



## Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial

Ana P.T.B. de SOUZA; Samyra T. BARNI; René A. FERREIRA & Angélica G. COUTO\*

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).  
Rua Uruguai, n° 458, Bloco 17, CEP 88302-202, Itajaí – SC, Brasil

**RESUMO.** O trabalho teve por objetivo desenvolver soluções extrativas a partir das flores de *Calendula officinalis* L., pelo processo de maceração (MAC) e de turbo-extração (TURB), empregando planejamento fatorial  $3^2$  (dois fatores e três níveis), para avaliar a influência do tempo de extração (MAC = 5, 10 e 15 dias; TURB = 5, 15 e 25 min) e da relação planta:solvente (2,5, 7,5 e 12,5%, m/V) sobre o teor de flavonóides totais e resíduo seco nas soluções extrativas. Para o processo de maceração, a relação planta: solvente de 12,5% e o tempo de 15 dias resultaram nas melhores condições para alcançar um maior teor de flavonóides totais, em relação à turbo-extração que obteve o mesmo desempenho em 5 min. Para ambos os processos, o resíduo seco foi proporcional à relação planta:solvente.

**SUMMARY.** “Technological Development of Hydroalcoholic Extractive Solutions from *Calendula officinalis* L. Flowers by using Factorial Design”. The work aimed at the development of extractive solutions from the flowers of *Calendula officinalis*, through maceration (MAC) and turbo-extraction (TURB) processes, employing the  $3^2$  (two factors and three levels) factorial design, in order to evaluate the influence of the time (MAC = 5, 10 and 15 days; TURB = 5, 15 and 25 min) and of the plant: solvent ratio (2.5, 7.5 and 12.5%, w/v) on the flavonoid content and the dry residue yields in the extractive solutions. For the maceration process, the 12.5% (w/v) plant: solvent ratio over 15 days were the best conditions to achieve the highest flavonoid content, in the turbo-extraction process the same performance was achieved in 5 min. For both processes the dry residue was proportional to the plant: solvent ratio.

### INTRODUÇÃO

A *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) é uma planta exótica, originária do Mediterrâneo, popularmente conhecida no Brasil, como “maravilha”, “bem-me-quer”, “margarida dourada” e calêndula. Os extratos das flores são tradicionalmente utilizados em preparações de uso tópico, para o tratamento de eritemas solares, queimaduras e dermatoses secas, como antiinflamatório e cicatrizante <sup>1-3</sup>, cujas propriedades tem sido comprovadas experimentalmente <sup>4-7</sup> e atribuídas em grande parte aos flavonóides <sup>2,8,9</sup>.

Os fitoterápicos resultam das etapas do processamento da matéria-prima vegetal, sendo que

a qualidade do medicamento é o resultado da qualidade de cada etapa a começar pela origem da planta e cuidados pós-colheita até a sua transformação em matéria-prima farmacêutica, que por sua vez, depende da aceitação de critérios de qualidade bem estabelecidos. Para tanto, a Farmacopéia Brasileira estabelece monografias para plantas medicinais, dentre elas, a da calêndula, incluída em 2001 <sup>10</sup>.

Analisando os critérios estabelecidos pela legislação para o registro de produtos fitoterápicos no Brasil, desde 1995, com a Portaria n° 6 <sup>11</sup> e mais recentemente pela RDC 48 de 2004 <sup>12</sup>, e pela Política Nacional de Plantas Medicinais e

**PALAVRAS CHAVE:** *Calendula officinalis*, Flavonóides, Maceração, Turbo-extração.

**KEY WORDS:** *Calendula officinalis*, Flavonoids, Maceration, Turbo-extraction.

\* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: angelica@univali.br

Fitoterápicos <sup>13</sup>, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de se estabelecer critérios de aceitação da qualidade, para cada etapa do processo produtivo, visando o desenvolvimento sustentável e econômico.

Portanto, o presente trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas, a partir de flores cultivadas, visando otimizar o teor de flavonóides totais, selecionados como marcadores químicos, e sólidos totais extraídos (resíduo seco), para dois processos extrativos: a maceração e a turbo-extração, utilizando o planejamento fatorial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram utilizadas flores da *Calendula officinalis*, cultivadas no município de Rio do Sul (SC), plantadas nos meses de abril a junho e colhidas de maio a julho de 2006, manualmente, sempre no período da manhã. *C. officinalis* foi cultivada em caixotes, providos de luz solar abundante e abastecidos por uma esterqueira orgânica, composta por restos vegetais, lenhosos e alimentícios.

### Análise microscópica

Para análise dos caracteres microscópicos, as estruturas do capítulo floral da *C. officinalis* foram visualizadas, *in natura* ou após tratamentos de clareamento e coloração, fotografadas do microscópio estereoscópico (Leica Zoom, 2000), e microscópio óptico (Leica, CME) nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes, e comparadas com a sua descrição farmacopeica <sup>10</sup>. Para a visualização das gotas de óleo, uma parte das flores foi hidratada, imersa em uma solução de hipoclorito de sódio (2%) para clareamento, e submetidas à coloração com o corante Sudam III. Após a seleção e/ou tratamento, cada estrutura foi colocada sobre uma lâmina e coberta por uma lâmina, com a exceção dos frutos secos.

### Matéria-prima vegetal

Após a colheita, o material vegetal foi tratado manualmente por meio da seleção das flores, eliminação de material estranho e secagem à temperatura ambiente ( $27 \pm 2$  °C), ao abrigo da luz solar. Realizou-se um acompanhamento gravimétrico do processo de secagem das flores no decorrer do tempo (dias), expressando-se a perda por secagem em g % para cada colheita. Após a estabilização da perda por secagem, as flores foram armazenadas em envelopes de papel pardo. Ao final de todos os processos, as

flores secas, foram submetidas ao processo de moagem em moinho de martelos (Marconi, MA 600), com abertura de malha de saída de 3 mm. Ao final, as flores procedentes de cada colheita foram misturadas, representando um único lote de matéria-prima vegetal.

### Caracterização da matéria-prima vegetal

#### Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado por balança de secagem por infra-vermelho (Metler Toledo, LJ 16), a partir de cerca de 300 mg das flores secas e moídas. Os resultados expressam a média de 11 determinações.

#### Análise granulométrica

Cerca de 50,0 g da amostra foram submetidos à passagem por tamises, previamente tarados, com aberturas de malha de 0,710, 0,500, 0,300, 0,212, 0,150 e 0,075 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 min em tamisador (Bertel). Em seguida, as frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas. Para a análise dos dados foi empregado o cálculo do diâmetro médio de partículas e o histograma de distribuição granulométrica <sup>14</sup>. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1 g (exatamente pesado) da amostra, foi extraído com 100,0 mL de água, sob decocção, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi reconstituído com água e filtrado, desprezando-se os primeiros 20 mL. Em cadinhos de porcelana, previamente tarados, 20,0 g do filtrado foram evaporados à secura, e levados à estufa a  $100 \pm 5$  °C, para sua dessecação até peso constante. Os resultados estão expressos pela média de três determinações, com três repetições, segundo a equação [1] <sup>15</sup>.

$$TE = \frac{g \cdot FD \cdot 100}{m - (m \cdot \frac{pd}{100})} \quad [1]$$

onde, *TE* = teor de extrativos (%; m/m); *g* = massa (g) do resíduo seco; *FD* = fator de diluição (5); *m* = massa (g) da amostra e *pd* = perda por dessecação da amostra (%; m/m).

#### Determinação do teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais foi determinado em espectrofotômetro (Schimadzu, UVPC 1601), conforme descrito na sua monografia farmacopeica <sup>10</sup>. Os resultados foram expressos em percentual de flavonóides totais, calculados como

hiperosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), pela média de três determinações, utilizando a equação [2].

$$TFT = \frac{A \cdot FD}{e \cdot \left[ m - \left( m \cdot \frac{pd}{100} \right) \right]} \quad [2]$$

onde, *TFT* = teor de flavonóides totais (m/m); *A* = absorvância lida (AUFS); *FD* = fator de diluição (62500); *m* = massa da amostra (g); *pd* = perda por dessecação da amostra (%; m/m); *e* =  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ , absorção específica do complexo AlCl<sub>3</sub>-hiperosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>).

### Desenvolvimento das soluções extrativas

Para avaliar a influência dos fatores específicos sobre as propriedades da solução extrativa foi realizado delineamento fatorial <sup>16</sup> do tipo 3<sup>2</sup> onde foram estudados 2 fatores (fator A: tempo de extração; fator B: relação planta:solvente) em 3 níveis para cada método extrativo (fator B: 2,5, 7,5 e 12,5: 100). Foram avaliados os métodos de extração por maceração (fator A: 5, 10 e 15 dias) e turbo-extração (5, 15 e 25 min). Os experimentos foram ordenados ao acaso e sem reposição. A influência dos fatores foi avaliada através do resíduo seco e teor de flavonóides totais.

### Caracterização das soluções extrativas de *Calendula officinalis* L.

#### Determinação do pH<sup>17</sup>

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro (Digimed, DM 20) calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. O resultado foi calculado pela média de cinco determinações.

#### Determinação do resíduo seco<sup>18</sup>

Em pesa-filtros, previamente tarados, cerca de 20,0 g (exatamente pesados) da amostra foram evaporados à secura em banho-maria, e levados à estufa a 100 ± 5 °C, para a sua dessecação até peso constante. Os resultados foram expressos em percentagem de resíduo seco (m/m) calculados através da média de quatro determinações, com três repetições.

#### Determinação do teor de flavonóides totais<sup>19</sup>

O teor de flavonóides totais foi determinado a partir de cerca de 15 g (exatamente pesados) da amostra. As etapas posteriores seguiram conforme descrito para a matéria-prima vegetal <sup>10</sup>. Os resultados foram expressos em percentual de flavonóides totais, calculados como hiperosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>), pela média de três determinações, através da equação [3].

$$TFT = \frac{A \cdot FD}{e \cdot m} \quad [3]$$

onde *TFT* = teor de flavonóides totais (m/m); *A* = absorvância lida (AUFS); *FD* = fator de diluição (312,5); *m* = massa da solução extrativa (g); *e* =  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ , absorção específica do complexo AlCl<sub>3</sub>-hiperosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>).

### Análise cromatográfica em camada delgada<sup>10</sup>

Foram empregadas as condições descritas na sua monografia <sup>10</sup>: ácido fórmico anidro; ácido acético glacial; água; acetato de etila (11:11:27:100, V:V) como eluente, cromatoplasca de gel de sílica (Merck®, GF<sub>254</sub>), como suporte, solução metanólica de difenilborilóxi-etilamina a 0,5% (Reagente Natural A), solução metanólica de polietilenoglicol 2000 a 30% (m/V), e observação sob luz UV em 365 nm como reveladores. Como substância de referência foi utilizada a rutina dissolvida em metanol.

### Análise estatística

Os experimentos para a otimização do processo extrativo, executado através de um planejamento fatorial <sup>32</sup> (dois fatores em três níveis), foram analisados através de análise de regressão múltipla <sup>16,20</sup> e curvas de superfície de respostas construídas a partir das equações ajustadas pela regressão, com auxílio do software Statgraphics Plus ® 5.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

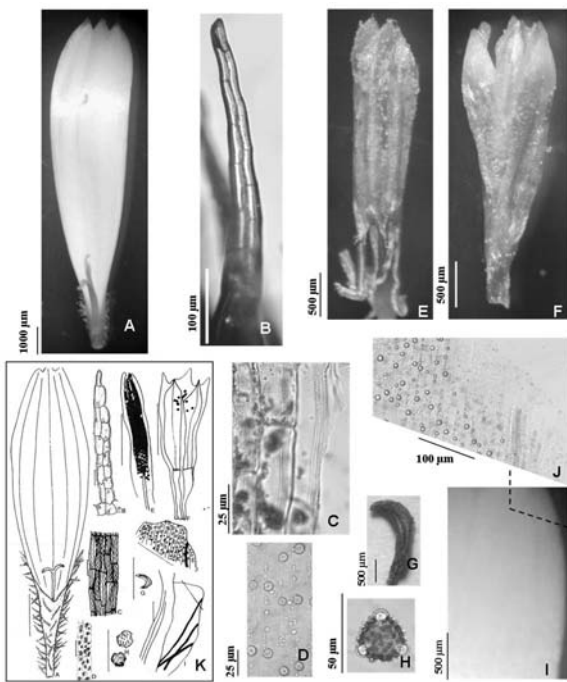
A verificação da autenticidade do material vegetal é primordial no desenvolvimento dos fitoterápicos e pode ser verificada por meio de ensaios de identificação macro e microscópicos e métodos cromatográficos. As características microscópicas das flores da *C. officinalis* usadas neste trabalho foram comparadas com a correspondente descrição (Tabela 1) e ilustração de referência (Fig. 1-K) na sua monografia farmacopeica <sup>10</sup>, atestando-se a sua identidade botânica (Fig. 1-A à J).

As operações preliminares, como triagem e secagem, foram realizadas logo após a colheita das flores da *Calendula officinalis*. O controle da perda por secagem (PS) (Fig. 2) das flores, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar, permitiu verificar que a média da perda por secagem das flores frescas (n = 4 colheitas) foi de 50,32 ± 7,67%.

Com exceção da colheita 1, observou-se um padrão no comportamento de perda por secagem das flores da calêndula, que pode ser vi-

Estruturas	Descrição farmacopeica <sup>18</sup>
Capítulo	Composto por corolas liguladas com células retangulares, alongadas, de contorno levemente sinuoso, com cutícula estriada, destituída de estômatos.
Corola ligulada	Apresenta numerosas gotas de óleo de coloração amarelo-alaranjada a amarelo clara nas células do seu parênquima subjacente
Tricomas	Ocorrem na região basal da face abaxial. Tipo tectores longos multicelulares bisseriados cônicos de ápice arredondado
Grãos de pólen	Equinados, tricolpados, com cerca de 45 µm de diâmetro
Frutos	Forma navicular, com ornamentações dentadas na face dorsal

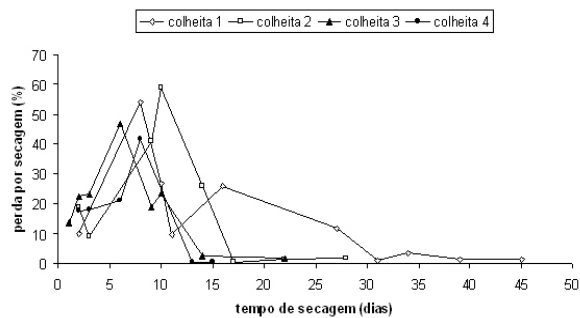
**Tabela 1.** Características botânicas identificadas nas flores de *C. officinalis*.



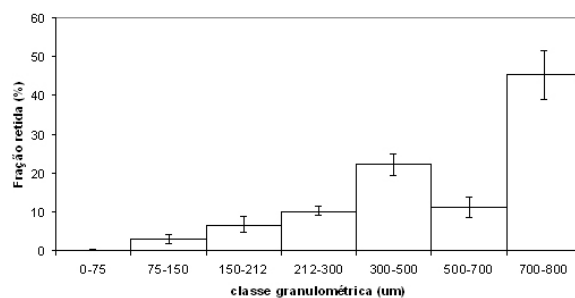
**Figura 1.** Microscopia da *C. officinalis* L. **A.** flor pistilada ligulada; **B.** tricoma multicelular bisseriado do tubo da corola da flor ligulada. **C.** epiderme da lígula com cutícula estriada; **D.** parênquima da lígula contendo gotas de óleo; **E.** anteras da flor tubulosa; **F.** corola da flor tubulosa do disco; **G.** fruto; **H.** grão de pólen tricolpado; **I.** fragmento de lígula; **J.** detalhe do parênquima com gotas de óleo na porção indicada em **I.** (Fotos realizadas pelo professor MSc. René Artur Ferreira). **K.** Desenho de referência da microscopia de *C. officinalis*<sup>18</sup>.

sualizado na curva da Figura 2, demonstrado por um pico de perda após cerca de 8 dias, seguido de um decréscimo acentuado após intervalo de mais 3 dias.

Conforme demonstra a curva de secagem (Fig. 2), a perda por secagem estabilizou após o tempo médio de 20 ± 8 dias, porém, no último



**Figura 2.** Curva de secagem das flores de *C. officinalis* à temperatura ambiente.



**Figura 3.** Distribuição granulométrica das flores de *C. officinalis* secas e moídas.

dia, verificou-se um discreto aumento na umidade das flores, evidenciando as trocas com a umidade do ambiente.

Os resultados obtidos para a caracterização da matéria-prima vegetal encontram-se descritos na Tabela 2.

A perda por dessecação da matéria-prima vegetal está em conformidade ao teor máximo de umidade de 12%<sup>10</sup>, demonstrando que as operações preliminares foram efetivas.

Observa-se que os limites de tamanho para a classificação da granulometria dos pós não é unânime na literatura técnica. Em geral, a escolha da granulometria é realizada conforme a finalidade proposta, de modo a facilitar o proces-

Ensaio	Resultado	Especificação farmacopeica <sup>18</sup>
Perda por dessecação (%)	11,98 ± 0,31 (2,65)	8 a 14%
Granulometria média (µm)	509,50 ± 38,19 (7,49)	Nada consta
Teor de extrativo solúvel em água (% m/m)	27,65 ± 2,95 (10,68)	Nada consta
Teor de flavonóides totais (g %)	1,05 ± 0,28 (26,73)	Não deve ser inferior a 0,4%

**Tabela 2.** Resultados expressos pela média ± desvio padrão (DPR %, para a caracterização das flores secas e moídas de *C. officinalis*. DPR % = desvio padrão relativo.

so seguinte. Por exemplo, para os processos de extração, recomenda-se uma determinada granulometria, segundo o tipo de droga vegetal. Para flores, recomenda-se o corte grosso (diâmetro médio de 5 a 10 mm), para lenhos, cascas, raízes, rizomas e sementes, o corte semi-fino (diâmetro médio de 0,5 a 5 mm)<sup>21</sup>.

A distribuição granulométrica (Fig. 3) das flores secas e moídas mostra que cerca de 50% do pó tem um tamanho médio de 750 µm, e a outra metade concentra-se na faixa de 300 a 500 µm, caracterizando uma distribuição bimodal, com granulometria média de 509,52 µm. Possivelmente, esta característica seja decorrente do padrão de ruptura das flores secas e do tipo de moinho utilizado. A classificação da Farmacopéia Brasileira<sup>10</sup> denomina pó grosso, quando 100% das partículas são menores que 1,7 mm e no máximo 40% é menor que 355 µm. O pó das flores de *C. officinalis* situa-se nesta faixa, sendo apenas 25% menor que 300 µm.

O teor de extrativos determinado neste trabalho indica a presença de compostos hidrossolúveis à quente presentes no material vegetal. Muito embora não integre o conjunto dos ensaios farmacopeicos na sua monografia inscrita na Farmacopéia Brasileira, tampouco seja indicativo dos constituintes ativos, o teor de extrativos representa uma técnica de fácil execução e economicamente viável, relevante por estabelecer con-

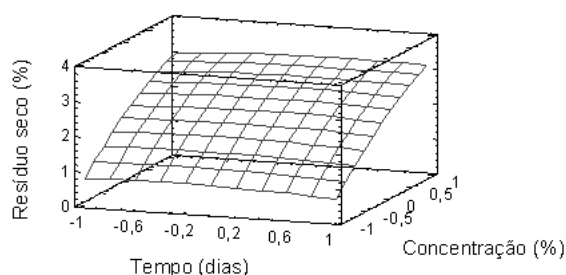
dições adicionais para controle de qualidade de matérias-primas vegetais, conforme recomendação da Organização Mundial da Saúde<sup>22,23</sup>.

O TFT obtido para a matéria-prima vegetal foi bastante superior ao limite mínimo recomendado em sua monografia farmacopeica<sup>10</sup>, assegurando qualidade para estes marcadores.

Após a caracterização da matéria-prima vegetal, deu-se início ao desenvolvimento das soluções extrativas pelos métodos de turbo-extração e maceração seguindo um planejamento fatorial. O controle da qualidade foi realizado para a cromatografia em camada delgada, o pH, o resíduo seco, e o teor de flavonóides totais. Para cada método de extração, as respostas estudadas (RS e TFT) foram ajustadas através de um modelo matemático de segunda ordem de acordo com a equação:  $Y = \beta_0 + \beta_1 * Conc + \beta_2 * T + \beta_{12} * Conc * T + \beta_{11} * Conc^2 + \beta_{22} * T^2$ , onde  $y$  = resposta estudada,  $\beta_0 \dots \beta_{22}$  = coeficientes,  $Conc$  = concentração de flavonóides totais na solução extrativa,  $T$  = tempo de maceração ou turbo-extração.

A Tabela 3 descreve os resultados da análise por cromatografia em camada delgada.

Segundo a Farmacopéia Brasileira<sup>10</sup>, as manchas alaranjadas com Rf próximo a 0,35 são correspondentes a rutina e as manchas verdes com Rf próximo a 0,55, correspondem ao ácido clorogênico. De acordo com a especificação farmacopeica<sup>10</sup>, também se espera visualizar uma banda de fluorescência amarelada logo abaixo da rutina e outra entre as manchas correspon-



**Figura 4.** Superfície de respostas para o Resíduo Seco das soluções extrativas de *C. officinalis* obtidas por maceração (Tempo: 1 = 15 dias, 0 = 10 dias e -1 = 5 dias; Conc: 1 = 12,5 %; 0 = 7,5 %; -1 = 2,5 %).

Manchas	Rf aproximado	Coloração
1	0,45	Amarelada
2	0,59	Alaranjada claro
3	0,65	Amarelada
4	0,86	Esverdeada claro

**Tabela 3.** Análise de cromatografia em camada delgada das soluções extrativas hidroetanólicas das flores secas e moídas de *C. officinalis*.

dentos à rotina e ao ácido clorogênico. Todas as soluções extrativas obtidas por ambos os métodos apresentaram 4 manchas, com intensidade proporcional à concentração planta:solvente, correspondendo à mesma seqüência de eluição da monografia farmacopeica <sup>10</sup>, porém com os valores de Rf descritos na Tabela 3.

Os valores da determinação do pH, dos extratos obtidos por maceração e turbo extração estão descritos na Tabela 4. É possível verificar que o pH dos diferentes extratos se encontram próximos a neutralidade, o que é bastante importante para a sua manipulação nos diferentes processos futuramente empregados. Dos fatores estudados, os resultados sugerem que a concentração é o fator que mais exerce influência, levando a um ligeiro decréscimo do pH com o aumento da concentração.

Os valores da determinação de resíduo seco das soluções extrativas das flores secas e moídas de *C. officinalis* obtidas por maceração e turbo extração estão descritos na Tabela 5.

Os dados experimentais do RS das soluções extrativas obtidas por maceração foram ajustados através do modelo quadrático ( $RS = 2,2842 + 0,007*T + 0,078*T + 1,17433*Conc - 0,0883*T^2 + 0,05625*T*Conc - 0,2933*Conc^2$ ), sendo que

cerca de 98,96 % da variação experimental pode ser explicada pelo modelo proposto ( $r^2 = 0,9723$ ). De acordo com a análise de variância, apenas o coeficiente linear da concentração, apresentou significância estatística ( $p = 0,0005$ ). A significância do coeficiente é refletida no gráfico de superfície de resposta (Fig. 4), onde pode ser constatado que a concentração foi o fator a apresentar maior influência, devido ao maior grau de significância, sobre o RS das soluções extrativas.

Os dados experimentais do RS das soluções extrativas obtidas por turbo-extração foram ajustados através do modelo quadrático ( $RS = 2,55244 + 0,492833*T + 1,28217*Conc - 0,148167*T^2 + 0,3005*T*Conc - 0,188167*Conc^2$ ), sendo que cerca de 98,53% da variação experimental pode ser explicada pelo modelo proposto ( $r^2 = 0,9608$ ). De acordo com a análise de variância, tanto o coeficiente linear da concentração, como o do tempo, apresentaram significância estatística ( $p = 0,0155$  e  $p = 0,0010$ ). A significância dos coeficientes é refletida no gráfico de superfície de resposta (Fig. 5), onde pode ser constatado que a concentração e o tempo foram fatores a apresentar influência, devido ao maior grau de significância, sobre o RS das soluções extrativas.

Relação planta : solvente			
Soluções Extrativas	2,5 %	7,5 %	12,5 %
MAC 05 dias	5,99 ± 0,031 (0,527)	5,77 ± 0,050 (0,866)	5,65 ± 0,027 (0,477)
MAC 10 dias	6,17 ± 0,016 (0,265)	5,88 ± 0,034 (0,583)	5,79 ± 0,041 (0,717)
MAC 15 dias	6,19 ± 0,016 (0,270)	5,86 ± 0,070 (0,120)	5,78 ± 0,021 (0,374)
TURB 05 min	6,22 ± 0,029 (0,474)	5,90 ± 0,021 (0,371)	5,72 ± 0,024 (0,422)
TURB 15 min	5,97 ± 0,052 (0,870)	5,79 ± 0,016 (0,275)	5,72 ± 0,029 (0,513)
TURB 25 min	6,06 ± 0,038 (0,638)	5,76 ± 0,009 (0,169)	5,69 ± 0,012 (0,222)

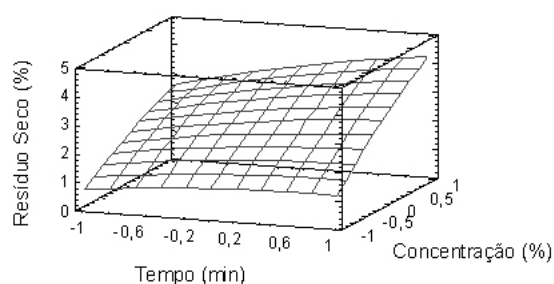
**Tabela 4.** Resultados do pH (média ± desvio padrão, DPR %) das soluções extrativas das flores secas e moídas de *C. officinalis*. (DPR %) = desvio padrão relativo; MAC = maceração; TURB = turbo-extração; os números 5, 10, 15 e 25 referem-se ao tempo de extração.

Relação planta:solvente			
Soluções extrativas	2,5 %	7,5 %	12,5 %
MAC 5 dias	0,698 ± 0,025 (3,70)	2,383 ± 0,056 (2,35)	2,899 ± 0,038 (1,31)
MAC 10 dias	0,824 ± 0,034 (4,14)	2,199 ± 0,058 (2,65)	3,243 ± 0,032 (0,99)
MAC 15 dias	0,751 ± 0,025 (3,33)	2,094 ± 0,057 (2,77)	3,177 ± 0,035 (1,10)
TURB 5 min	0,822 ± 0,032 (3,96)	1,936 ± 0,042 (2,21)	2,600 ± 0,039 (1,54)
TURB 15 min	0,980 ± 0,037 (3,85)	2,386 ± 0,035 (1,47)	3,915 ± 0,123 (3,15)
TURB 25 min	1,148 ± 0,05 (4,36)	3,039 ± 0 (0)	4,128 ± 0,008 (0,19)

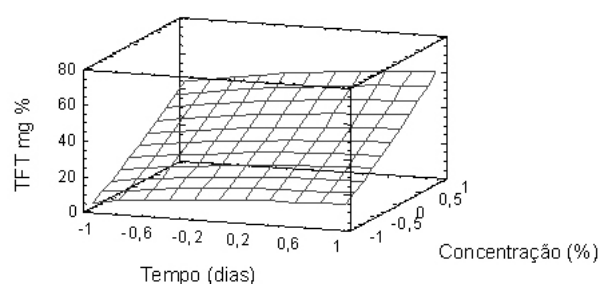
**Tabela 5.** Resultados do resíduo seco (%) expressos pela média ± desvio padrão (DPR %) das soluções extrativas das flores secas e moídas de *C. officinalis*. (DPR %) = desvio padrão relativo; MAC = maceração; TURB = turbo-extração; os números 5, 10 e 15 referem-se ao tempo de extração.

Relação planta:solvente			
Soluções extrativas	2,5%	7,5%	12,5%
MAC 5 dias	4,85 ± 0,18 (3,83)	14,30 ± 0,89 (6,26)	55,3 ± 5,42 (9,80)
MAC 10 dias	6,63 ± 0,31 (4,66)	60,30 ± 0,98 (1,64)	31,20 ± 4,39 (14,07)
MAC 15 dias	18,80 ± 1,03 (5,48)	14,80 ± 1,85 (12,50)	76,00 ± 3,2 (4,21)
TURB 5 min	5,43 ± 0,36 (6,63)	39,00 ± 0,67 (1,72)	63,30 ± 6,8 (10,82)
TURB 15 min	7,17 ± 0,11 (1,65)	48,8 ± 0,91 (1,87)	35,10 ± 1,2 (3,49)
TURB 25 min	5,86 ± 0,04 (0,80)	11,3 ± 0,83 (7,38)	17,60 ± 1,6 (9,09)

**Tabela 6.** Teor de flavonóides totais (mg%) expressos pela média ± desvio padrão (DPR%) das soluções extrativas das flores secas e moídas de *C. officinalis* (DPR%) = desvio padrão relativo; MAC = maceração; TURB = turbo-extração; os números 5, 10, 15 e 25 referem-se ao tempo de extração.



**Figura 5.** Superfície de respostas para o Resíduo seco das soluções extrativas de *C. officinalis* obtidas por turbo-extração (Tempo: 1 = 25 min, 0 = 15 min e -1 = 5 min; Conc: 1 = 12,5%; 0 = 7,5%; -1 = 2,5%).

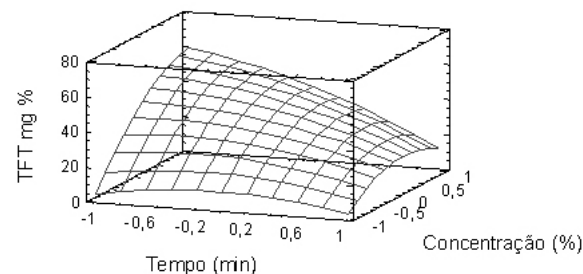


**Figura 6.** Superfície de respostas para o Teor de Flavonóides Totais das soluções extrativas obtidas de *C. officinalis* por maceração (Tempo: 1 = 15 dias, 0 = 10 dias e -1 = 5 dias; Conc: 1 = 12,5%; 0 = 7,5%; -1 = 2,5%).

Os resultados do teor de flavonóides totais estão descritos na Tabela 6.

Para as soluções extrativas obtidas por maceração, os dados experimentais de TFT foram ajustados através do modelo quadrático ( $TFT = 31,1567 + 5,85833*T + 22,0367*Conc - 2,035*T^2 + 1,6875*T*Conc + 2,33*Conc^2$ ), sendo que apenas cerca de 57,90% da variação experimental pode ser explicada pelo modelo proposto. De acordo com a análise de variância, nenhum dos coeficientes apresentou significância estatística ( $p > 0,05$ ). No gráfico de superfície de resposta (Fig. 6), visualiza-se que o maior tempo e maior concentração, levam a um maior TFT.

Para as soluções extrativas obtidas por turbo-extração, os dados experimentais de TFT foram ajustados através do modelo quadrático ( $TFT = 37,4867 - 12,2333*T + 16,3283*Conc - 6,68*T^2 - 11,425*T*Conc - 10,695*Conc^2$ ), sendo que cerca de 91,47% da variação experimental pode ser explicada pelo modelo proposto ( $r^2 = 0,7716$ ). De acordo com a análise de variância, apenas o coeficiente linear da concentração apresentou significância estatística ( $p = 0,0296$ ). A significância do coeficiente é refletida nos gráficos de superfície de respostas (Fig. 7), onde pode ser



**Figura 7.** Superfície de respostas para o Teor de Flavonóides Totais das soluções extrativas de *C. officinalis* obtidas por turbo-extração (Tempo: 1 = 25 min, 0 = 15 min e -1 = 5 min; Conc: 1 = 12,5%; 0 = 7,5%; -1 = 2,5%).

constatado que a concentração foi o fator a apresentar maior influência sobre o TFT das soluções extrativas.

Entre os fatores principais, a passagem do nível inferior para o nível intermediário na relação planta:solvente proporcionou um aumento no teor de flavonóides totais. Assim, o aumento na relação planta:solvente influencia positivamente a concentração de flavonóides totais extraídos, porém ocorre também saturação quando essa relação é extrapolada, onde se obser-

vou a formação de um aglomerado de matéria-prima vegetal no qual o solvente não foi capaz de penetrar.

O tempo de extração aparenta também ter efeito sobre a quantidade de flavonóides totais, pois entre 5 e 10 dias e 5 e 15 min houve um aumento bastante significativo, porém com o aumento desse tempo não ocorrem diferenças importantes e até mesmo diminuição. No caso da turbo-extração, no tempo máximo houve aumento da temperatura o que pode ter sido prejudicial.

Para ambos os métodos, no nível intermediário do fator A (tempo de extração), sugere-se uma tendência de saturação do solvente, quando o fator B (relação planta:solvente) passa do nível intermediário para o superior. No entanto, o fator A nos seus níveis inferior e superior, a extração do TFT comporta-se de modo crescente, sugerindo uma “compensação” do efeito de saturação do solvente, pelo tempo de extração.

Os maiores valores de TFT para as soluções extrativas obtidas por maceração e turbo-extração alcançaram o limite superior de TFT das tinturas hidroalcoólicas (álcool 60 °GL) e extratos glicólicos dos fornecedores do Estado de São Paulo (Brasil)<sup>12</sup>, que variaram de 0,08 a 0,78 mg/mL. Entretanto, não foi observada uma relação direta entre os resíduo secos obtidos neste trabalho com os citados na literatura para as tinturas e extratos glicólicos<sup>12</sup>. Esta disparidade do resíduo seco pode estar ligada a outros fatores ligados à origem do material vegetal. No presente trabalho, a variação do TFT, para uma mesma matéria-prima vegetal, foi muito mais sensível às variações das condições extrativas do que o resíduo seco.

## CONCLUSÕES

A espécie cultivada no município de Rio do Sul (SC) corresponde à *Calendula officinalis* descrita na Farmacopéia Brasileira<sup>10</sup>. As operações preliminares pós-colheita, demonstraram que o tempo de 20 dias à temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar, foram efetivas quanto à perda por secagem.

A matéria-prima vegetal cultivada em Rio do Sul-SC demonstrou conformidade com os limites farmacopeicos da perda por dessecação, teor de flavonóides totais e CCD. O teor de extrativos solúveis em água foi determinado como um parâmetro auxiliar no controle de qualidade.

O máximo teor de flavonóides totais foi obtido a partir da maior relação planta:solvente

(12,5%) no maior tempo (15 dias) para a maceração, e no menor tempo (5 min) para a turbo-extração. Não foi constatada uma relação linear entre o tempo de extração e o teor de flavonóides totais para ambos os métodos.

O aumento do resíduo seco foi sensível à variação da relação planta: solvente para ambos os métodos. Apenas no processo de turbo-extração, o tempo demonstra maior influência sobre o resíduo seco, à medida que se aumenta a concentração.

Diante dos resultados da pesquisa, sugere-se o emprego do método de maceração para o melhor rendimento de flavonóides totais e resíduo seco, considerando a facilidade de execução e adaptação de equipamentos. Como medida para compensar a demanda do tempo, nas mesmas condições empregadas neste trabalho, recomenda-se a maceração dinâmica.

**Agradecimentos.** A acadêmica Samyra T. Barni recebeu suporte financeiro e bolsa estudantil do Artigo 170 do Governo Estadual de Santa Catarina/ UNIVALI.

## REFERÊNCIAS

1. Coimbra, R. (1994) *Manual de Fitoterapia*. Cejup, Belém, p. 62.
2. Blumenthal, M., A. Goldberg & J. Brinckmann (2000) *Herbal Medicin: Expanded Commission E monographs*, American Botanical Council, Austin, p. 44-6.
3. Falcão, H.S., I.O. Lima, V.L. Santos, H.F. Dantas, M.F.F.M. Diniz, J.M. Barbosa-Filho & L.M. Batista (2005) *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**: 381-91.
4. Sartori, L.R., M.S. Ferreira, F.F. Perazzo, L. Mandalho-Lima & J.C.T. Carvalho (2003) *Rev. Bras. Farmacogn.* **13**: 17-9.
5. Chandran, P.K. & R. Kuttan (2008) *J. Clin. Biochem. Nutr.* **43**: 58-64.
6. Menéndez, A. B., A. L. Parra, V. B. Pavón, C.C. Domínguez, O.V. Martínez, I. G. Sardiñas & A. Muñoz (2007) *Lat. Am. J. Pharm.* **26**: 811-7.
7. Núñez Figueredo, Y., C.M. Alarcón, S. Agüero Fernández & A. Muñoz Cernuda (2007) *Lat. Am. J. Pharm.* **26**: 548-52
8. Masterová, I., Z. Grancaiova, V. Suchy, K. Ubik & M. Nagy (1991) *Chem. Pap.* **45**: 105-8.
9. Guinot, P., A. Gargadennec, G. Valette, A. Fruchier & C. Andary (2008) *Phytochem. Anal.* **19**: 46-51.
10. Farmacopéia Brasileira (2001) Atheneu, São Paulo.
11. Brasil, MS, ANVISA (1995) Portaria no 6 de 31/01/1995. Institui e normatiza o registro de

- produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.
12. Brasil, MS, ANVISA (2004) Resolução RDC no 48 de 16/03/2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
  13. Brasil, MS, ANVISA (2007) *Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. Brasília.
  14. Allen Jr, L.V., N.G. Popovich & H.C. Ansel (2007) *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. Artmed: Porto Alegre, p. 210.
  15. Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (1986) *Deutscher Arzneimittel: Codex*, Govi, Frankfurt, Deutscher Apotheker, Stuttgart, vol. 1, Codex – Probe 4, 9.
  16. Montgomery, D.C. (1996) *Design and analysis of experiments*, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Nova York, pp. 201-34.
  17. Farmacopéia Brasileira (1988) Atheneu, São Paulo.
  18. Farmacopéia Portuguesa (2002) Pharmacopeia, Lisboa.
  19. Soares, L.A.L., V.L. Bassani, G. González Ortega & P.R. Petrovick (2003) *Acta Farm. Bonaerense* **22**: 203-7.
  20. Cochram, W.G. & G.M. Cox (1978) *Experimental designs*, John Wiley, New York. 661p.
  21. Sonaglio, D., G.G. Ortega, P.R. Petrovick & V.L. Bassani (2003) “Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos”, in: “Farmacognosia: da planta ao medicamento”, (C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, eds.), 5. ed., UFRGS, UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, pp. 312-3.
  22. Mello, J.C.P. & P.R. Petrovick (2000) *Acta Farm. Bonaerense* **19**: 211-5.
  23. WHO (1992) *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. WHO, Geneva.