

## Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná

Zilda Cristiani Gazim<sup>1</sup>; Gilberto Alves Ferreira<sup>1</sup>; Claudia Moraes Rezende<sup>2</sup>; Celso Vataru Nakamura<sup>2</sup>; Benedito Prado Dias Filho<sup>3</sup>; Diógenes Aparicio Garcia Cortez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UNIPAR, Praça Mascarenha de Moraes s/n, 87500-000 Umuarama-PR; <sup>2</sup>Instituto de Química, UFRJ, Centro de Tecnologia, Bloco A, 21945-970 Rio de Janeiro-RJ; <sup>3</sup>Depto. de Análises Clínicas; <sup>3</sup>Depto. de Farmácia e Farmacologia da UEM, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá-PR; E-mail: dagcortez@uem.br

### RESUMO

A *Calendula officinalis* L., pertence à família Asteraceae, é originária da Europa e está aclimatada na região Sul do Brasil, onde vem crescendo o seu cultivo comercial para fins farmacêuticos e cosméticos. Suas inúmeras propriedades terapêuticas entre as quais antiinflamatória, cicatrizante e anti-séptica, justificam a grande procura desta planta pela população. O presente trabalho compara a composição química da fração volátil da cultura de calêndula aclimatada na região Noroeste do Paraná, com os dados da literatura da cultura na França. As substâncias químicas majoritárias identificadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), nas duas culturas, foram sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois; d-cadineno (22,53%) e a-cadinol (20,40%) para a cultura de calêndula produzida na região Noroeste do Paraná, Brasil, e d-cadineno (12,10%) e a-cadinol (25,50%) distinto do registrado para a cultura de calêndula produzida na região de Massif Central, França. Adicionalmente, para garantir a qualidade da planta na comercialização, foram realizadas análises físico-químicas (perda por secagem = 85,0% e perda por dessecação = 11,6%).

**Palavras-chave:** *Calendula officinalis*, cultivo, óleo essencial, composição química.

### ABSTRACT

#### Chemical compounds of the *Calendula officinalis* volatile fraction produced in the Paraná State, Brazil

*Calendula officinalis* L., belongs to the Asteraceae family from Europe and is acclimatized in the south region of Brazil where its commercial cultivation has been increasing for pharmaceutical and cosmetic purposes. Its several therapeutic properties (anti-inflammatory, healing, antiseptic) justify the great demand for this plant by the population. The present study compares the chemical composition of the volatile fraction of two cultivations of calendula, one from Massif Central, France, and the other acclimatized in the Northeast region of Paraná State, Brazil. Most compounds identified by Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in both cultivations included the sesquiterpenes hydrocarbons and alcohols; d-cadinene (22.53%) and á-cadinol (20.40%) for the cultivation of the calendula produced in the Northeast region of Paraná State, and d-cadinene (12.10%) and a-cadinol(25.50%) for the cultivation of the calendula produced in Massif Central, France. In addition, physical-chemical analyses (determination of water at room temperature = 85.0% and loss on drying = 11.6%), were carried out in order to assure the quality of the plant for commercialization.

**Keywords:** *Calendula officinalis*, cultivation, essential oil, chemical composition.

(Recebido para publicação em 15 de março de 2006; aceito em 26 fevereiro de 2007)

A *Calendula officinalis* L. pertence à família Asteraceae, é uma planta herbácea, nativa em toda região do Mediterrâneo e cultivada em toda a Europa, onde floresce quase o ano todo, sendo comum encontrá-la em jardins como planta ornamental (Cromack & Smith, 1996). Temperaturas noturnas muito elevadas diminuem o tamanho das flores (Correa Júnior *et al.*, 1991). É muito sensível à falta de água nos períodos de estiagem, o que acarreta um comprometimento da sua produtividade (Silva Júnior, 1997); daí a necessidade de sistemas de irrigação na área de plantio.

A *calendula* se desenvolve melhor e é mais produtiva quando cultivada no inverno, sendo inclusive resistente a geadas leves (Montanari Júnior, 2000). Apresenta como principais constituin-

tes químicos saponinas triterpênicas (Alonso, 1998); flavonóides (Pietta *et al.*, 1992, 1994); hidroxycumarinas (PDR, 2000); carotenóides (Stevenson, 1961; Alonso, 1998); triterpenos pentacíclicos trihidroxialcoois (Wilkomirski, 1985); taninos; poliacetilenos; esteróis; sesquiterpenos glicosídeo (PDR, 2000); e um óleo volátil (0,1-0,2%) muito abundante em sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois (Chalchat *et al.*, 1991; PDR, 2000; Radulescu *et al.*, 2000; Crabas *et al.*, 2003).

É extensamente utilizada pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia e pela população em geral por causa das suas atividades antiinflamatória (Della Loggia *et al.*, 1994) e antiedematosa (Hamburger *et*

*al.*, 2003). Observou-se que o extrato de *C. officinalis* induziu a formação de vasos sanguíneos. Esse resultado foi muito importante no processo de granulização (PDR, 2000; Schulz *et al.*, 2002). Outras atividades farmacológicas tem sido reportadas tais como: imunomodulatória (Amirghofran *et al.*, 2000) por estimulação na granulocitose; antitumoral (Elias *et al.*, 1990); antimutagênica e antiviral (Kalvathev *et al.*, 1997; PDR, 2000); antimicrobiana (Dumenil *et al.*, 1980; Gracza, 1987; Hsieh *et al.*, 2001). Outras atividades biológicas tais como moluscicida (Helaly *et al.*, 1999); o óleo essencial como nematocida (Perez *et al.*, 2003); genotóxica (Ramos *et al.*, 1998); larvicida (El-Shazly & Hussein, 2004); e antiplasmódica (Boyom *et al.*, 2003).

Na perfumaria, é utilizado na composição de vários perfumes. O aroma característico das flores de calêndula é associado a presença dos sesquiterpenos na fração volátil, dentre esses o d-cadineno que confere as notas verdes, doces e refrescantes; e o a-cadinol responsável pelas notas amadeiradas (Reznicek & Zitterl-Eglseer, 2003).

O objetivo deste trabalho foi comparar a composição química do óleo essencial extraído das folhas da *C. officinalis* cultivada na região Noroeste do Paraná comparado com os dados da composição química do óleo essencial extraído desta planta na região de Massif Central França.

## MATERIAL E MÉTODOS

A espécie foi identificada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ezilda Jacomassi da Universidade Paranaense, e, uma exsiccata dessa espécie foi depositada no Herbário dessa Universidade.

O solo da amostra 1, usado no presente experimento apresentou as características químicas: pH em  $\text{CaCl}_2=4,8$ ; pH em  $\text{H}_2\text{O}=5,7$ ;  $\text{Al}^{+++}=0,00 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^++\text{Al}^{+++}=2,94 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{++}+\text{Mg}^{++}=2,84 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{++}=1,82 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+=0,14 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{P}=19 \text{ mg dm}^{-3}$  e  $\text{C}=6,59 \text{ mg dm}^{-3}$ . Na amostra 2 as características químicas foram: pH em  $\text{CaCl}_2=5,6$ ; pH em  $\text{H}_2\text{O}=6,5$ ;  $\text{Al}^{+++}=0,00 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H}^++\text{Al}^{+++}=2,54 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{++}+\text{Mg}^{++}=4,08 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{++}=3,18 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+=0,71 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{P}=49 \text{ mg dm}^{-3}$  e  $\text{C}=7,75 \text{ mg dm}^{-3}$ .

A implantação da cultura da *C. officinalis* foi realizado em um terreno de  $34,5 \text{ m}^2$  localizado no Horto Medicinal da Universidade Paranaense-UNIPAR, em Umuarama, região Noroeste do Paraná, nas coordenadas  $\text{S}23^\circ 46,225'$  e  $\text{W}53^\circ 16,730'$  e altitude de 391 m.

As amostras de solo para análise foram coletadas em duas partes do terreno, a uma profundidade de 20 cm em diferentes pontos, resultando em duas amostras compostas (amostras 1 e 2). A análise do solo foi realizada no laboratório da UEM. A calagem foi realizada conforme resultado da análise química do solo. Os valores de pH e as concentrações dos elementos químicos encontrados no solo estão nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Substâncias químicas identificadas na fração volátil de *Calendula officinalis* (Chemical substances identified in the volatile fraction of *Calendula officinalis*).

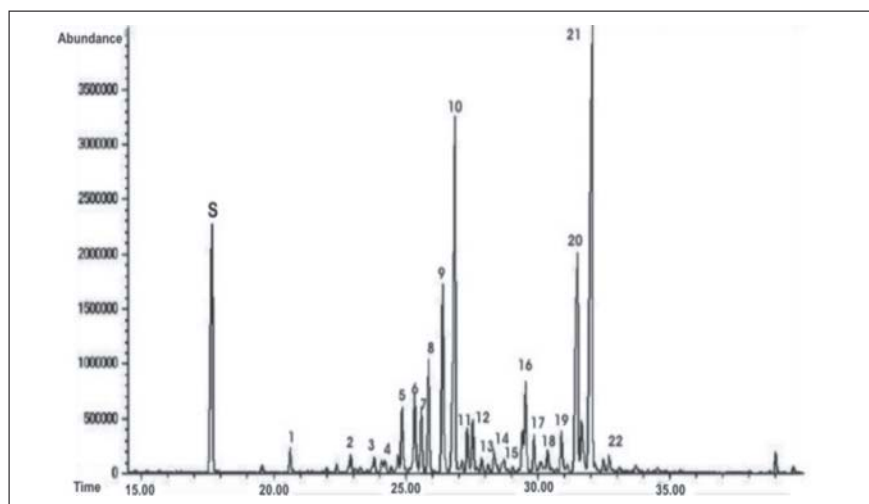
Nº	Substância	Area %	IRR calc.	IRR lit.
1	$\alpha$ -copaeno	0,96	1365	1376
2	$\alpha$ -ionona	1,54	1421	1426
3	$\alpha$ -humuleno	1,18	1444	1454
4	Geranilacetona	1,61	1452	1453
5	$\gamma$ -muuroloeno	2,27	1472	1477
6	$\beta$ -ionona	3,25	1484	1485
7	Ledeno	2,30	1488	1493
8	$\alpha$ -muuroloeno	5,62	1497	1499
9	$\gamma$ -cadineno	8,93	1511	1513
10	$\delta$ -cadineno	22,53	1522	1524
11	$\alpha$ -cadineno	0,92	1533	1538
12	$\alpha$ -calacoreno	2,32	1539	1542
13	Óxido de cariofileno	0,52	1547	1581
14	Copaen-4- -ol	0,64	1566	1584
15	b-oploopenona	1,73	1568	1606
16	Viridiflorol	2,25	1585	1590
17	Ledol	1,30	1595	1565
18	1,10-di-epi-Cubenol	0,87	1608	1614
19	1-epi-cubenol	1,60	1621	1627
20	epi $\alpha$ -muurolol	12,87	1639	1641
21	$\alpha$ -cadinol	20,40	1654	1653
22	Cadaleno	0,76	1671	1674

**IRR calc.** Índice de retenção relativo calculado em coluna capilar DB5 (5% fenilmetilsiloxane). **IRR lit.** Índice de retenção relativo encontrado na literatura em coluna capilar DB5. **EM**- Comparação com Espectros de Massas da espectroteca Wiley 275. **Lit.**- Comparação dos Índices de Retenção e/ou dos Espectros de Massas com a Literatura (Adams, 1995) (IRRcalc= Relative retention index, obtained in a capilar column DB5 (5% of phenylmethylsiloxane) IRRlit= Relative retention index obtained in a capilar column DB5. EM= Comparison to mass spectra from the Wiley 275 library. Lit= Comparison of the retention indexes and/or from the mass spectra obtained from literature (Adams, 1995)).

O plantio ocorreu em 30/04/04 (início do outono), e coincidiu com temperaturas mais amenas. As mudas foram obtidas a partir de sementes da variedade Orange Guitana de cor cinza (Fiallo *et al.*, 2000) e foram obtidas da empresa Sementes Semex. O plantio foi realizado em sistema de semeadura direta no campo em linha (Montanari Júnior, 2000) e em canteiros, que é recomendado para as espécies de ciclo curto e porte pequeno a médio, como a *C. officinalis* (Correa Júnior *et al.*, 1991). As covas foram abertas nos canteiros com espaçamento entre linhas de 0,40 m e na linha de 0,30 m, sendo plantadas três sementes/cova com profundidade de 2 cm (Montanari Júnior, 2000). Foi utilizado adubo orgânico (esterco de gado curtido) na dosagem de  $2 \text{ kg/m}^2$ . O calcário e o adubo orgânico foram misturados ao solo em uma profundidade de 20 cm, permanecendo por uma semana descansando antes de iniciar o

plântio. Por se tratar de uma cultura totalmente orgânica, foi utilizado para o combate de pragas, macerado de fumo (10 cm de fumo de corda em um litro de água) pulverizado sobre as plantas. A aplicação foi realizada quatro vezes até o controle total das pragas (Correa Júnior *et al.*, 1991).

A coleta foi iniciada em 20/07/04, três meses após o plantio, quando as flores estavam no seu desenvolvimento máximo com indícios de polinização (Oliveira *et al.*, 1998). A coleta das flores foi diariamente no período da manhã (7 h 30 min) e ao entardecer (18 h) (Simões *et al.*, 2001). As coletas não foram realizadas em dias chuvosos e tomou-se cuidado para esperar que todo o orvalho evaporasse antes da coleta. As flores foram colhidas manualmente, com o pedúnculo o mais curto possível (Montanari Júnior, 2000).



**Figura 1:** Cromatograma da fração volátil obtida por arraste a vapor da *C. officinalis* cultivada na região Noroeste do Paraná, Brasil (chromatogram of the volatile fraction, obtained through steam distillation from *C. officinalis* cultivated in the northeastern region of Parana State).

A secagem das flores foi realizada em esteiras à sombra e em temperatura ambiente (25°C). As flores foram acondicionadas em camadas finas e durante a secagem não foram revolvidas por um período de 10 dias. Nesse intervalo de secagem, foram determinados a perda de água por secagem e perda de água por dessecação.

A perda por secagem foi determinada em cinco amostras com cerca de 27 g das flores frescas, colocadas para secar em temperatura ambiente (25°C) com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, por meio da média de cinco determinações (Farmacopéia Brasileira, 1988).

A perda por dessecação foi determinada em 2 g das flores secas, em pesa-filtro de vidro previamente dessecado e pesado nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Os pesa-filtros foram colocados na estufa por 2 horas em 105°C, após foi resfriado em dessecador e pesado. A operação foi repetida até peso constante. Os valores representam a média de 5 determinações e são expressos em % (p/p) (Farmacopéia Brasileira, 1988).

A técnica utilizada para a extração da fração volátil da *C. officinalis* foi destilação por arraste a vapor com coabação em aparelho tipo Clevenger

modificado (Chalchat *et al.*, 1991; Radulescu *et al.*, 2000). As lígulas secas, foram separadas do receptáculo floral, pesadas 50 g de planta e adicionados 500 ml de água destilada. Em seguida, foi procedida a análise. A análise cromatográfica foi realizada no Instituto de Química da UFRR. A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *C. officinalis* foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de massas computadorizado CGAR-EM. Para a análise cromatográfica, foi utilizado um cromatógrafo Agilent 6890 Seies II acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5973. Condições do detector: ionização por impacto de elétrons 70eV, interface 280°C, linha de transferência 280°C e fonte iônica 230°C. Condições de operação no cromatógrafo: injetor no modo “splitless” (tempo de válvula 0,5 min) em 250°C; gás de arraste He com fluxo de 1 mL/min; programação de aquecimento do forno cromatográfico: T<sub>inicial</sub> 35°C a 60°C (1°C min<sup>-1</sup>), 200°C (8°C min<sup>-1</sup>), e 280°C (15°C min<sup>-1</sup>), permanecendo por 5 min. Coluna capilar DB-5 (J&W):30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Foi adicionado como padrão interno o tridecano (S) numa concentração de 5%. As estruturas foram determinadas com base na análise e na comparação de seus espectros de massas com a espectroteca Wiley 275, bem como pela comparação de seus índices de retenção com a literatura (Adams, 1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A perda de água por secagem variou de 27,010 a 27,310 g (média de 27,105 g) para as plantas frescas e de 4,023 g a 4,105 g (média de 4,059 g para as plantas secas). A determinação da perda por dessecação das flores de *C. officinalis* variou de 19,8904 a 25,2429 g (média de 22,087 g ou 11,6%). Os resultados encontrados nos testes de perda de água por secagem e de perda de água por dessecação mostraram que a secagem das flores está de acordo com a literatura, pois o teor de umidade nas flores frescas varia entre 60% a 95%, e o teor de umidade permitido nas flores secas deve permanecer entre 8 a 15% (Oliveira *et al.*, 1998). Os cuidados durante as etapas de secagem do material vegetal, devem ser considerados, pois o excesso de água remanescente no vegetal, pode favorecer a proliferação microbiana e alterar os constituintes químicos, favorecendo a ação de enzimas autolíticas presentes no vegetal e, dessa forma, alterar substâncias que possam apresentar alguma atividade biológica.

Por meio da análise cromatográfica da fração volátil da cultura de *C. officinalis* produzida na região Noroeste do Paraná, foram identificadas 22 substâncias químicas (Figura 1), sendo essas pertencentes à classe dos sesquiterpenos e classificadas como sesquiterpenos hidrocarbonetos e álcoois.

Vinte e dois constituintes voláteis da *C. officinalis*, foram indetificados (Tabela 1) com a área que estes ocupam no cromatograma e o cálculo do Índice de Retenção Relativo (IRR). Observa-se a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos (1 a 13 e 22) e álcoois (14 a 21). Dentre estes, destacam-se,  $\delta$ -cadineno (22,53%) e  $\alpha$ -cadinol (20,40%) como constituintes majoritários presentes na fração volátil da *C. officinalis*.

A calêndula utilizada no experimento realizado por Chalchat *et al.* (1991) foi cultivada na região de Massif Central, França. A técnica de extração da fração volátil foi por destilação por arraste a vapor. As substâncias químicas majoritárias identificadas por CG/EM foram  $\delta$ -cadineno (12,10%) e  $\alpha$ -cadinol (25,50%).



A *Calendula officinalis* cultivada na região Noroeste do Paraná, onde foi aclimatada, mostrou possuir semelhanças com a mesma produzida em seu *habitat* natural no que diz respeito à composição química da fração volátil quando comparada com dados da literatura obtido pela técnica de arraste a vapor. Conclui-se que oferecendo à planta condições ideais de plantio, de coleta, de secagem e de extração, é possível obter fração volátil com constituintes químicos semelhantes àqueles obtidos em seu *habitat* natural.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS RP. 1995. *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy*. Illinois: Allured Publishing Corporation. 467 p.
- ALONSO JR. 1998. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones, p. 327-330.
- AMIRGHOFAN Z; AZADBAKHT M; KARIMI MH. 2000. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 167-172.
- BOYOM FF; NGOUANA V; ZOLLO PHA; MENUTC; BESSIERE JM; GUT J;
- CHALCHAT JC; GARRY RPH; MICHET A. 1991. Chemical Composition of Essential Oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour and Fragrance Journal*, 6: 189-192.
- CORREA JÚNIOR C; MING LC; SCHEFFER MC. 1991. *Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas*. Emater, 162 p.
- CRABAS N; MARONGIU B; PIRAS A; PIVETTA T; PORCEDDA S. 2003. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula alis* L. And *Aloysia triphylla* (L'Her). Britton by supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 350-355.
- CROMACK HTH; SMITH JM. 1996. *Calendula officinalis*- production potential and crop agronomy in southern England. *Journal Industrial Crops and Products*, 7: 223-229.
- DELLA LOGGIA R; TUBARO A; SOSA S; BECKER H; SAAR ST; ISAAC D. 1994. The role of triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta medica*, 60: 516-520.
- DUMENIL G; CHEMLI R; BALANSAR G; GUIRAUD H; LALLEMAND M. 1980. Étude des propriétés antibactériennes des fleurs de Souci *Calendula officinalis* L. et des teintures mères homéopathiques de *C. officinalis* L. et *C. arvensis* L. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 38 : 493-494.
- ELIAS R; DE MÉO M; OLLIVIER VE; LAGET M; BALANSARD G; DUMENIL G. 1990. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L., and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*, 5: 327-331.
- EL-SHAZLY AM; HUSSEIN KT. 2004. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leucocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 665-674.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FIALLO VRF; HÉRNANDEZ CLM; REYES M; JORRIN GM; BORREGO JCA; FERRADÁ CAR. 2000. Comparación entre 2 cultivares de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5: 14-16.
- GRACZA L. 1987. Oxygen-Containing Terpene Derivatives from *Calendula officinalis*. *Planta Medica*, 53: 227.
- HAMBURGER M; ADLER S; BAUMANN D; FÖRG A; WEINREICH B. 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia*, 74: 328-338.
- HELALY FM; AHMED AA; EL-GHAFFAR MAA. 1999. Natural rubber base matrix containing *Calendula officinalis* plant as a source of molluscicidal saponin. *Journal of Controlled Release*, 57: 1-7.
- HSIEH PC; MAU JL; HUANG SH. 2001. Antimicrobial effects of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, 18: 35-43.
- KALVATCHEV Z; WALDER R; GARZARO D. 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedical Pharmacotherapy*, 51: 176-180.
- MONTANARI JÚNIOR I. 2000. Aspéctos do Cultivo Comercial de Calêndula. *Revista Agroecologica Hoje*, II: 24-25.
- OLIVEIRA F; AKISUE G; AKISUE MK. 1998. *Farmacognosia*. 1.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. p. 5-111.
- PDR FOR HERBAL MEDICINE. 2000. 2nd ed. New Jersey: Montvale, p. 497-99.
- PEREZ MP; NAVAS-CORTES JA; PASCUAL-VILLALOBOS MJ; CASTILLO P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology*, 52: 395-401.
- PIETTAP; BRUNO A; MAURIP; RAVAA. 1992. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography*, 593: 165-170.
- PIETTA P; FACINO RM; CARINI M; MAURI P. 1994. Thermospray liquid chromatography-mass spectrometry of flavonol glycosides from medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 661: 121-126.
- RADULESCU V; DONEANU C; LOLOIU T. 2000. GC Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. *Revue Roumaine de Chimie*, 45: 271-275.
- RAMOS A; EDREIRA A; VIZOSO A; BETANCOURT J; LÓPEZ M; DÉCALO M. 1988. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 61: 49-55.
- REZNICEK G; ZITTERL-EGLESEER K. 2003. Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 71: 121-128.
- SCHULS V; HANSEL R; TYLER VE. 2002. *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. São Paulo: Ed. Manole. 316 p.
- SILVA JÚNIOR AA. 1997. *Plantas medicinais e Aromáticas* CD-ROM: Ed. Epagri S.A.
- SIMÕES CMO; SCHENKEL EP; GOSMANN G; MELLO JCP; MENTZ LA; PETROWICK PR. 2001. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, Porto Alegre: UFRGS. 821 p.
- STEVENSON R. 1961. Some constituents of *Calendula officinalis*. *Helvetica Chimica Acta*, 31: 1815.
- WILKOMIRSKI, B. 1985. Pentacyclic triterpene triols from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry*, 24: 3066-3067.