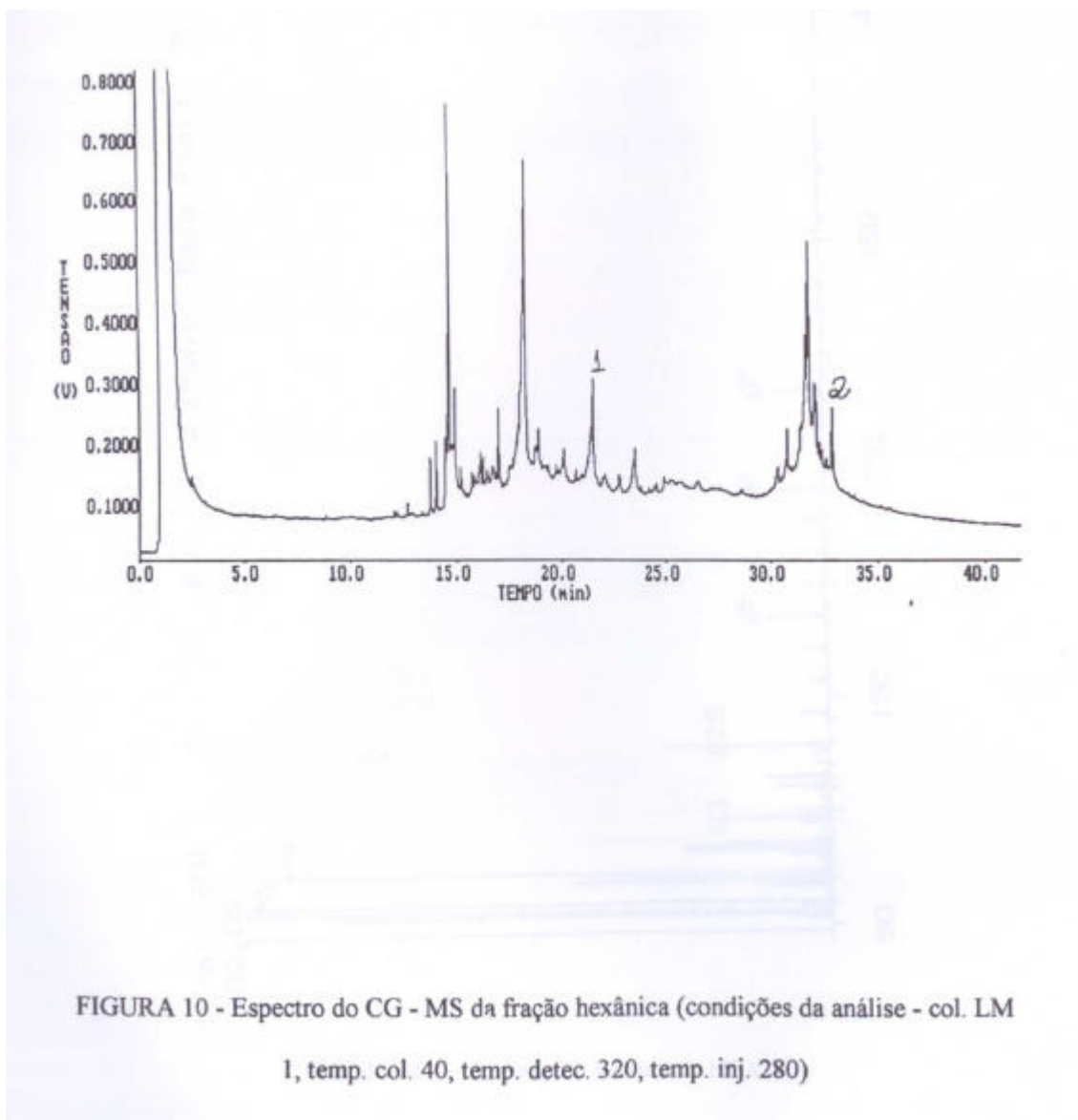
7.1.3.1. Identificação do MS para o HEX 1 (ácido octadecanoico):

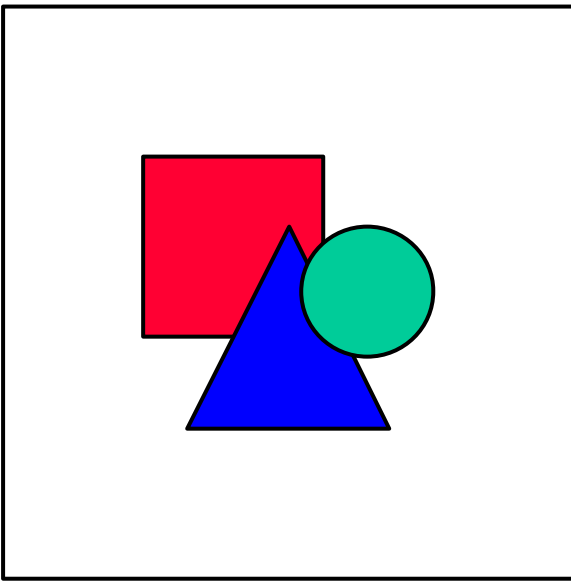
O espectro de massas (fig. 11), mostrou o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) em 284 e fragmentos a m/z 228, 214, 186, 172, 158, característico para ácidos carboxílico de cadeia longa, e é devido às séries de aglomerados "hidrocarbônicos" a intervalos de 14 unidades (fig. 7). O pico base ocorreu em m/z 57 com intensidade de 100%. Este pico é resultante da quebra de cada ligação C-C, com retenção da carga pelo fragmento alquila. Em m/z 73, resultante da quebra de cada ligação C-C, com retenção de carga pelo fragmento contendo oxigênio; em m/z 55 característico do modelo hidrocarbono de fragmentação. Os dados descritos estão de acordo com os dados da literatura (SILVERSTEIN, 1994).

7.1.3.2. Identificação do MS para o HEX 2 (ácido palmítico):

O espectro de massas (fig. 12), mostrou o pico molecular M^+ a m/z (% rel.) em 256 e fragmentos a m/z 228, 214, 186, 172, 158, característico para ácidos carboxílico de cadeia longa (fig. 7). O pico base ocorreu em m/z 73 com intensidade de 100%, e em m/z 73 ambos resultado da quebra de cada ligação C-C, com retenção de carga pelo fragmento contendo oxigênio. Em m/z 57, representa tipicamente o resultado da quebra

de cada ligação C-C, com retenção da carga pelo fragmento alquila. Em m/z 55 característico do modelo hidrocarbono de fragmentação. Os dados descritos estão de acordo com os dados da literatura (SILVERSTEIN, 1994).





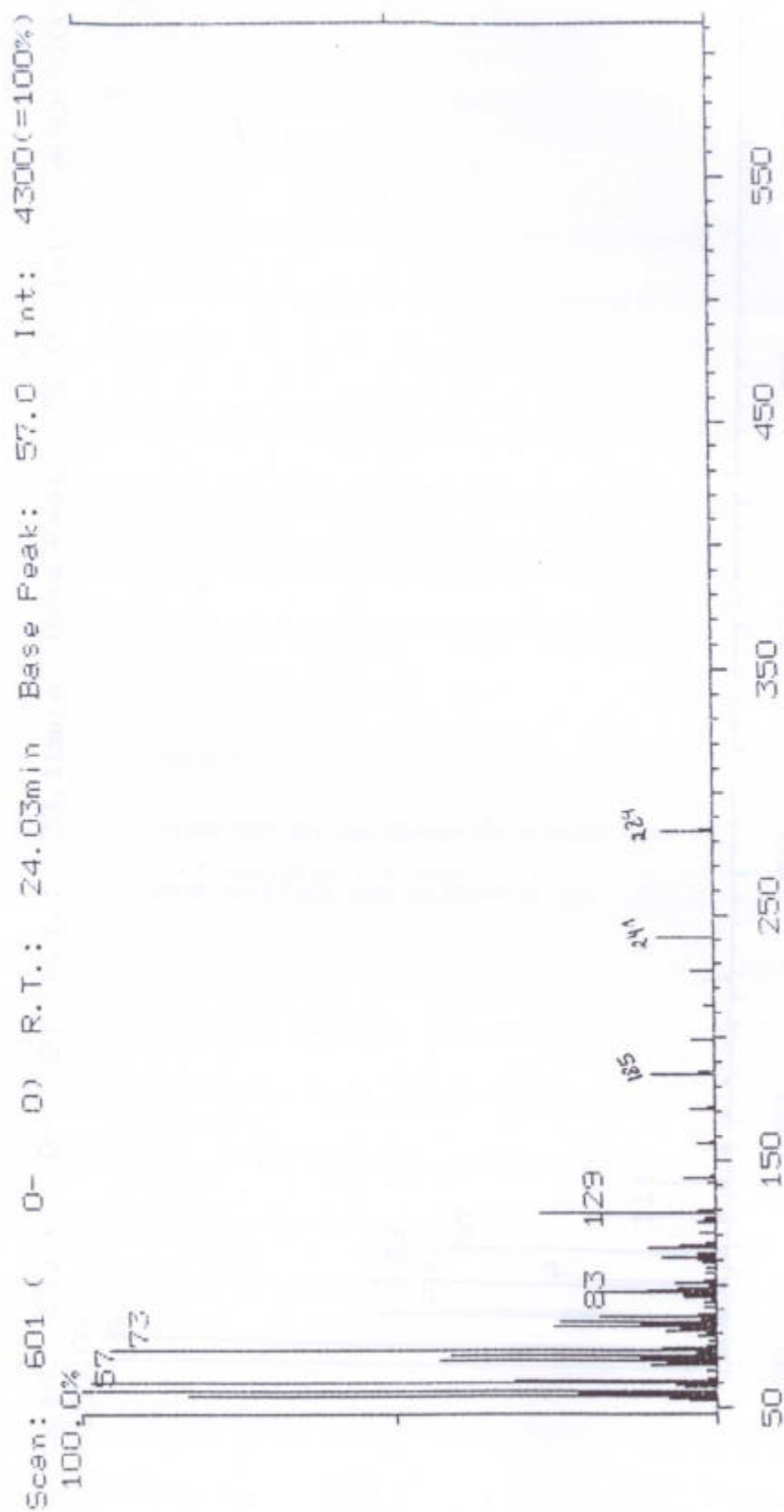


FIGURA 11 - Espectro de massas do HEX 1

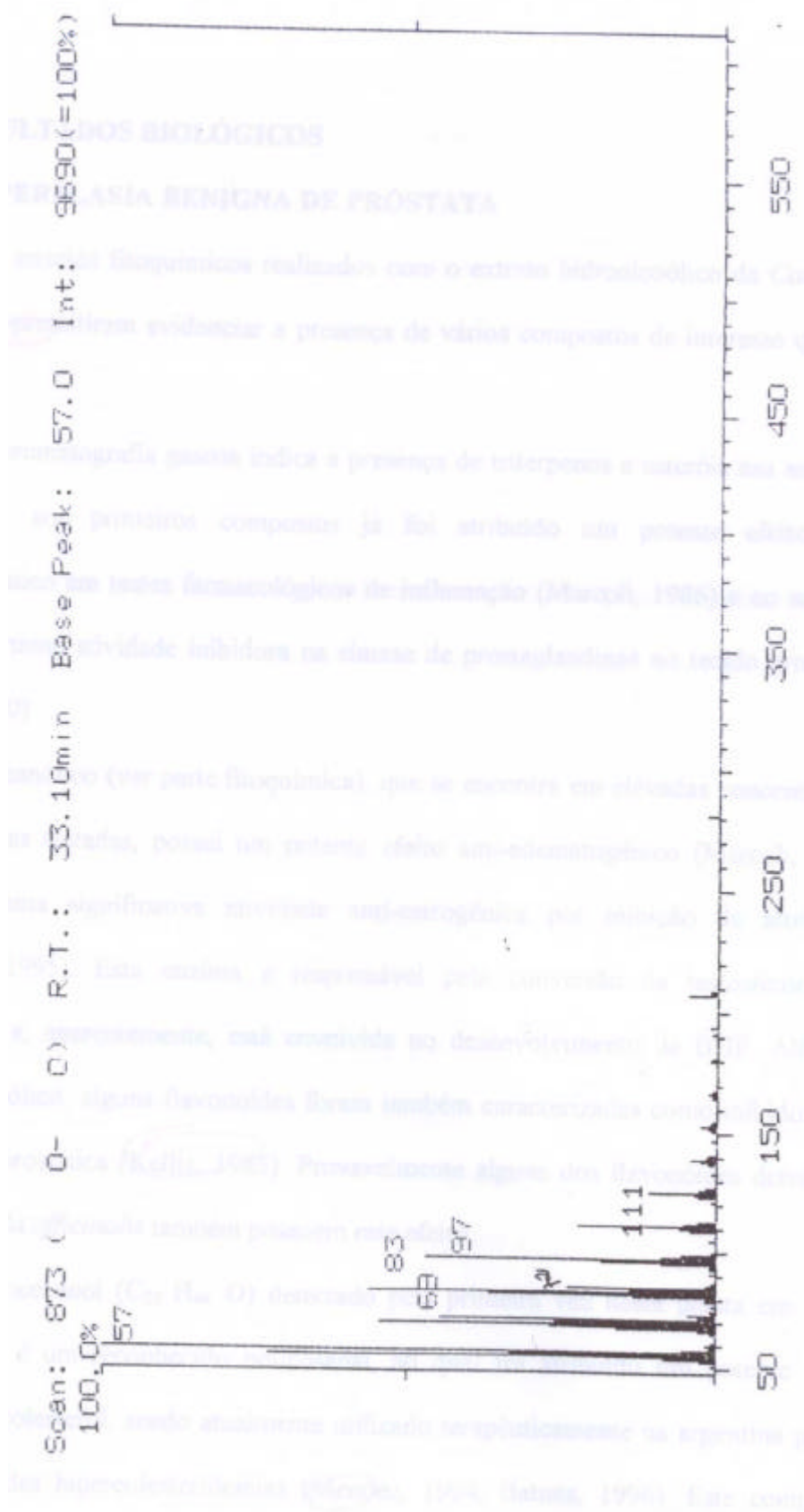


FIGURA 12 - Espectro de massas do HEX 2

7.2. RESULTADOS BIOLÓGICOS

7.2.1. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA

Os ensaios fitoquímicos realizados com o extrato hidroalcoólico da *Calendula officinalis* permitiram evidenciar a presença de vários compostos de interesse químico medicinal.

A cromatografia gasosa indica a presença de triterpenos e esteróis nas amostras analisadas; aos primeiros compostos já foi atribuído um potente efeito anti-edematogênico em testes farmacológicos de inflamação (MARCOLI, 1986) e ao segundo uma importante atividade inibidora na síntese de prostaglandinas no tecido prostático (SETHI, 1990)

O ácido oleanólico (ver parte fitoquímica), que se encontra em elevadas concentrações nas amostras testadas, possui um potente efeito anti-edematogênico (MARCOLI, 1986) além de uma significativa atividade anti-estrogênica por inibição da aromatase (GAMBER, 1995). Esta enzima é responsável pela conversão da testosterona em estrógenos e, aparentemente, está envolvida no desenvolvimento da HBP. Além do ácido oleanólico, alguns flavonóides foram também caracterizadas como inibidoras da aromatase prostática (KELLIS, 1985). Provavelmente alguns dos flavonóides detectados da *Calendula officinalis* também possuem este efeito.

O docosanol (C₂₂ H₄₆ O) detectado pela primeira vez nesta planta em nosso laboratório, é um reconhecido policosanol, ao qual foi atribuído um potente efeito redutor de colesterol, sendo atualmente utilizado terapêuticamente na argentina para o tratamento das hipercolesterolemias (MENENDEZ, 1994; BATISTA, 1996). Este composto, comercializado com o nome de Dupla®, também reduz a concentração das prostaglandinas e a agregação plaquetária (CARABAJAL, 1998).

A presença de alguns triterpenos na *Calendula officinalis* como o taraxastano (ver parte fitoquímica), detentor de um comprovado efeito antitumoral, sugere um claro potencial terapêutico desta planta no tratamento da HBP, uma vez que esta hiperplasia consiste numa doença degenerativa que eventualmente pode progredir para o câncer. Deve-se levar em consideração o fato de que estes triterpenos possuem estruturas químicas semelhantes aos fitosteróis presentes no extrato lipoesterólico da *Serenoa repens*, particularmente o β -sitosterol, frequentemente envolvido no efeito inibidor sobre a 5α -redutase, ao qual é atribuído o efeito terapêutico desta planta sobre a HBP.

7.2.1.1 . ANÁLISE DO PESO DA PRÓSTATA

Como pode ser observado na figura 13 , com respeito a Hiperplasia Prostática, ocorreu uma redução de 12% da massa prostática nos animais tratados com o EH da *C. officinalis*, com relação aos ratos controle hiperplásicos.

A redução do peso prostático observada nos ratos tratados, foi menor que aquela obtida com os animais tratados com Permixon® e Finasterida®. Entretanto, esta redução seria importante tendo em vista que o material testado se trata de um extrato bruto, enquanto os outros dois são frações purificadas e compostos sintéticos.

7.2.1.2. ANÁLISE DOS NÍVEIS DA FOSFATASE ÁCIDA

Ocorreu um importante decréscimo (fig. 14) na atividade da fosfatase ácida nos animais tratados com o EH da *C. officinalis* (40%), quando comparado aos ratos controle hiperplásicos. Já o Permixon® e Finasterida® causaram um decréscimo menos significativo na atividade da enzima (38 e 28% respectivamente). Cabe ressaltar que a

atividade desta enzima é frequentemente utilizado como biomarcador de proliferação celular no estroma prostático, sendo este um indicador bioquímico de elevação do metabolismo basal neste órgão. Os dados indicam, portanto, uma redução maior na HP ao nível molecular nos ratos tratados com a *C. officinalis* que com os tratados com Permixon® e Finasterida®.

7.2.1.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA

Como pode ser observado na figura 15, ocorreu um ligeiro aumento na concentração plasmática de testosterona (24%) nos animais tratados com o EH da *C. officinalis* quando comparado ao grupo de ratos controle com HP. Pode ser observado que os animais tratados com Permixon® (*Serenoa repens*) tiveram uma menor elevação deste andrógeno (6%). Já no tratamento com a Finasterida® observa-se uma elevação (160%) dos níveis de testosterona. Este resultado sugere fortemente que a *C. officinalis* possui um efeito inibitório sobre a atividade da 5 α -redutase circulante mais importante que o próprio Permixon®. Deve ser lembrado que um dos principais efeitos colaterais da Finasterida seria distúrbios na função sexual, como perda da libido e ejaculação retrógrada. Estes efeitos certamente poderiam estar associados a uma elevação contínua dos níveis de Testosterona.

7.2.1.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DO COLESTEROL

Os dados apresentados na figura 15 demonstram que o EH da *C. officinalis* possui um efeito hipocolesterolêmico significativo (12%) quando comparado aos ratos com Hiperplasia Prostática não tratados, após 30 dias de tratamento.

Devemos considerar que os animais tratados com Finasterida® sofreram uma elevação de 25% nos níveis sanguíneos de colesterol.

Vale lembrar que existe uma forte correlação positiva entre o desenvolvimento de HBP no homem (a partir dos 50 anos) e a elevação dos níveis de colesterol, uma vez que o colesterol é a molécula precursora na síntese de testosterona.

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos, se referem aos testes realizados com o EH da *C. officinalis*, onde os princípios ativos responsáveis por seus efeitos biológicos certamente se encontram em reduzida concentração. Deste modo, faz-se necessário a realização destes experimentos nas frações obtidas pelo particionamento deste extrato.

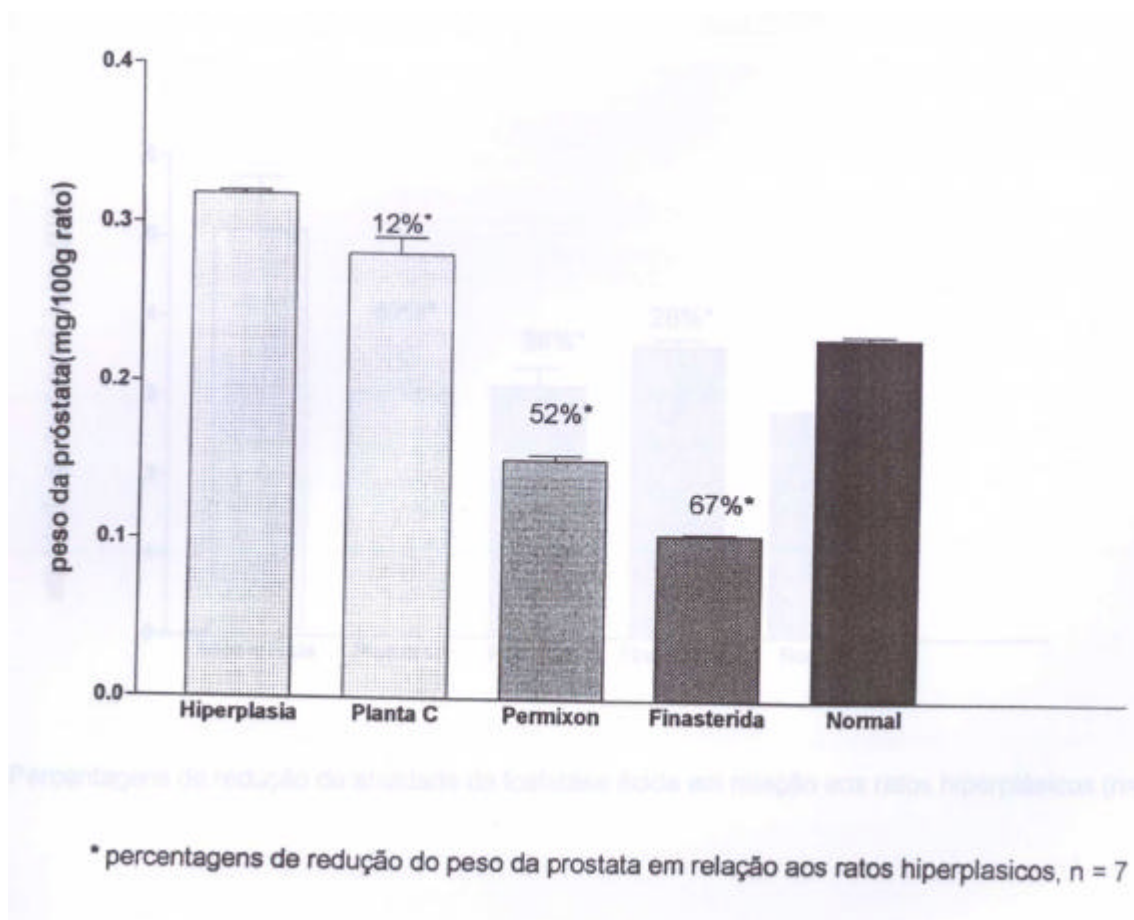
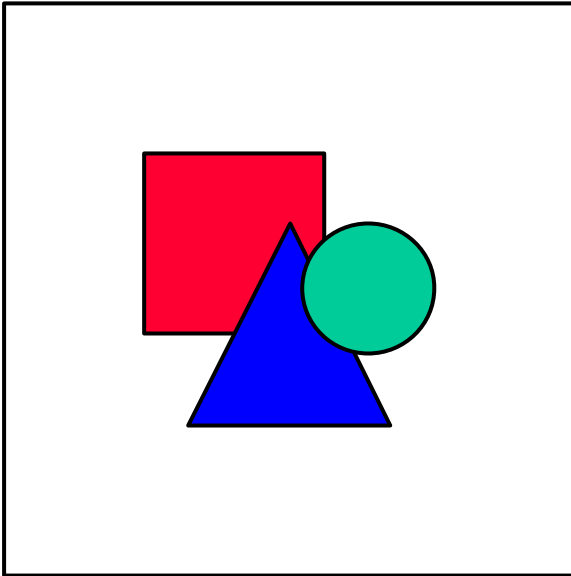
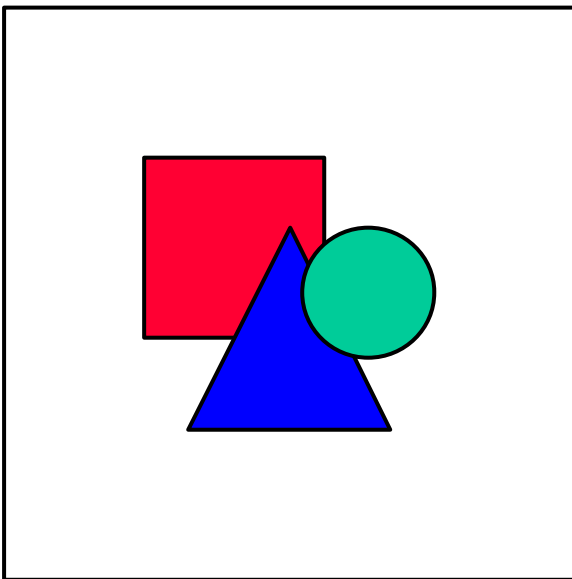


FIGURA 13 - Redução do peso prostático em ratos púberes castrados e tratados durante 30 dias com extratos brutos etanólicos da *Calendula officinalis* (45mg), Permixon (3mg), Finasterida (0,3mg) e em ratos normais



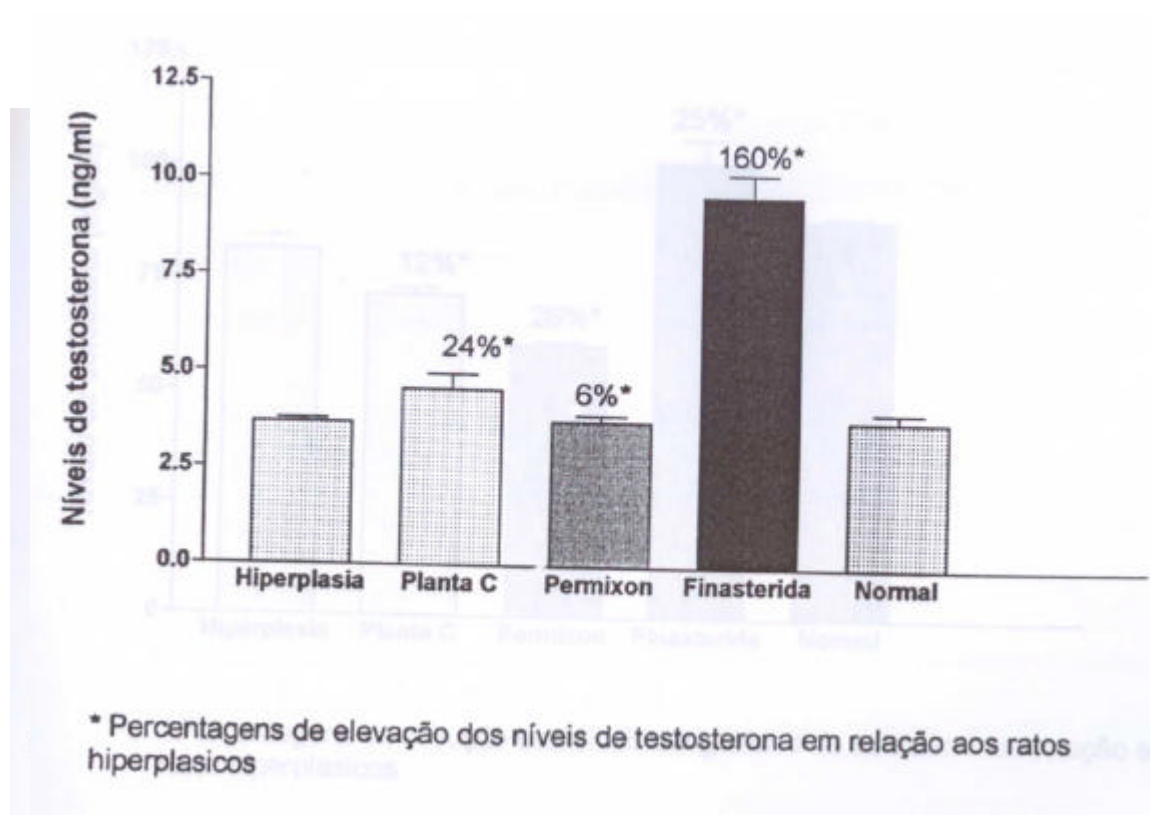


FIGURA 14 - Atividade da fosfatase ácida em ratos púberes castrados e tratados durante 30 dias com extrato bruto hidroalcoólico da *Calendula officinalis* (45mg), Permixon (3MG), Finasterida (0,3mg) e em ratos normais

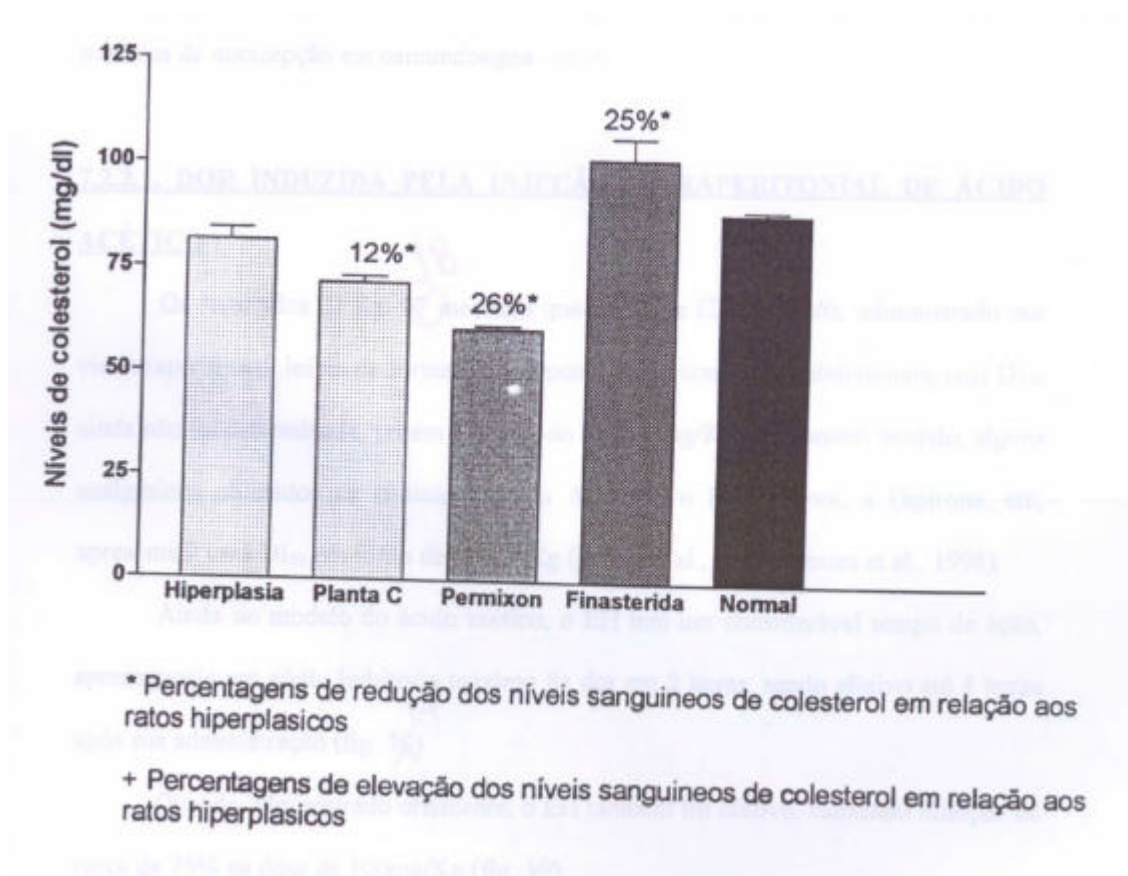


FIGURA 15 - Níveis de testosterona em ratos púberes castrados e tratados durante 30 dias com extrato bruto hidroalcoólico da *Calendula officinalis* e em ratos normais

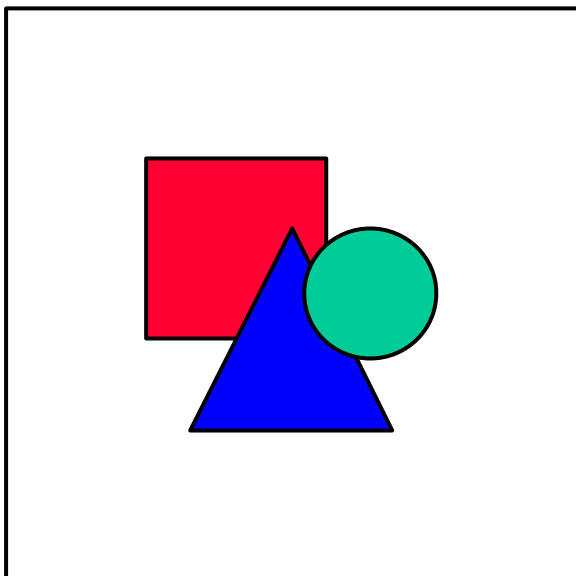


FIGURA 16 - Níveis sanguíneos de colesterol em ratos púberes castrados e tratados durante 30 dias com extrato bruto hidroalcoólico da *Calendula officinalis* (45mg), Permixon (3mg), finasterida (0,3mg) e em ratos normais

7.2.2. RESULTADOS ANTINOCICEPTIVOS

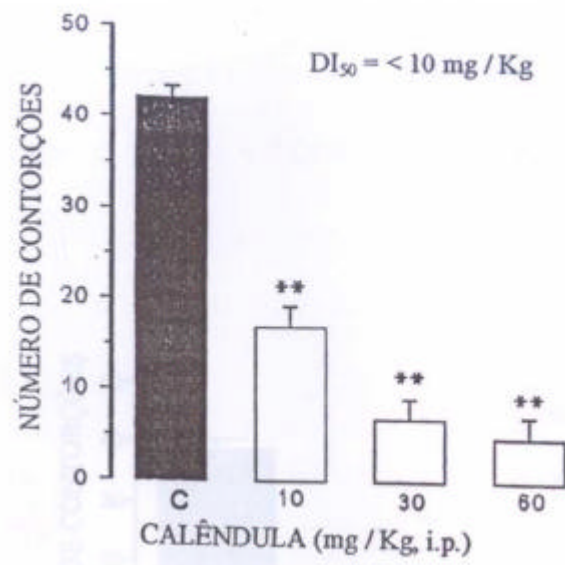
A *Calendula officinalis* é amplamente empregada na medicina popular para tratar diferentes patologias, incluindo processos dolorosos. Porém, não foram encontrados estudos anteriores que comprovassem sua eficácia. Assim, o extrato hidroalcoólico (EH) obtido das flores de *C. officinalis* foi analisado em diferentes modelos de nocicepção em camundongos.

7.2.2.1. DOR INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONIAL DE ÁCIDO ACÉTICO

Os resultados da fig. 17 mostram que o EH de *C. officinalis*, administrado por via intraperitoneal, inibiu de forma dose-dependente as contorções abdominais, cuja DI_{50} ainda não foi determinada, porém é menor do que 10 mg/Kg. No mesmo modelo, alguns analgésicos utilizados na clínica, como a Aspirina, o Paracetamol, a Dipirona, etc, apresentam uma DI_{50} em torno de 25 mg/Kg (BLOCK, 1998; SOUZA, 1998).

Ainda no modelo do ácido acético, o EH tem um considerável tempo de ação, apresentando um efeito inibitório máximo da dor em 2 horas, sendo efetivo até 4 horas após sua administração (fig. 18).

Quando administrado oralmente, o EH também foi efetivo, causando inibição de cerca de 75% na dose de 100mg/Kg (fig. 19).



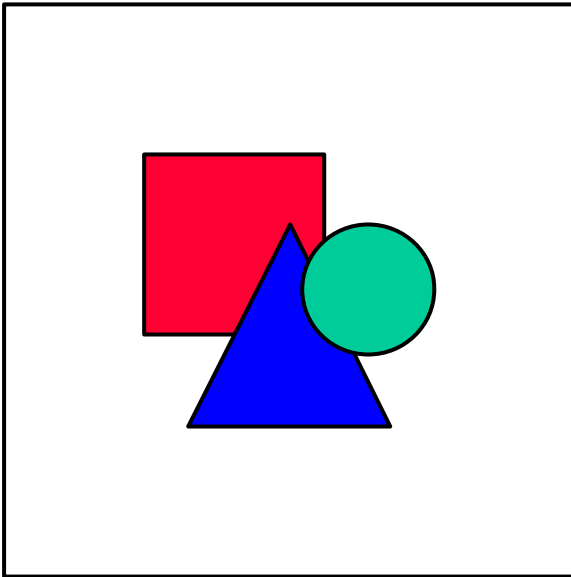
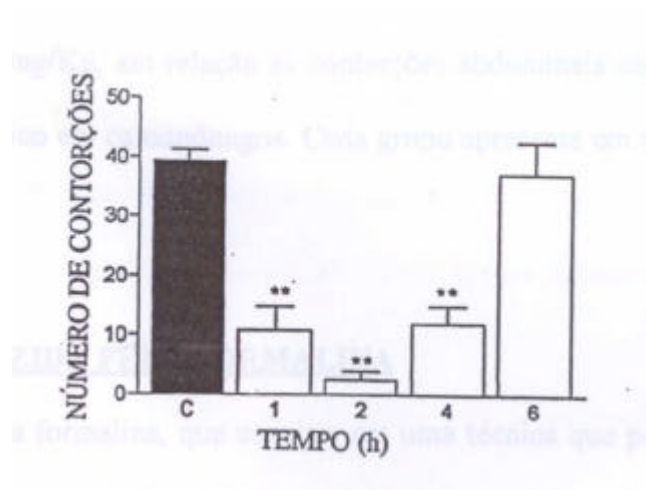


FIGURA 17 - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pelo extrato hidroalcoólico obtido das flores de *C. officinalis*, administrado intraperitonealmente na dose inferior a 10 mg/Kg, em relação as contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo apresenta em média 6-8 animais. ** P< 0,01.



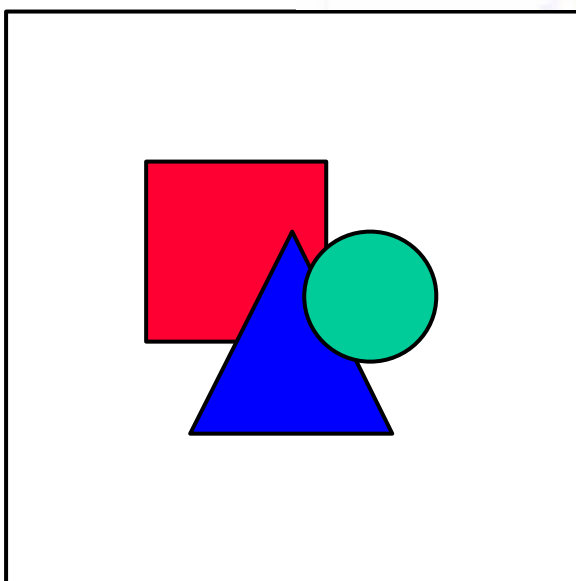
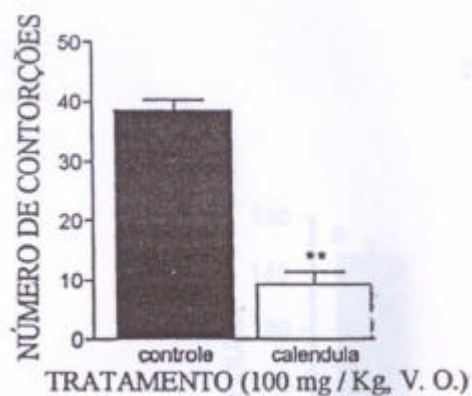


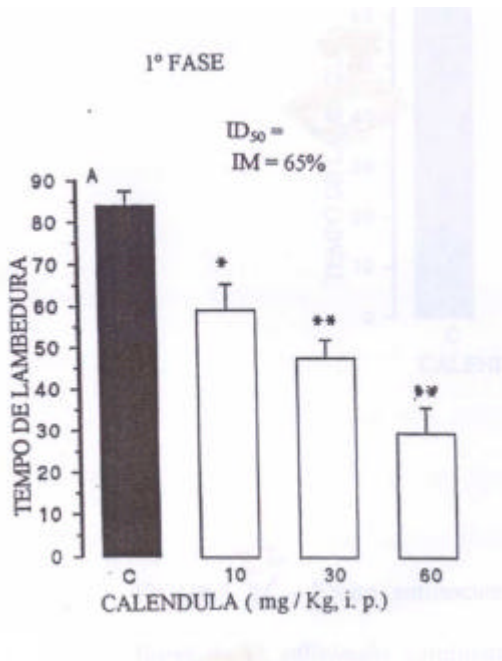
FIGURA 18 - Tempo de ação (Time-Course) do extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* administrado intraperitonealmente, no modelo do ácido acético, na dose de 60 mg/Kg.

FIGURA 19 - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pelo extrato hidroalcoólico obtido das flores de *C. officinalis*, administrado oralmente na dose de 100 mg/Kg, em relação as contorções abdominais causada pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo apresenta em média 6-8 animais. ** $P < 0,01$.

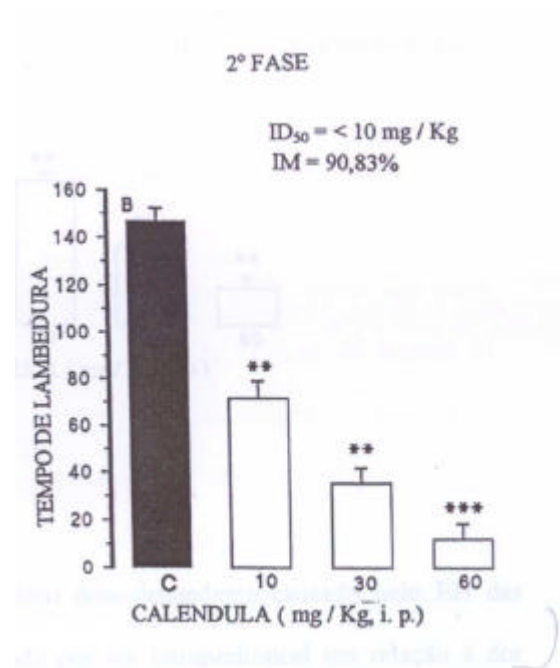
7.2.2.2. DOR INDUZIDA PELA FORMALINA

No modelo da formalina, que consiste em uma técnica que permite distinguir 2 fases de dor (origem neurogênica - 1º fase; origem inflamatória - 2º fase)

(HUNSKAAR, 1985; SOUZA, 1998). O EH foi mais ativo em relação à segunda fase



rem que o EH atua por um mecanismo diferente
steroidais, que inibem apenas a segunda fase do
(1998). As DI₅₀ foram de para a 1° e 2° fase
nte em comparação à Aspirina e Paracetamol em
8).



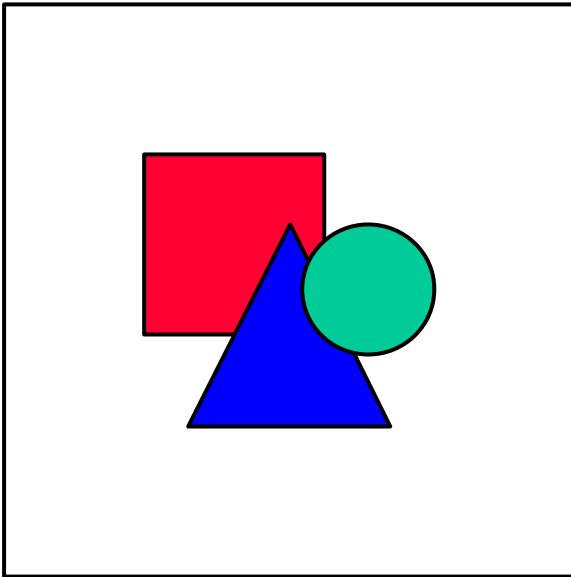


FIGURA 20 - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pelo EH das flores de *C. officinalis* administrado por via intraperitoneal em relação à 1º e 2º fase da dor induzidos pela formalina. Cada grupo apresenta em média 6-8 animais.

7.2.2.3 . DOR INDUZIDA PELA CAPSAISINA

No modelo da capsaicina, o EH também foi mais efetivo, confirmando o efeito desta planta na dor de origem neurogênica (fig. 21).

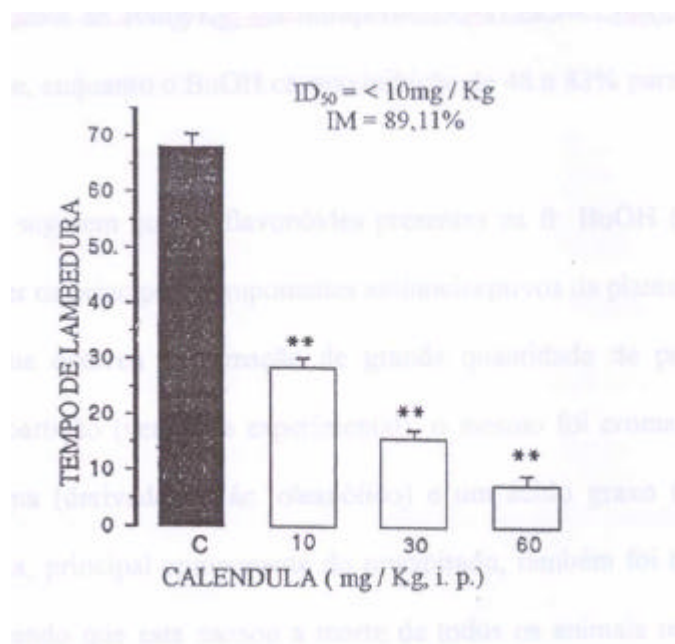


FIGURA 21 - Efeito antinociceptivo dose-dependente causado pelo EH das flores de *C. officinalis* administrado por via intraperitoneal em relação à dor induzidos pela capsaicina. Cada grupo apresenta em média 6-8 animais

Visando proceder um estudo orientado para determinar os compostos responsáveis pelos efeitos antinociceptivos verificados para o EH, realizou-se uma investigação farmacológica com algumas frações obtidas por partição (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

As frações de Diclorometano (DCM) e Butanol (BuOH) foram testados no modelo da formalina na dose de 10mg/Kg, via intraperitoneal. O DCM causou inibição de 51 e 60% para a 1º e 2º fase, enquanto o BuOH causou inibição de 48 e 83% para a 1º e 2º fase, respectivamente.

Estes resultados sugerem que os flavonóides presentes na fr. BuOH (ver parte fitoquímica), parecem ser os principais componentes antinociceptivos da planta.

Considerando que ocorreu a formação de grande quantidade de precipitado durante o processo de partição (ver parte experimental), o mesmo foi cromatografado obtendo-se uma saponina (derivado do ác. oleanólico) e um ácido graxo (ver parte fitoquímica). A saponina, principal componente do precipitado, também foi testada no modelo da formalina, sendo que esta causou a morte de todos os animais testados na dose de 10 mg/Kg, ip., sugerindo apresentar propriedades tóxicas que precisam ser melhor investigada. Por outro lado, o ácido palmítico foi testado no modelo do ácido acético, causando notável inibição (89%) na dose de 10 mg/Kg. A aspirina e o paracetamol, na mesma dose e modelo, causaram inibição de cerca de 35% (CECHINEL FILHO, 1995).

Cabe ressaltar que este é o primeiro relato da atividade analgésica tanto da planta em questão, como do ácido palmítico.

Finalmente, os resultados obtidos demonstram claramente que a *C. officinalis* possui em sua composição compostos químicos que exercem promissores efeitos antinociceptivos em camundongos. Tais resultados confirmam o uso na medicina popular desta planta como um agente terapêutico contra processos dolorosos em geral.

8. CONCLUSÕES

1. A investigação fitoquímica do extrato das flores de *C. officinalis*, resultou no isolamento e identificação do Ácido Palmítico e do flavonóide Typhaneoside, sendo estes compostos já relatados para para esta planta. Foi identificado por CG-MS, na fração hexânica, o ácido octadecanóico e pequena concentração de ácido palmítico. Foi isolado ainda alta concentração de saponina derivada do ácido oleanólico, cuja estrutura não foi totalmente elucidada.
2. No estudo da atividade antinociceptiva, constatou-se potente ação na fração butanólica, provavelmente pela alta concentração de flavonóides. Constatou-se ainda uma forte ação analgésica para o ácido palmítico, sendo este efeito inédito para este composto. Esta ação comprovada justifica o uso da *C. officinalis* na medicina popular.
3. Constatou-se através de estudos biológicos, alta toxicidade para as saponinas isoladas, onde 10 mg/Kg matou todos os animais. Este fato deve ser melhor investigado, pois a Calêndula é utilizada pela população na forma de extrato bruto.
4. No estudo da Hiperplasia Benigna de Próstata, verificou-se um potencial efeito benéfico para esta patologia, sugerindo um promissor fitoterápico a ser utilizado para o tratamento desta enfermidade. Como foi investigado este efeito apenas para o extrato bruto, um estudo de suas frações e compostos isolados se faz necessário.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, G. e MANLIMOS, F. **Serlo**, Academic Press, New York, p. 325.
2. ALAIN, C. A. **Clin. Chem.** 20:470-7 (1974).
3. ANDREEVA, L. G. Localization and content of carotenoids in highly productive forms of *Calendula officinalis*. **Aptechnoe. Delo.** 10:46 (1961).
4. ARMOND, C. **Produção e teor de óleos essenciais da Calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada em compostos orgânicos de diferentes resíduos.** Viçosa, UFV, 1998. 20p .
5. BARREIRO, E. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova.** 13(1):29-37 (1990).
6. BATISTA, **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, 34:134-7(1996).
7. BAUER, R. & TITTEL, G., **Phytomedicine**, 2:193(1996)
8. BEZAKOVA, L.; MASTEROVÁ, I; PAULIKOVA, I. et al. Inibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie.** 51:126-7 (1996).
9. BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M. et al. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paludosa*. **J. Ethnopharmacol.** 61:85-89 (1998).
10. BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Curcubita pepo* L. **Fitoterapia.** 68:291-302 (1997).
11. BRITISH PHARMACOPEIA. London : General Medical Council, 1953. p. 573-574.
12. CAIRO, N.; BRICKMANN, A. **Guia de medicina homeopática.** 21ªed. São Paulo: Teixeira / Martins Fontes, 1987. p. 246-251.
13. CARABAJAL, D. **Prostaglandins Leukt. Essent. Fat. Acids.**, 58:61-4(1998).
14. CARVALHO, P.; TAGLIAVINI, D. TAGLIAVINI, R. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: estudo clínico e histórico em ratos. **Rev. C. Bioméd.** 1991. V. 12, p. 39-50.
15. CASTELLANI, D. C.; FIGUEIREDO, L. S.; PEDROSA, M.W. et al. Estudos da germinação de sementes de cinco variedades de calêndula (*Calendula officinalis* L.).

- In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2, 1995, Araraquara. **Resumos...** Araraquara: UNESP, 1995. p.7.
16. CASTRO, J. L. **Medicina vegetal**: teoria e prática conforme a naturopatia. 2ed. Europa-América. 1981, p. 150.
 17. CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, A.; WILLAIN FILHO, A. et al. Estudo fitoquímico e atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. **Rev. Bras. de Farm.** 76(4):115-7 (1995).
 18. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A., Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. **Quim. Nova**, 21(1):99-105 (1998).
 19. CHATONET, J. **As plantas medicinais**: preparo e utilização. São Paulo: Martins Fontes, 1983.
 20. COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C. et al. The abdominal constriction response and its supression by drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** 32:295-310 (1968).
 21. CORRÊA, C.; MING, L. C.; e SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
 22. CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2ed. New York : Botanical Garden Published, 1988.
 23. CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2ed. Rio de Janeiro: Civilização brasileira, 1982. p. 141-142.
 24. CUBAS, M. R. **Revisão bibliográfica sobre a *Calendula officinalis* L.** Curitiba, 1990. 31 p. Monografia (Curso de Especialização em Fitofármacos e Fitoterapia) - Escola de Saúde Pública do Paraná, Fundação Caetano Munhoz da Rocha, Secretaria do Estado do Paraná.
 25. DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Méd.** 60(6):516-20 (1994).
 26. DORCSI, M. **Homeopatia: formação básica**. São Paulo: Roca, v. 2, 1982a. p. 234.
 27. DORCSI, M. **Homeopatia: formação básica**. São Paulo: Roca, v. 2, 1982b. p. 234.
 28. DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC, 1985. p. 87-88.
 29. ELIAS, R.; DE MEO, M. VIDAL-OLLIVIER, E. et al. antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *Calendula arvensis* L. and *Hedera helix* L. **Mutagenesis**, 5(4):327-31 (1990).

30. ESCHRICH, Walter. **Pulver-atlas der drogen der deutschsprachigen arzneibücher**. Stuttgart: Gustav Fischer. 1997, p. 238-239
31. FONT-QUER, P. **Plantas medicinales**. El dioscórides renovado. 10 ed. Ed. Labor. 1987, p. 832-33.
32. GAMBER, D. & SPITELLER, G. **Planta Médica**. 61:138-40 (1995).
33. GEDEON, J.; MAYER, M. The distribution of oleanolic acid glycoside and the bitter principle in *Calendula officinalis*. **Pharmazie**, 9:922 (1954).
34. GOMES, A., SHARMA, R. M. e GHATAK, B. **Indian J. Exp. Biol.** 25:826-29 (1987).
35. GRACZA, L. Oxygen- containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. **Planta Med.** 53(2):227 (1987).
36. HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain., **Pain**. 30:103-14 (1987).
37. IATSYNO, A.; BELOVA, L.; LIPKINA, G. et al. Pharmacology of calenduloside B., a new triterpene glycoside from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakol. Toksikol.** 41(5):556-60 (1978).
38. JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1991.
39. JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução a taxonomia vegetal. 5ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1979. p. 628-30.
40. KASPRZYK, Z.; WOJCIECHOWSKI, Z.; JANISZOWSKA, W. **Phytochemistry**. 9:561-64 (1970).
41. KELLIS, J. T. & VICKERY, L. E., **Science**, 225:1032-34, (1984).
42. KENNEY, P., **J. Med. Chem.**, 40():1293-1315.
43. KAVALTCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomed. Pharmacother.** 51(4):176-80 (1997).

44. KEVILLE, K. **Herbs an ilustrated encyclopedia**: A complete culinary, cosmetic, medicinal, and ornamental guide. USA: Magda Books, 1995. p.54.
45. KLOUSCHEK-POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N. et al. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using isolated from *Calendula officinalis*. **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg**, 8(4):63-7 (1982).
46. KOMISSARENKO, N. F. et al. Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. **Khim. Prir. Soedin**. 6:795-801 (1988).
47. KUBO, I.; MUROI, H.; KUBO, A. Naturally occurring antiacne agents **J. Nat. Prod.** 57(1):9-17 (1994).
48. MARANDOLA, E. Main phytoderivatives in the management of benign prostatic hyperplasia. **Fitoterapia**, 68(3):195-9 (1997).
49. MARCOLI, M. **Farmac. Terapia**, 3:135-39(1986).
50. MARINI & BETTÓLO e cols. **J. Chromatogr.** 213:113-127(1981).
51. MARQUES, L. C. Hypericum e Kava-Kava: aspéctos farmacológicos e terapêuticos. **Racine**, v.51. 1999, p 56-72.
52. MASTEROVÁ, I. et al. Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L. **Chem. Pap.** 45(1):105-8 (1991).
53. MENENDEZ, R. **Biol. Res.**, 27:199-201(1994).
54. MIRONIVA, V. N. **Farmacol. Toksikol.** 45:45-47 (1982).
55. MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1. 1995, p. 56-64.
56. OCIOSZYNSKA, I. et al. Study of the chemistry of marigold (*Calendula officinalis* L.) inflorescence. **Herba Pol.**, Poznan. 23(3):191-9 (1977).
57. PENNA, M. *Calendula officinalis*. In:____ **Notas sobre plantas brasileiras**. Rio de Janeiro: Araújo Penna Filhos. 1921, p. 67-9.
58. PINTO, A. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v 18, n. 6. 1995, p. 608-14.
59. RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A. et al. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. **J. Ethnopharmacol.** 61(11):49-45 (1998).
60. ROSESTELATO, C. R. Aclimação e cultivo de *Calendula officinalis*, com finalidade de uso em fitoterapia e homeopatia. **Bioervas Plantas Medicinai**s, Rio de Janeiro, 1996.

61. ROY, A.; BROWER, M. e HAYDEN J.,(1971), 17(10):93-8.
62. SAKURADA, T. KATSUMADA, K. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists., **Neurosci. Lett.**, p.131-42, 1993.
63. SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. et al. Analysis of the mechanism sunderlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmac.** 26(7):1495-506 (1995).
64. SANTOS, E. et al. **Manual de normas técnicas para farmácia homeopática**. 2 ed. São Paulo: COPISOL, 1995. p.54-64.
65. SCHEFFER, M. C. **Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais selecionadas pelo projeto de fitoterapia do SUDS / PR**. Curitiba: Secretaria do Estado da Saúde. Fundação Caetano Munhoz da rocha. Projeto de Fitoterapia do SUDS. 1989, p. 8.
66. SCHULTZ, A. R. **Introdução à botânica sistemática**. 4 ed. Porto Alegre: Ed. Universitária, v 2. 1984.
67. SETHI, N. **Fitoterapia**, 61:547-51(1990).
68. SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of plant extrats. **Vet. Med. Nauki** . 18(6):87-94 (1981).
69. SILVERSTEIN, 1994
70. SOUZA, M. M.; DE JESUS, R. A. P.; CECHINEL FILHO, V. et al. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from the *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**. 5(2):103-7 (1998).
71. STARÝ, F. **Plantas medicinales**. Paris: Gründ, 1992. p. 62-3.
72. STEERS, D., **Dis. Mon.**, 41(7): 437-40 (1995).
73. STUART, M. *Calendula officinalis* L. Compositae. In:___ **The encyclopedia of herbs and herbalism**. New York: Crescent Books, 1979, p. 164-5.
74. TEGLIA, A. Study of procedures for extration of active principles from medicinal plants. *Calendula officinalis* L. **Cosmetic & Toiletries**. 10(1):28-32 (1989).
75. TESKE , M.; TRENTINE, A. M. **Compêndio de fitoterapia**. Curitiba : Ingra. 1995, p. 66-8.
76. THOMAS, F. J. **Androl**. 15:97-103 (1994).
77. TOSHIHIRO, A., YASUKAWA, K. et al. **Phytochemistry**. 43:1255-60 (1996).

78. UGAZ, O. L. **Investigación fitoquímica.** Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: Fondo Editorial, 1994.
79. ULLMAN, D. **Homeopatia:** medicina para o século XXI. 10ed. São Paulo: Andrei, 1988. p. 89.
80. VALISENKO L. **Farmacol. Toksikol.**45:66-70 ().
81. VANNIER, L.; POINIER, J. **Tratado de matéria médica homeopática.** 9°ed. São Paulo: Andrei, 1987. p. 89.
82. VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, YUNES, R. A. et al. Central aninociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6 dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative. **J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics.** 278(1):304-12 (1996).
83. VIDAL-OLLIVIER, E. et al. Determination of saponins of *Calendula officinalis* L. in relation to cultivar and harvesting date. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 65, n. 8. 1990, p. 236-8.
84. VIDAL-OLLIVIER, E. et al. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. **Planta Med.** 55(1):73-74 (1989).
85. VIDAL-OLLIVIER, E. et al. Identification and determination using high-performance liquid chromatography of six saponosides in flowers of *Calendula officinalis* L. **Pharm. Acta Helv.** 64(5-6):156-8 (1989).
86. VOLÁK, J.; STODOVA, J. **Plantas medicinais.** Portugal: Editorial Inquérito, 1990. p. 99.
87. WILKOMIRSKI, B., (1985), **Phytochemistry**, 24(12):3066-3067.
88. WOJCIECHOWSKI, Z.; JELONKIEWICZ-KONADOR, A. et al. The struture of glycosides of oleanolic aci isolated from the roots of *Calendula officinalis*. **Phytochemistry.** 10:1121-24 (1971).
89. YASUKAWA, K. **Oncology.** 53:341-4 (1996).
90. ZITTERL-EGLESEER, K; SOSA, S.; JURENITSCH, J. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **J. Ethnopharmacol.**57(2):139-44 (1997).