



**INFLUÊNCIA DO PROCESSO EXTRATIVO NAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS
EXTRATOS DE *Calendula officinalis* L.
(ASTERACEAE)**

*INFLUENCE OF EXTRACTION PROCESS IN PHYSICOCHEMICAL
PROPERTIES OF EXTRACTS FROM *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE)*

*INFLUENCIA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN EN PROPIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS DE EXTRACTOS DE *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE)*

**Júlio César Borella¹, Dianne Macielly Alves de Carvalho², Juliana Coelho Lopes
Teixeira³, Nilo Sérgio Ribeiro⁴**

¹ Professor de Farmacognosia do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de
Ribeirão Preto. Farmacêutico Responsável pelo Laboratório de Manipulação da Secretaria
Municipal de Saúde de Ribeirão Preto

² Bolsista CNPq (IC) da disciplina de Farmacognosia do Curso de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de Ribeirão Preto

³ Farmacêutica - auxiliar do Laboratório de Manipulação Farmacêutica da Secretaria
Municipal de Saúde de Ribeirão Preto

⁴ Técnico de laboratório do Projeto FAPESP no. 2006/61408-3 - Disciplina de
Farmacognosia

*autor para correspondência: jborella@unaerp.br

Recebido em 31/01/2012, Aceito em 18/06/2012.

RESUMO: O presente trabalho apresenta estudo comparativo de processos de obtenção de extratos hidroalcoólico e hidroglicólico de inflorescências de *Calendula officinalis* obtidas a partir das drogas vegetais dessa espécie. Os extratos foram produzidos por percolação, na proporção de 1:5, utilizando-se como solventes, a mistura etanol:água 62:38 (v/v) e propilenoglicol:água 90:10 (v/v). Os extratos foram submetidos às análises físico-químicas e os resultados mostraram que o extrato hidroalcoólico apresentou densidade relativa de 0,9299 (g/ml); pH de 5,80; resíduo seco de 3,6% (m/m); teor de flavonoides de 0,06% (m/m) e perfil cromatográfico, por CCD, identificando rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo. O extrato hidroglicólico apresentou densidade relativa de 1,0948 (g/ml); pH de 5,90; resíduo seco de 2,4% (m/m); teor de flavonoides de 0,05% (m/m) e perfil cromatográfico identificando somente a presença de ácido clorogênico. Os parâmetros físico-químicos densidade relativa e resíduo seco foram diferentes significativamente entre os extratos. Com relação ao pH e à concentração de flavonoides não houve diferenças significativas entre os dois tipos de extratos. Esses resultados mostraram que o extrato hidroglicólico é mais seletivo para a extração de flavonoides e o extrato hidroalcoólico possui maior quantidade de substâncias extraídas da droga vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: Medicamentos Fitoterápicos, Preparações de plantas, Controle de qualidade.

SUMMARY: This paper presents a comparative study of procedures for obtaining hydroalcoholic and hydroglycolic extracts of inflorescences of *Calendula officinalis*. After obtaining the herbal drug, extracts were prepared by percolation at a ratio of 1:5, using ethanol: water 62:38 (v/v) and propylene glycol: water 90:10 (v/v). The extracts were analyzed and the hydroalcoholic showed relative density of 0.9299 (g/ml); pH 5.80; 3.6% (w/w) dry residue; flavonoids content of 0.06% (w/w) and chromatographic profile by TLC, identifying rutin, chlorogenic acid and hyperoside. The hydroglycolic extract showed relative density of 1.0948 (g/ml); pH 5.90; 2.4% (w/w) dry residue; flavonoids content 0.05% (w/w) and chromatographic profile identifying only the presence of chlorogenic acid. The physicochemical parameters relative density and dry weight were significantly different between extracts. With respect to pH and the concentration of flavonoids were no significant differences among them two types of extracts. These results showed that the hydroglycolic extract is more selective for the extraction of flavonoids and hydroalcoholic extract has a greater quantity of substances extracted from the plant drug.

KEYWORDS: Phytotherapeutic drugs, Plant Preparation, Quality control.

RESUMEN: Este trabajo presenta un estudio comparativo de los procedimientos para obtener extractos hidroglicólico y hidroalcohólico de las flores de *Calendula officinalis* obtenido de las drogas vegetales de esta especie. Los extractos fueron producidos por percolación en una proporción de 1:5, utilizando como disolvente, la mezcla de etanol: agua 62:38 (v/v) y propilenglicol: agua 90:10 (v/v). Los extractos fueron sometidos a análisis físico-químicas y los resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico tenía densidad relativa de 0,9299 (g/ml), pH 5,80, un peso seco de 3,6% (m/m), contenido flavonoides de 0,06% (m/m) y el perfil cromatográfico por CCD, la identificación de rutina, ácido clorogénico y el hyperoside. El extracto hidroglicólico mostró densidad relativa de 1,0948 (g / ml), pH 5,90, peso seco de 2,4% (m/m), contenido de flavonoides de 0,05% (m/m) y el perfil cromatográfico identificar sólo la presencia de ácido clorogénico. Los parámetros físico-químicos de densidad relativa y el peso seco fueron significativamente diferentes entre los extractos. Con respecto al pH y la concentración de flavonoides no hubo diferencias significativas entre ellos dos tipos de extractos. Estos resultados mostraron que el extracto hidroglicólico es más selectivo para la extracción de los flavonoides y el extracto hidroalcohólico tiene una mayor cantidad de sustancias extraídas de la droga vegetal.

PALABRAS CLAVE: Medicamentos fitoterápicos, Preparaciones de plantas, Control de calidad.

INTRODUÇÃO

Desde os anos 80 observou-se em todo o mundo o que se convencionou chamar de "Onda Verde", ou seja, o retorno da população à utilização de medicamentos a base de extratos vegetais para dirimir, "de forma mais saudável", seus problemas de saúde. Este tipo de comportamento é devido, em parte, pela publicidade desenvolvida a partir de meados do século XX que exaltava a "Medicina Prometêutica", baseada na cura através de fármacos sintéticos. Com o passar das décadas, as populações em diversos países do mundo concluíram que essa medicina não seria tão eficiente e segura quanto

se apregoava, retornando ao uso de preparações a base de extratos vegetais⁽¹⁾.

Apesar dessa nova situação que se instalou na área farmacêutica, no Brasil houve pouca evolução em relação à qualidade do fitoterápico⁽²⁻⁴⁾, mesmo com a publicação de várias legislações com esse objetivo^(5,6) e do Formulário de Fitoterápicos⁽⁷⁾ pela Farmacopéia Brasileira, atualizando as técnicas de preparo de algumas formas farmacêuticas utilizadas na fitoterapia.

Calendula officinalis L., espécie medicinal de origem europeia e pertencente à família Asteraceae, ausente nas três primeiras edições da

Farmacopeia Brasileira, foi introduzida a partir da quarta edição e atualmente consta da lista de plantas medicinais de interesse para o SUS⁽⁸⁾. A droga vegetal derivada dela, segundo definição da Farmacopeia Brasileira⁽⁹⁾, são as flores liguladas inteiras ou trituradas, acompanhadas de escassas flores tubulosas secas, separadas do receptáculo e das brácteas involucrais. O fitoterápico produzido com esta espécie tem várias utilizações, tais como antiespasmódica, diaforética, anti-hemorragica e emenagoga. Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, apresentou atividades imunoestimulantes, além de não apresentar efeitos tóxicos relacionados aos parâmetros bioquímicos e hematológicos, dando respaldo ao seu emprego tradicional como cicatrizante e antiinflamatório tópico⁽¹⁰⁻¹²⁾. Em seu fitocomplexo são citadas três categorias de substâncias: óleos voláteis, terpenoides e flavonoides, sendo que estes últimos podem contribuir para o efeito antiinflamatório⁽¹³⁾ e servem como marcadores para a espécie⁽⁵⁾.

É fato que a composição química de um extrato de determinada espécie vegetal pode ser variável em função de diversos fatores, entre eles podem ser citados os parâmetros que influenciam o processo de extração dos princípios ativos. Mais rotineiramente, os extratos usados nas preparações farmacêuticas contendo *C. officinalis* utilizam como solventes misturas hidroalcoólicas e misturas hidroglicólicas. No Formulário

de Fitoterápicos⁽⁷⁾ há somente a descrição da preparação da tintura de Calêndula, por percolação na proporção de 1:10, com álcool 70% (p/p). No entanto, faltam informações sobre os parâmetros físico-químicos para que sejam amparadas análises de controle de qualidade sobre essas preparações. Dados relativos aos extratos hidroglicólicos são mais raros na literatura, possivelmente por eles não serem farmacopêicos e nem citados no Formulário de Fitoterápicos, sendo, por vezes, tratados como segredos industriais, principalmente pela indústria cosmética. Por outro lado, algumas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de padronizar metodologias extrativas, farmacotécnicas e analíticas para algumas espécies. Ardisson et al.⁽¹⁴⁾ mostraram, para *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, que os melhores solventes para obtenção de extratos glicólicos com maiores teores de taninos foram aqueles preparados com mistura propilenoglicol : água (8:2). Nunes et al.⁽¹⁵⁾ realizaram trabalho no sentido de padronizar a tintura de *C. officinalis* em função de características físico-químicas dessa preparação. Borella et al.⁽¹⁶⁾ mostraram que preparações semissólidas (pomadas) a base de *C. officinalis* preparadas por suspensão, com extratos hidroalcoólicos continham maiores teores de flavonoides que aquelas preparadas por solução.

Sendo assim, é importante que detalhes técnicos a respeito da produção e controle desses extratos sejam padronizados em obras oficiais para que exista suporte para as análises de controle de qualidade desses insumos. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo agregar mais conhecimento relativo a esse tema, avaliando as possíveis influências dos tipos de solventes utilizados no processo extrativo sobre as características físico-químicas dos extratos de *C. officinalis*. Os processos extrativos se desenvolveram com dois tipos de solventes (mistura hidroalcoólica e mistura hidroglicólica). As análises dos extratos envolveram determinação de densidade relativa, pH, resíduo seco, quantificação dos flavonoides e perfil cromatográfico.

MÉTODOS

Obtenção da droga vegetal

As drogas vegetais utilizadas resultaram do cultivo de sementes de *Calendula officinalis*, variedade Bonina Dobrada (Isla Pak). As inflorescências colhidas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante (Marconi) e posteriormente moídas em moinho de facas (Marconi), obtendo-se a droga vegetal que foi utilizada no preparo dos extratos. Exemplares do material colhido foram herborizados e depositados no Herbário de Plantas Medicinais do

Laboratório de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, recebendo o número de catalogação HPMU 1326.

Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados conforme descrito no procedimento para percolação do Formulário de Fitoterápicos⁽⁷⁾. Foram utilizados dois tipos de solventes: 1. etanol:água (EtOH:H₂O 62:38 v/v); 2. propilenoglicol:água (PEG:H₂O 90:10 v/v). A percolação teve velocidade de gotejamento de 1 ml/min para cada 100 g de droga extraída, até que se conseguisse um volume de solução extrativa que obedecesse a proporção de 1 parte da droga para 5 partes do líquido extrator, o dobro da proporção preconizada para obtenção da tintura de Calêndula descrito no Formulário de Fitoterápicos⁽⁷⁾.

Análises físico-químicas

Determinação da densidade relativa

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição⁽⁹⁾, obteve-se o valor da densidade relativa pesando-se o picnômetro de 10 ml de volume, previamente calibrado, com água destilada e posteriormente com o extrato a ser testado, a 20° C. O valor da densidade relativa foi calculado pelo quociente entre a massa do extrato e a

massa de água contida no picnômetro. As análises de cada um dos extratos foram realizadas em triplicata.

Determinação do pH

Foi realizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição⁽⁹⁾ que prevê a aferição do aparelho com as leituras de soluções-tampão (pH = 4,0 e pH = 7,0). A determinação do pH foi realizada empregando aparelho de marca Orion modelo 420A, com amostras de 10 ml dos extratos. As análises para cada um dos extratos foram realizadas em triplicata e as leituras assinaladas não variaram mais do que $\pm 0,05$ de unidade.

Determinação do resíduo seco

A obtenção do resíduo seco dos extratos foi realizada tendo como base o descrito por Cardoso⁽¹⁷⁾, com amostras de 10 g dos extratos. Procedeu-se a evaporação, primeiramente em banho de água quente ou com auxílio do bico de bunsen, em cápsulas de porcelana com 30 ml de capacidade e previamente taradas. A dessecação foi concluída na estufa, a 105° C, durante 3 horas, deixando resfriar em dessecador com ácido sulfúrico e posterior pesagem. O valor do resíduo seco foi calculado em porcentagem. As análises para cada um dos extratos foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de flavonoides

A monografia de *C. officinalis* na Farmacopeia Brasileira 5ª edição⁽⁹⁾ descreve técnica espectrofotométrica com uso de cloreto de alumínio para quantificação dos flavonoides totais (estimados como hiperosídeos) tendo como amostras as drogas vegetais derivadas desta espécie. De Paula⁽¹⁸⁾ adaptou esta metodologia para determinar a quantidade de flavonoides presentes em soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. As quantificações no presente trabalho foram realizadas seguindo essa metodologia e utilizando espectrofotômetro SP-2000UV. As análises de cada um dos extratos foram realizadas em triplicata.

Perfil cromatográfico

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) para os extratos foram realizadas conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição⁽⁹⁾, utilizando sílica GF²⁵⁴ como fase estacionária. O sistema solvente utilizado foi ácido fórmico anidro: ácido acético glacial : água : acetato de etila, na proporção em volume de 11 : 11 : 27 : 100. Os marcadores foram rutina, hiperosídeo e ácido clorogênico solubilizados em metanol. O revelador utilizado foi irradiação da placa cromatográfica com luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm). As amostras para estas análises foram obtidas a partir da

solubilização em etanol : água (50:50 v/v) do material resultante do ensaio para determinação do resíduo seco.

Análise estatística

Os resultados das determinações descritas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de flavonoides totais foi inicialmente quantificado, por espectrofotometria, na droga vegetal utilizada para obtenção dos extratos, com descrito na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição⁽⁹⁾ e resultou em um valor em torno de 0,7% (m/m), calculados como hiperosídeos. Esse resultado está acima do mínimo exigido por esta Farmacopeia que é de 0,4% m/m.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da avaliação da densidade relativa, pH, resíduo seco e concentração de flavonoides para os dois tipos de extratos produzidos (hidroalcoólico e hidroglicólico). Com relação à densidade relativa os resultados revelaram que, para o extrato hidroalcoólico, o valor médio encontrado foi de 0,9299 g/ml. Para o extrato

hidroglicólico a densidade relativa foi de 1,0948 g/ml. Esses valores se mostraram estatisticamente diferentes, mostrando que eles podem ser utilizados para caracterizar cada tipo de extrato produzido a partir da droga vegetal de *C. officinalis*. O resíduo seco do extrato hidroalcoólico foi de 3,6% (m/m) e do extrato hidroglicólico foi de 2,4% (m/m). Observou-se novamente que houve diferenças estatísticas entre os tipos de extratos, pois o produzido com mistura hidroalcoólica teve possibilidade de extrair, em maior proporção, os diversos componentes químicos dessa espécie (fitocomplexo), quando comparado com aquele produzido com solvente hidroglicólico. Por outro lado, são estatisticamente iguais os valores relativos ao pH e a concentração de flavonoides entre os dois tipos de extratos. O pH de 5,80 foi apresentado pelo extrato hidroalcoólico e de 5,90 pelo hidroglicólico. O teor de flavonoides totais do extrato hidroalcoólico foi de 0,06% (m/m) e o hidroglicólico foi de 0,05% (m/m). Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Rodrigues et al.⁽¹⁹⁾ que também concluíram que extratos produzidos com etanol e propilenoglicol continham quantidades semelhantes de flavonoides.

Tabela 1. Valores médios obtidos para densidade relativa, pH, resíduo seco e teor de flavonoides em extratos de *Calendula officinalis*

Extrato	Densidade relativa (g/ml)	pH	Resíduo Seco (% m/m)	Teor de flavonoides totais (% m/m)
Hidroalcoólico (EtOH:H ₂ O 62:38)	0,9299 ^a (0,0045; 0,49)	5,80 ^c (0,0907; 1,56)	3,6 ^d (0,3637; 10,23)	0,06 ^f (0,0101; 16,87)
Hidroglicólico (PEG:H ₂ O 90:10)	1,0948 ^b (0,0019; 0,17)	5,90 ^c (0,0842; 1,43)	2,4 ^e (0,3600; 14,90)	0,05 ^f (0,0132; 26,59)

n = 18; p < 0,05 - ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, não diferem estatisticamente entre si. Teor de flavonoides totais estimados como Hiperosídeos. Números entre parênteses, abaixo das médias, referem-se respectivamente, ao desvio padrão e coeficiente de variação x 100

Com relação aos perfis cromatográficos, observou-se que no extrato hidroalcoólico foram evidenciados os marcadores utilizados (hiperosídeo Rf = 0,60/marrom ; ácido clorogênico Rf = 0,55/azul ; rutina Rf = 0,35/marrom), mas paradoxalmente, mantendo-se as mesmas condições de análise para o extrato hidroglicólico, somente o ácido clorogênico (Rf = 0,55/azul) foi identificado. Possivelmente isso pode ter ocorrido devido às diferenças entre os processos extrativos realizados e as condições cromatográficas utilizadas que eram específicas para análise de extratos hidroalcoólicos⁽⁹⁾. Desta forma, sugere-se que outras condições cromatográficas e marcadores sejam experimentados visando padronização da análise de extratos hidroglicólicos dessa espécie.

Comparando-se os resultados obtidos para os extratos de *C. officinalis* desse trabalho com aqueles disponíveis na literatura, nota-se que, em relação

ao pH, o extrato hidroalcoólico ficou com valor intermediário (5,80) àquele apresentado nos trabalhos de Nunes et al.⁽¹⁵⁾ (4,79) e Rodrigues et al.⁽¹⁹⁾ (6,04). Os extratos apresentaram pH ácido, o que determina a utilização de cuidados farmacotécnicos como a adição de adjuvantes adequados na formulação na tentativa de dar maior estabilidade a eles⁽²⁰⁾. O valor de densidade relativa presente nesse trabalho para o extrato hidroalcoólico (0,9299 g/ml) mostrou-se mais elevado, comparado com da tintura trabalhada por Nunes et al. (0,89 g/cm³) e por Rodrigues et al. (0,9024 g/ml). Quando se compara os valores de resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos produzidos por esses pesquisadores notam-se as maiores variações. Para Nunes et al. o resultado foi de 9,6% (m/m); para Rodrigues et al. foi de 4,7% (m/v). O resultado desse quesito, no presente trabalho, foi de 3,6% (m/m). Todos esses valores inconstantes podem ser parcialmente

explicados por detalhes nas técnicas desenvolvidas para obtenção dos extratos. O presente trabalho e de Nunes et al.⁽¹⁵⁾ utilizaram como líquido extrator a mistura hidroalcoólica 62:38 (v/v), porém o primeiro utilizou a proporção de 1 parte da droga para 5 partes de líquido extrator e a percolação no processo de obtenção dos extratos e o segundo, a maceração. Rodrigues et al.⁽¹⁹⁾ obtiveram o extrato analisado com mistura hidroalcoólica de 70:30 (v/v), utilizando a proporção de 1 parte de droga vegetal para 20 partes de líquido extrator e utilizando refluxo por 20 minutos.

A atual legislação referente às bulas dos fitoterápicos⁽⁵⁾ preconiza que preparações líquidas a base de *C. officinalis* devem conter 0,8 a 1,0 mg de flavonoides totais expressos em hiperosídeos por mL da forma farmacêutica, ou seja 0,08 a 0,1% (m/v) de flavonoides. Admitindo-se que os extratos produzidos para esse trabalho possam ser incluídos nessa condição, percebe-se que todos teriam concentrações de flavonoides abaixo do mínimo exigido pela legislação (0,06% para extrato hidroalcoólico e 0,05% para extrato hidroglicólico), mesmo sendo eles produzidos com o dobro de droga vegetal que está descrito no Formulário de Fitoterápicos⁽⁷⁾ para produção das tinturas. Entende-se deste modo, que os procedimentos para preparo desses

extratos devam ser otimizados para que sejam alcançados os índices preconizados pela legislação.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, para a espécie *Calendula officinalis* L, diferenças significativas foram notadas para densidade relativa e resíduo seco entre os extratos hidroalcoólico e hidroglicólico, sendo que o primeiro extrato tem em sua composição, maior quantidade dos componentes extraídos do vegetal (resíduo seco), no entanto, nos dois tipos de extratos, o pH e teor de flavonoides se mostraram estatisticamente iguais, mostrando que os tipos de solventes utilizados na extração não influenciaram as concentrações de flavonoides nos extratos. Portanto, a mistura hidroglicólica é mais seletiva para extrair a categoria do marcador estudado, enquanto a mistura hidroalcoólica é aquela que consegue extrair mais completamente o fitocomplexo presente na droga vegetal de *C. officinalis*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP, ao CNPq e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro que nos concederam para a realização desse projeto.

REFERÊNCIAS

1. Leite JPV, *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Editora Atheneu. 2009.328p.
2. Fonseca P, Librandi APL. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 2008;44:271-277.
3. Alvarenga FCR, Garcia EF, Bastos EMAF, Grandi TSM, Duarte MGR. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009;19:442-448.
4. Borella JC, Carvalho DMA. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. *Rev. Bras. Farm.* 2011;92:11-16.
5. Brasil. Ministério da Saúde; ANVISA. Resolução RDC 95/2008 de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. 12 de dezembro de 2008. [cited 2011 dez 23] Disponível em URL: www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm.
6. Brasil. Ministério da Saúde; ANVISA. Resolução RDC 14/2010 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União 5 de abril de 2010. [cited 2011 ago 22] Disponível em URL: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>.
7. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [internet] 2010. [cited 2011 dez 23]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf.
8. Brasil. RENISUS – Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. [citado 2011 ago 22] Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.

9. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Volume 1 e 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [internet] 2010 [citado 2011 dez 23] . Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm.
10. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase. III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:1447-53.
11. Silva EJR, Aguiar FJS, Gonçalves ES, Sousa IMV, Dimech GS, Fraga MCCA, Coelho MCOC, Wanderley AG. Avaliação do tratamento subcrônico com extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. *Rev. Bras. Farmacog.* 2005;15:88-93.
12. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Antiinflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J. Nat. Prod.* 2006;69:1692-1696.
13. Gazin, ZC, Resende CM, Fraga SR, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAG. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* 2008;44:391-395.
14. Ardisson L, Godoy JS, Ferreira LAM, Stehmann, JR, Brandão MGL. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (Barbatimão). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2002;12:27-34.
15. Nunes KM, Barbosa WLR, Ozela EF, Silva Jr JOC. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. *Lat. Am. J. Pharm.* 2009;28:344-350.
16. Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, Carvalho DMA. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.* 2010;31:193-197.
17. Cardoso CMZ. *Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral*. São Paulo: Pharmabooks ed., 2009,148p.

Borella, J. C. de Carvalho, D. M. A. Teixeira, J. C. L. Ribeiro, N. S. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. IX (2), 25 - 36, 2012.

18. De Paula IC. *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae – marcela.* [dissertation] Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1996.194p.

19. Rodrigues PO, Gonçalves TC, Silva WB. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 2003;23:27-31.

20. Maciel RL, Moreira Campos LM, Silva BC, Brandão MGL. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica Montana*. *Rev. Bras. Farmacog.* 2006;16:99-104.