



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Farmacia

Caléndula: influencia de dos variables de
manejo agronómico en la calidad farmacológica

N° 580

Manuel Klug

Tutora: Erika Wilson

Departamento de Investigaciones
Tesis aprobada el 4 de marzo de 2013

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

Agradecimientos

A la Dra. Erica Wilson por dirigir el desarrollo de la tesina.

A mi familia por apoyarme a lo largo de toda la carrera.

A mis compañeros de laboratorio Ali y Matías por ayudarme en todo lo que pudieron.

A mis compañeros Fede, Nico, Loli, Sofi y Nancy por acompañarme en todo momento en la carrera.

Índice

1.	Introducción	7
2.	Objetivos	8
2.1.	Objetivo general	8
2.2.	Objetivo específico	8
3.	Aspectos farmacognósticos de <i>C. Officinalis</i>	9
3.1.	Descripción botánica	9
3.2.	Características de la flor.....	10
3.3.	Historia	10
3.4.	Cultivo	11
3.5.	Conservación	11
3.6.	Composición química	12
3.7.	Usos tradicionales / actuales	13
3.8.	Propiedades farmacológicas	14
4.	Materiales y métodos	15
4.1.	Condiciones de las muestras	16
4.2.	Cromatografía en capa delgada	16
4.2.1.	Materiales.....	16
4.2.2.	Condiciones cromatográficas.....	16
4.2.3.	Preparación de soluciones	16
4.2.4.	Procedimiento	17
4.2.5.	Resultados y discusión	17
4.3.	Valoración espectrofotométrica	19
4.3.1.	Materiales.....	19
4.3.2.	Preparación de la muestra	19
4.3.3.	Preparación de las soluciones de reactivos	19
4.3.4.	Procedimiento	19
4.3.5.	Resultados y discusión	20
5.	Conclusiones	21
6.	Referencias	22
7.	Anexo	24

1. Introducción

La *Caléndula officinalis* es una hierba anual originaria de la región de Mediterráneo, que se cultiva en todo el mundo con fines ornamentales pero también como planta medicinal o para preparados cosméticos debido a sus propiedades farmacológicas.

Hay registro del uso de sus flores desde la antigüedad como infusión, en ungüentos o tinturas para curar la ictericia, inducir la menstruación, en el tratamiento de la conjuntivitis, en el tratamiento de moretones y quemaduras entre otros.

Posee una gran diversidad de efectos farmacológicos, lo que se explica por poseer una gran cantidad de componentes químicos, entre los que se destacan los flavonoides, los carotenoides, ácidos fenólicos, saponinas y el aceite esencial. Entre los efectos farmacológicos que se han demostrado se destacan la actividad dérmica de extractos de sus flores en ungüentos para tratar dermatitis agudas o para promover la epitelización u otro tipo de afecciones cutáneas; también posee actividad antiinflamatoria, antibacteriana, anti fúngica, entre otras.

La Caléndula está codificada en diversas farmacopeas, por ejemplo en la Farmacopea Argentina 8va. ed. (FA VIII), Farmacopea Brasileira 5ta. ed., British Pharmacopoeia 2009 volume III (todas las cuales tiene idéntica metodología analítica). También hay una monografía en la Farmacopea Europea 7.0 (Ph Eur 7.0), Farmacopea Francesa 1996, Farmacopea Húngara 7ma. ed., Farmacopea Helvética 8va. ed., ESCOP (2003) (1), la British Herbal Pharmacopoeia (1996) (BHP 2006), una publicada por la Commission E, y la OMS (2004).

El control de calidad de materias primas de origen vegetal y sus preparados es complejo, especialmente debido a la variabilidad de las mismas. Las condiciones edáficas y climáticas pueden ser responsables de grandes variaciones en la composición química de una droga vegetal. Estos factores son difíciles de controlar y en todo caso, generan un perfil químico característico de ciertas regiones geográficas. Sin embargo, lo que sí se puede controlar es el manejo agronómico de la planta y factores tales como la fertilización, cantidad y sistema de riego, momento del año de la siembra que pueden modificar el perfil químico de la planta. Optimizando estas condiciones se intenta llegar a una calidad reproducible y consistente de la planta medicinal que se debería reflejar en la obtención de una droga vegetal y/o sus preparados que cumpla de la misma manera con los requisitos farmacopeicos y sobre todo, que tengan una actividad farmacológica también reproducible y consistente.

Con este objetivo se trabajó en conjunto con un grupo de investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Lujan que se encargaron del cultivo, monitoreo, cosecha y secado de las flores de Caléndula sometidas a diversas variables de fertilización.

Para la evaluación de las diferentes muestras, se tuvo en cuenta que la Caléndula sería utilizada bien con fines medicinales o cosméticos. Por lo tanto, como droga vegetal, debe cumplir con los requisitos establecidos en la Farmacopea Argentina 8va. ed. que la define como "la flor ligulada completamente abierta, separada del receptáculo, desecada, entera o fragmentada, de los capítulos simples, semidobles de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Debe contener no menos de 0.4 por ciento de flavonoides totales, calculados como hiperósido sobre la droga desecada". Esta definición coincide con la de la Farmacopea Brasileira y la Farmacopea Europea.

Las muestras suministradas por la Facultad de Agronomía de la Universidad de Lujan fueron sometidas a dos diferentes ensayos: la evaluación del perfil cromatográfico obtenido por cromatografía en capa delgada y a la valoración espectrofotométrica de los flavonoides totales con el fin de correlacionar las diferentes condiciones agronómicas con la calidad botánica de la planta.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de diferentes muestras de flores de *Caléndula officinalis*, que se obtuvieron de plantas sometidas a tratamientos agronómicos diferentes. Teniendo en cuenta que la Caléndula se utiliza con fines medicinales las muestras se evaluaron utilizando los ensayos indicados en la FA VIII. para verificar cuales cumplían mejor con los requisitos de la misma y así determinar cuáles condiciones eran más favorables para lograr la calidad exigida. Se emplearon, por lo tanto las técnicas de identificación y valoración de flavonoides descritas en dicha farmacopea y que coinciden con las establecidas en la Farmacopea Brasileira 5ta. ed. y la Ph Eur 7.0 El trabajo se llevó a cabo en conjunto con investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Luján que estuvieron a cargo de los aspectos agronómicos de la producción de la droga vegetal, de su recolección y tratamiento post-cosecha.

2.2 Objetivos específicos:

- Evaluar las muestras de flores de Caléndula, comparando sus perfiles cromatográficos obtenidos con Cromatografía en capa delgada.
- Calcular el porcentaje total de flavonoides de las diferentes muestras por medio de una valoración espectrofotométrica.
- Comparar las diferentes muestras e identificar aquellas que cumplan con lo establecido en la FA VIII.

3. Aspectos farmacognósticos de *C. Officinalis*

3.1. Descripción botánica

Planta herbácea, anual, de color verde claro y de 30 a 60 cm de altura. En los primeros estadios la planta está conformada por una roseta basal de hojas, posteriormente desarrolla tallos angulosos y pubescentes a menudo ramificados desde la base. Hojas simples, alternas, algo gruesas, de obovadas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas. En los extremos de los tallos se encuentran los capítulos florales cuyo diámetro oscila entre 3 y 6 cm y están formados por flores liguladas marginales y tubulares en el centro, de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche. El involucreo es gris-verdoso en forma de platillo de 1,5 a 3 cm de diámetro, el receptáculo desnudo, plano o ligeramente prominente, su fruto es en aquenio. (Acosta de la Luz et al. 2001).



Fig. 1: Flor de *C. officinalis* (<http://pharmacology.georgetown.edu/urbanherbs/calendula.htm>)

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida* (dicotiledónea)

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Calendula* L.

Especie: *Calendula officinalis* L.

3.2 Características de la flor

Según la FA VIII, las flores de *C. officinalis* deben presentar las siguientes características:

Características macroscópicas

Flores liguladas femeninas de 20 a 30 mm de longitud por 5 a 7 mm de diámetro, de color amarillo o amarillo anaranjado a pardo anaranjado, son pilosas, con tres dientes en el ápice de la lígula; tubo corolino de color pardo amarillento a pardo anaranjado, estilo bífido, ovario de color pardo amarillento a pardo anaranjado, los frutos son aquenios curvados, naviculares, con el dorso cubierto de espinas cortas de color verdoso y sin vilano. Flores tubulosas masculinas con corola de aproximadamente 5 mm de longitud, 5-lobulada, de color amarillo, rojo, anaranjado o rojo violáceo, pilosa en la parte inferior.

Características microscópicas

En el material diafanizado se observan en vista superficial flores liguladas, fragmentos de la corola cuya epidermis interna está compuesta por células elongadas longitudinalmente, con paredes delgadas y cutícula estriada; en el parénquima subyacente se observa gran cantidad de glóbulos oleíferos de color amarillo-anaranjado y en la base de la corola las células epidérmicas muestran las paredes más engrosadas y con diminutos cristales o drusas de oxalato de calcio; la epidermis externa es similar a la interna excepto por presentar escasos estomas de tipo anomocítico. Se observan tricomas simples, presentes en la base de la corola, ellos son biseriados, largos, cónicos, con ápice redondeado, con células de paredes ligeramente engrosadas. En la corola y en la pared del ovario se encuentran tricomas glandulares de dos tipos: uniseriados, con un pie de 3 a 5 células, ocasionalmente pueden ser biseriados con 3 a 4 células por serie; los tricomas glandulares del segundo tipo se sésiles y en todos los casos las cabezas son pluricelulares. Se encuentran fragmentos con papilas estigmáticas, cortas y bulbosas, con granos de polen, retenidos, esféricos de hasta 40 µm de diámetro, con tres poros germinativos y exina con espinas; fragmentos de la pared del ovario, con células poligonales, las que contienen pigmentos abundantes de color marrón; fruto aquenio, de forma navicular con el dorso espinoso, de color pardo oscuro; restos de las corolas de las flores tubulosas, abundantes fragmentos de filamentos y anteras y fragmentos de endotelio de las anteras.

3.3 Historia (Sociedad Argentina de Dermatología 2002-3)

La Caléndula es conocida desde la antigüedad por árabes, indios y griegos. Su nombre proviene del latín *kalendulae*, que representa el primer día del mes del calendario romano. Los romanos la denominaron *solsequium* (seguidora del sol) ya que sus flores se abren al alba y se cierran a la caída del sol. Es una planta originaria de Egipto, introducida al continente europeo por medio de los romanos.

Sus pétalos secos fueron empleados como sustituto del azafrán por griegos y romanos.

En la Edad media, la abadesa Hildegarda de Bingen (1099-1179) la recomendaba en el tratamiento del impétigo y máculas dérmicas. El padre Sebastián Kneipp (1821-1897) recomendaba la aplicación externa de caléndula en úlceras, várices y maculopatías cutáneas de todo tipo. Tanto en la Guerra Civil Norteamericana como en la Primera Guerra Mundial, se han empleado ungüentos y pomadas en base a caléndula como antiinflamatorio y antiséptico de heridas.

Tanto los Mayas como los Aztecas utilizaban esta planta en muchos de sus rituales.

Debido a que sus flósculos se asemejan a rayos de gloria, esta flor fue consagrada y reverenciada por los devotos de la Virgen María. Actualmente, en la India, de acuerdo con una vieja tradición, se hacen guirnaldas con flores de caléndula en honor de las deidades Mahadevi y Durga.

3.4 Cultivo

El cultivo de la caléndula se lleva a cabo con éxito en climas templados, y en general tiene buena resistencia al frío y a las sequías. Es poco exigente en cuanto a tipo de suelo, pero siempre son preferibles aquellos con buen contenido de materia orgánica.

El suelo deberá encontrarse en óptimas condiciones físicas, químicas y biológicas. Tendrá que presentar un drenaje adecuado para que no se acumule agua o humedad que promueva la proliferación de microorganismos, o sea que de ser necesario se realizará una nivelación. La orientación del cultivo también es muy importante ya que necesita un lugar soleado o, por lo menos, parcialmente soleado. Para ello, se recomienda usar terrenos orientados en sentido N-S. Las flores son sensibles a las variaciones de temperatura y humedad y se cierran cuando oscurece y cuando se esperan precipitaciones. La elección de la semilla es un paso muy importante tanto para el cultivo de la caléndula como para cualquier otro cultivo. Si lo que se busca es producir caléndula para la obtención de aceites y extractos, es preferible que la semilla sea importada, ya que esta tiene un mayor poder de floración (Moore et al 2005).

El poder germinativo suele ser de un 85%, aunque este va disminuyendo conforme pasa el tiempo, y a los dos años de cosechadas se considera que las semillas pierden totalmente el poder germinativo.

El momento de siembra habitual es desde fines de otoño hasta, incluso, principios de primavera. Los capítulos florecen desde fines de invierno hasta el verano inclusive.

La recolección se realiza cuando los capítulos se hallan en plena floración (Centeno et al. 2004). Los rendimientos en el cultivo de caléndula pueden variar considerablemente, y dependen en gran medida de una serie de factores que incluyen latitud, época del año, manejo del cultivo, calidad de la semilla, calidad del suelo, etc.

En cuanto al uso de fertilizantes Govin et al. (2005) señalaron que el tratamiento realizado con humus de lombriz como fertilizante fue el más efectivo a la hora de analizar los mejores porcentajes de los principios activos, cenizas totales y rendimiento de masa vegetal, mientras que la humedad depende del método de secado utilizado.

Moreira et al. (2005) analizaron las concentraciones de N y P en el suelo, demostrando que son importantes en el cultivo de Caléndula ya que se observó un aumento en la producción de masas frescas y secas de la parte aérea y de los capítulos florales. La adición de N aumentó el contenido del mismo en los capítulos florales, mientras que la adición de P redujo el contenido de nitrógeno en los mismos y aumentó el contenido de P.

La fertilización es uno de los factores externos que intervienen en el normal desarrollo de las plantas y la concentración de principios activos de la especie. Por ello, es necesario el aporte de fertilizantes para la correcta nutrición y crecimiento de la planta (Furlan, 1998). En la región pampeana es importante la fertilización fosforada, ya que el fósforo es el elemento que con mayor frecuencia resulta limitante (García, 1999), el mismo es necesario desde las primeras etapas de los cultivos, ya que estimula el desarrollo temprano del sistema radical y tallo, estimula producción de flores, interviene en la madurez y uniformidad de los cultivos y los hace más resistentes al ataque de adversidades bióticas y abióticas (Sedgui et al., 2011; Taiz & Zeiger, 2003; Moreira et al., 2005; Salisbury, 2009).

Con respecto al contenido de agua durante su cultivo Bortolo et al. (2009) analizaron cuatro niveles de irrigación diferentes, sin notar diferencias estadísticas en cuanto al contenido de flavonoides en las mismas. Los mayores valores de peso de la droga seca fueron obtenidos del tratamiento sin irrigación, y las muestras sujetas a un stress por exceso de agua mostraron un mayor contenido de prolina.

3.5 Conservación

De acuerdo a García et al. (1996) las mejores formas de secado resultan ser el sol y la temperatura de 40°C, dado que se obtienen los mejores valores con respecto a los porcentajes de humedad, las sus-

tancias extraíbles en alcohol al 70% y en agua de las diferentes muestras analizadas. Además, la droga se conserva en óptimas condiciones hasta los seis meses en frascos de vidrio y latas compuestas (con foil de aluminio, sobres de polietileno de baja densidad, sobres de papel crema y sobres de papel blanco).

3.6 Composición química

Numerosos estudios demuestran que las flores de *C. officinalis* está compuesta por una gran variedad de compuestos químicos, entre los que se destacan los flavonoides, los carotenoides y los componentes del aceite esencial, terpenoides, cumarinas, ácidos fenólicos, aminoácidos, taninos.

Flavonoides

Se han aislado diversos flavonoides de flores de Caléndula incluyendo isoramnetina, quercetina, isoquercetina, calendoflósido, calendoflavósido, calendoflavobiósido, narcisina, quercitrina, rutina. Los flavonoides predominantes son derivados de la quercetina y la isoarmnetina (Kahn et al. 2011).

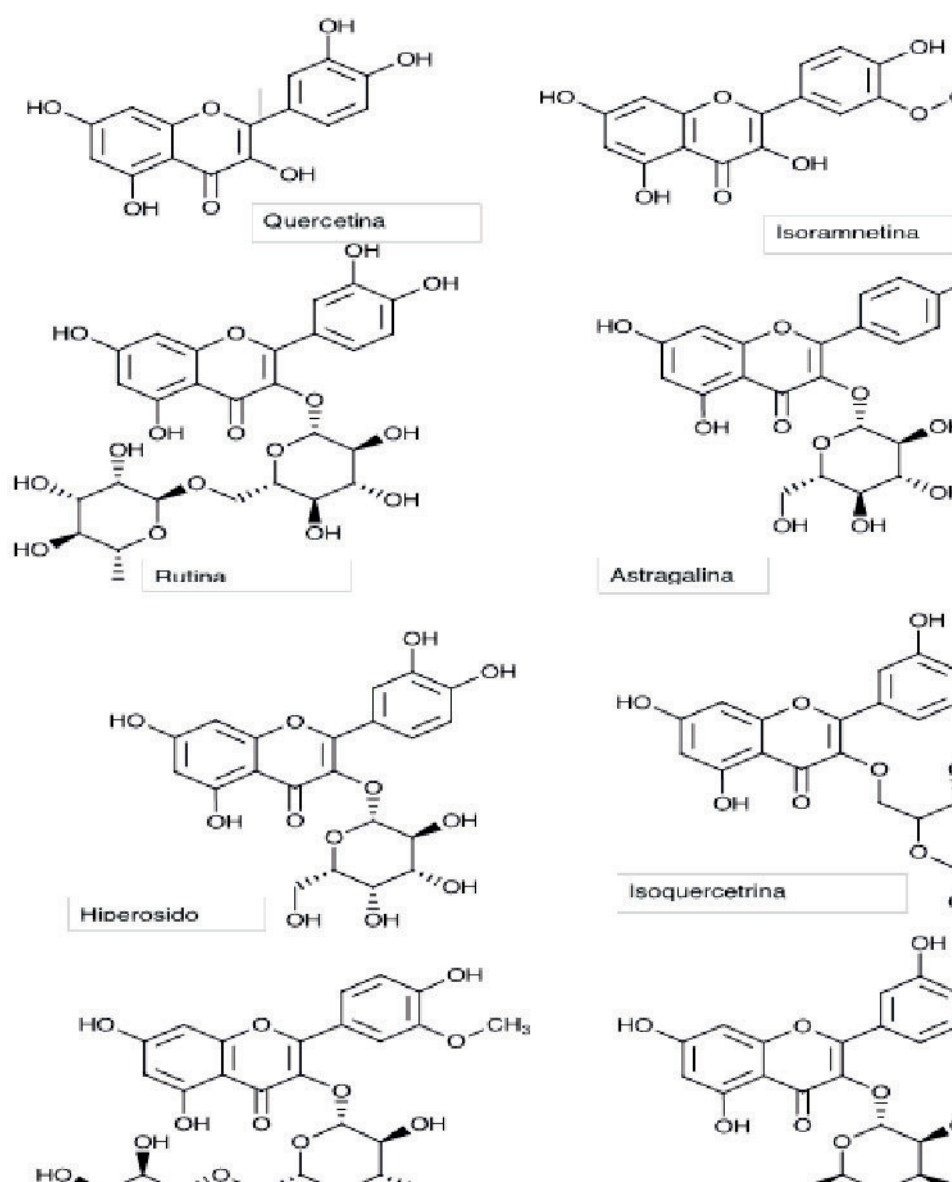


Fig. 2: Principales flavonoides de *C. officinalis*

En cuanto al contenido de **carotenoides** Pinteá et al. (2003) indican que la mayor cantidad de los mismo se encuentra en los pétalos, y que la concentración de los mismo aumenta con la intensidad del color, siendo la variedad naranja la que mayor concentración de los mismos presenta; asimismo la intensidad del color naranja es determinado por la cantidad de luteína, licopeno, γ -caroteno, β -caroteno y rubixantina (estos pigmentos son responsables del color naranja o hasta, del color rojo en tejidos vegetales). Los carotenoides que se encontraron fueron: neoxantina, luteoxantina, flavoxantina, mutatoxantina, luteína, rubixantina, licopeno, β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, etc. Según Beta et al. en el polen y en los pétalos la flavoxantina y la aroxantina son los carotenoides de mayor cantidad, y en el tallo y las hojas son la luteína y el β -caroteno. Pinteá et al. (2003) determinaron que el contenido de carotenoides totales es de 7.71% en pétalos y de 1.61% en polen, y de 0.85% para hojas y 0.18% para tallos.

Por otra parte Adler et al. (1975), identificaron una importante cantidad de **terpenoides** en un extracto de éter de petróleo, incluyendo sitoesteroles, estigmasteroles, diésteres de dioles, monoésteres de taraxasterol, ursadiol, y saponinas derivadas del ácido oleanólico: calendulosido AH, un glicósido del ácido oleanólico: calendulósidos A, B y C. En las cabezas florales se encontraron faradiol 3-O-laurato, palmitato y miristato que son los de mayor contenido en este tipo de compuesto (Hamburge et al. 2003).

Según Ocioszynka (1977) los **taninos** se encuentran en el 11.2% y 10.4% para las flores liguladas y los receptáculos respectivamente.

Entre las **cumarinas** se destaca la presencia de escopolamina, umbeliferona y esculetina (García et al. 1996).

Con respecto a los **ácidos fenólicos** presentes, Lastra Valdés et al (1999) destacaron la presencia de los ácidos cumarínico, vainillínico, caféico, salicílico y clorogénico. Kurowska et al. (1985) determinó un contenido de ácidos fenólicos totales de 104mg%.

Según Muley et al. (2009) los **aminoácidos** presentes en forma libre son: alanina, arginina, ácido aspártico, aspargina, valina, histidina, ácido glutámico, leucina, lisina, prolina, serina, tirosina, treonina, metionina y fenilalanina. El contenido de los mismos en la hojas es aproximadamente 5%, en el tallo es de 3.5% y en las flores un porcentaje de 4.5%.

Aceite esencial: Está compuesto por varios mono y sesquiterpenos y según Muley et al. (2009) la concentración del mismo es máxima en su etapa de floración, un 0.97%, y mínima en la etapa pre floración, con un valor de 0.13%. Según Lastra Valdés et al. (1999) se aprecia un rendimiento de 0.02% para la flor en su conjunto y se señalan rendimientos de 0.12% y 0.40% para las flores liguladas y los receptáculos respectivamente.

El aceite esencial está dominado por un 2-64% de α -cadinol y un 8-10% de eudesmol, junto con otros esteres de ácidos grasos y sesquiterpenos, los que le brindan un olor agradable y picante (Tucker. 2007).

3.7 Usos tradicionales/actuales

La utilización de la planta de *C. officinalis* se extiende largamente en el tiempo. Los antiguos curanderos europeos utilizaban extractos, infusiones y ungüentos para curar la ictericia, promover la transpiración durante periodos de fiebre y para inducir la menstruación.

En el siglo XIX se utilizaban preparados en EEUU para tratar la conjuntivitis, problemas del hígado, úlceras estomacales y quemaduras superficiales, hinchazones y heridas (Blumenthal et al. 2000).

Al tener actividad tanto astringente como antiinflamatoria las infusiones, ungüentos y tinturas se utilizan en el tratamiento de moretones, quemaduras, cortes y heridas con infecciones menores, Tyler (1994). Los preparados de Caléndula fueron utilizados también para tratar la inflamación de la piel y mucosa como la faringitis, dermatitis y úlceras en las piernas (Wichtl et al. 2004).

La German Commission E aprobó su uso interno y tópico para la inflamación de la mucosa oral y faríngea. (Blumenthal et al. 1998). La ESCOP (2003) y la BHP (1996) la aprobaron para el tratamiento de cortes superficiales, inflamaciones menores de la piel y de la mucosa oral, heridas y ulcus cruris.

La indicación terapéutica es para el tratamiento de inflamaciones menores de la piel y la mucosa, además se puede utilizar como una ayuda en el tratamiento de heridas menores.

Las flores se usan por sus propiedades antiflogística, antiséptica, antiespasmódica, astringente, diaforética, antibacteriana, cicatrizante, antiinflamatoria, emenagogo e inmunomoduladora. Se emplean en caso de acné, contusiones, golpes, torceduras, eczemas, quemaduras, picaduras de insectos, irritaciones cutáneas, amenorrea, dismenorrea y vulvovaginitis (Olivera Garrido et al., 2012).

3.8 Propiedades farmacológicas

Las flores de *C. officinalis* demostraron que poseen varios efectos farmacológicos, algunos de los cuales son de gran importancia, en especial para su posible desarrollo a futuro.

Actividad dérmica

Según Pommier et al. (2004) la caléndula se debería proponer como un tratamiento preventivo para pacientes que irradiados con quimioterapia luego de haber sido operados por cáncer de mama, ya que en un estudio comprobaron que la caléndula es estadísticamente más efectiva que la trolamina (tratamiento utilizado regularmente para este propósito en Francia) para prevenir una dermatitis aguda de grado 2 o mayor; además observaron una reducción de los dolores inducidos por la radiación. A diferencia de este último estudio Sharp et al. (2012) señalaron que en su investigación no se encontraron diferencias entre una crema de caléndula (caléndula Weleda®) y una crema Essex® (una crema acuosa con parabenos de Schering-Plough) en el tratamiento para reducir las severas reacciones de la piel producidas por radiación aguda.

En un estudio in vivo en ratas, al aplicar el extracto de caléndula como ungüento en combinación con alantoína, se observó la estimulación de la epitelización de heridas quirúrgicas. En conejos el tiempo de cicatrización completa se acortó en un 25%. La actividad de un extracto etanólico de las flores fue investigado para evaluar su actividad en quemaduras térmicas inducidas en ratas, observándose que a determinadas dosis se obtuvo una mejoría significativa por incremento de hidroxiprolina colágeno y contenidos de hexosamina (ESCOP, 2003).

El extracto de caléndula analizado por Fonseca et al. (2010) demostró actividad antioxidante in vitro contra varios radicales. En el estudio se observó que el extracto de caléndula es capaz de estimular la proliferación de los fibroblastos de los ratones, aunque a concentraciones mayores se observaron efectos tóxicos. Esto coincide con lo observado en una cepa de células humanas por Matysik et al (2005), que determinaron en concentraciones pequeñas que el extracto de Caléndula estimulaba la proliferación de fibroblastos humanos, pero a mayores concentraciones podía ser tóxico. Es por esto que se sugieren la potencial aplicación de un extracto de caléndula contra daños en la piel producidos por radiación UV.

Se sugiere su uso para tratar la queilitis exfoliativa, ya que un ungüento al 10% demostró ser efectiva en un paciente en un estudio realizado por Roveroni-Favaretto et al. (2009). El estudio se realizó sobre un solo paciente.

La fracción de polisacáridos existentes en las flores de caléndula contribuye a los efectos terapéuticos en la mucosa irritada debido a que en un estudio en porcinos se observó baja viscosidad en procesos de fuerte adhesión dependientes de concentración (ESCOP 2003). Además, se observó que los polisacáridos estimulaban la fagocitosis de los granulocitos humanos, demostrando actividad inmunoestimulante.

Actividad antiinflamatoria

Con respecto a la inflamación, Muley et al. (2009) señalaron que una fracción soluble en acetato de etilo demostró la inhibición más potente en ratones utilizando indometacina como droga de referencia.

Actividad anti-edematosa

Muley et al. (2009) señalaron que los ésteres de faradiol con ácido mirístico, y ácido palmítico en combinación con taraxasterol poseían actividad anti-edematosa, y que cuando se duplicaba la concentración de los esteres de faradiol, la inhibición del edema también aumenta.

Actividad anti VIH

Se observó que una tintura 70% hidroalcohólica de la flor de Caléndula tiene alta actividad contra los virus de la influenza y una marcada habilidad para suprimir el crecimiento del virus herpes simplex (ESCOP 2003); Se destaca un estudio en el cual un extracto (diclorometano: metanol 1:1) de caléndula demostró actividad anti – VIH en un ensayo in vitro basado en MTT (Muley et al. 2009).

Actividad antibacteriana y anti-fúngica

Se demostró esta actividad en un ensayo en el que se evaluó un extracto metanólico al 10% sobre bacterias periodontales anaerobias y aerobias facultativas, cuyos resultados indicaron una marcada inhibición contra todos los microorganismos ensayados (principalmente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.*, *Furobacterium nucleatum*, *Caphocytophaga, gingivalis*, *Veilonella parvula*, *Eikenellacorrodens*, *Peptostreptococcus micros* and *Actinomyces odontolyticus*), (Muley et al 2009).

En cuanto a la actividad anti-fúngica se analizó el aceite esencial de las flores contra varias cepas de hongos (principalmente *Candida albicans* (ATCC64548), *Candida dubliniensis* (ATCC777), *Candida parapsilosis* (ATCC22019), *Candida glabrata* (ATCC90030), *Candida krusei* (ATCC6258), y levadura aislada de humanos, viz, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Rhodotorella spp.*, (Muley et al. 2009).

Actividad anti-cancerígena

Una fracción enriquecida con triterpenos obtenidos de la planta de caléndula administrada por vía oral a ratones con carcinoma Ehrlich previno el desarrollo de ascitis e incremento la supervivencia en comparación con el grupo control (ESCOP 2003).

Por otra parte Re et al. (2009) demostraron mediante análisis toxicológicos (TTC) que un extracto alcohol / agua con dosis de hasta 500 mg/kg/día no producían cambios significativos en la masa corporal en ratas; además, estableció una dosis de seguridad de 300 mg para una persona de 60 kilogramos.

4. Materiales y métodos

Se recibieron 9 muestras de *C. officinalis* de la Universidad de Luján, provenientes de plantas cultivadas en diferentes épocas del año y tratadas o no con fertilizante, que se analizaron utilizando Cromatografía en capa delgada (TLC); además, se valoró espectrofotométricamente el contenido de flavonoides. Los procesos señalados se realizaron en base a FA VIII.

El fertilizante utilizado tenía una composición de 9 % de nitrógeno, 46 % de fósforo, 2 % de azufre y 8 % de calcio. El fertilizante se aplicó a la siembra, junto a la línea de siembra. Las cantidades fueron las estándares utilizadas en cultivos intensivos.

A las muestras se les extrajeron manualmente los pétalos de las flores, se secaron a 40°C y posteriormente se trituraron con la ayuda de un molino y un mortero para llevarlas a polvo. (Muestras 1, 3, 5, 11, 17, 18, 21, 22, 33).

Luego del análisis realizado a estas muestras se recibieron dos nuevas muestras frescas, identificadas como 40 y 41. Ambas muestras fueron desecadas en las siguientes condiciones: a 100°C en estufa durante 4 horas y luego se trituraron con un molino y posteriormente con ayuda de un mortero se llevaron a polvo.

4.1 Condiciones de las muestras

Numero de bolsa	Fecha de siembra	Dosis fertilizante (Kg/ha)
1	13/05/2011	50
3	01/07/2011	0
5	10/06/2011	100
11	13/05/2011	100
17	10/06/2011	50
18	01/07/2011	100
21	13/05/2011	0
22	10/06/2011	0
33	01/07/2011	50

Tabla 1: Fecha de siembra y dosis de fertilizante correspondiente a las muestras entregadas por los investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Lujan

4.2 Cromatografía en capa delgada

4.2.1 Materiales

- *Ácido cafeico Sigma Aldrich*
- *Ácido clorogénico Sigma Aldrich*
- *Rutina Fluka*
- *Difenilborinato de 2-aminoetilo p.a. Fluka*
- *Ácido fórmico p.a. Cicarelli*
- *Metanol p.a. J.T. Baker*
- *Acetato de etilo p.a. J.T. Baker*
- *TLC sílica gel 60 F₂₅₄, Folios de aluminio N° 105553 (MerckMillipore)*
- *Balanza Shimadzu modelo: AUW220D*

4.2.2 Condiciones cromatográficas

Fase estacionaria: Sílica gel 60 F254

Fase móvil: Acetato de etilo: ácido fórmico: agua (80:10:10)

Revelado: Solución 1% de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol (NPR)

Volumen sembrado: 50 µl

4.2.3 Preparación de soluciones

Solución muestra: Las flores de Caléndula se redujeron a polvo. Se pesó 1.0 g de la droga y se extrajo a reflujo durante 10 minutos con 10.0 ml de metanol. El contenido del balón se enfrió, se filtró por papel de filtro y el filtrado se colocó en un matraz de 25 ml y se llevó a volumen con metanol.

Solución estándar: Se disolvieron 1.0mg de ácido caféico, 1.0mg de ácido clorogénico y 2.5mg de rutina en 10mL de metanol.

Revelador: Se disolvieron 0.5g de difenilborinato de 2-aminoetilo en 25 ml de metanol

4.2.4 Procedimiento

Se aplicaron 50 µl de cada una de las soluciones muestras y de la solución testigo en bandas de 1 cm. Se dejaron secar las aplicaciones y se desarrollaron los cromatogramas hasta que el frente del solvente recorrió aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Se retiró la placa de la cámara, se marcó el frente del solvente y se dejó secar entre 100° y 105°C. Se pulverizó la placa con revelador, se secó al aire y se examinó la placa bajo luz ultravioleta a 365 nm.

4.2.5 Resultados y discusión

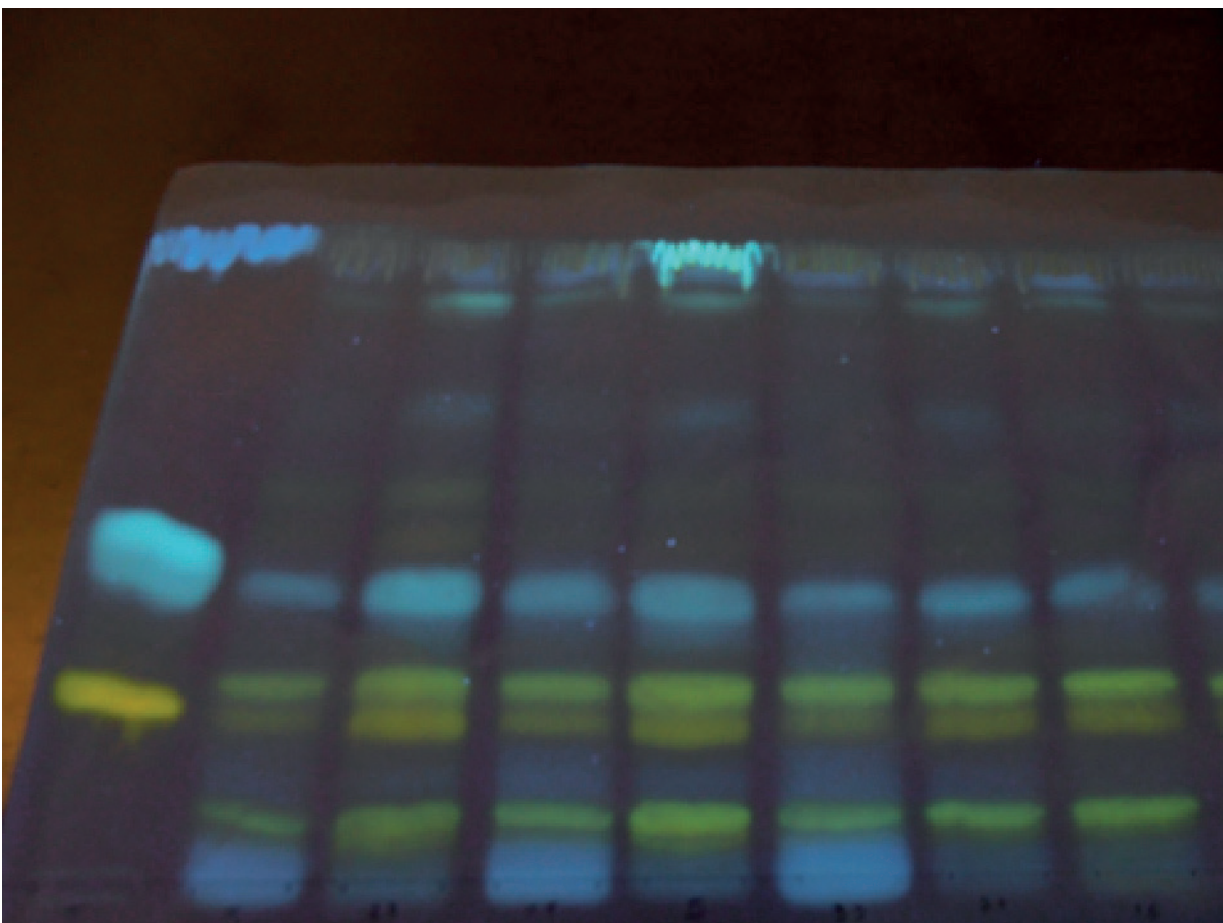


Fig. 2: cromatograma de solución testigo y muestras 1, 22, 11, 5, 33, 21, 18, 17, 3. FE: Sílica gel 60 F₂₅₄; FM: Acetato de etilo: ácido fórmico: agua (80:10:10); Revelador (NPR); Vol. Sembrado: 50 µl.

RF/muestra	Testigo	1	22	11	5	33	21	18	17	3
0.0(celeste) (A)		++	+	+++	+++	+++	+	-	-	+
0.09 (verde) (B)		+	+++	++	+++	+	+	++	++	++
0.21 - Rutina (amarilla) (C)	+++	+	+++	+	+++	+	+	++	++	+
0.26 (verde) (D)		+	+++	++	+++	++	++	+++	++	+
0.50 - Ác. clorogénico (celeste) (E)	+++	+	+++	++	+++	++	++	++	+	+
0.87(verde) (F)		+	+++	+	+++	+	++	++	+	+
0.92(celeste) (G)		+	++	+++	+++	++	+	++	++	++
1.0 - Ác. caféico (celeste)	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-

Tabla 2: Valores de RF de bandas de fluorescencia detectadas en las muestras. Entre paréntesis se detalla el color correspondiente a la fluorescencia observada a 365nm luego del revelado con NPR. Intensidad: Se utilizó un sistema en el cual se analizaron las bandas de fluorescencia en una escala del 1 al 3, siendo 3 la de mayor intensidad. Las muestras 40 y 41 no figuran en la tabla ya que no se pudieron identificar ninguna de las bandas correspondientes.

Según lo establecido en la FA VIII el cromatograma obtenido con la solución estándar debe presentar tres bandas de fluorescencia, una pardo amarillenta en la parte inferior correspondiente a la rutina, otra celeste en la parte media correspondiente al ácido clorogénico y la tercera también en la parte superior correspondiente al ácido caféico. El cromatograma obtenido con la solución muestra debe presentar entre otras, una banda de fluorescencia pardo amarillenta con el mismo valor de la correspondiente a la rutina obtenida a partir de la solución estándar. Además debe presentar, una banda de fluorescencia verde amarillenta por debajo de la banda correspondiente a la rutina y otra de fluorescencia celeste por encima de la banda correspondiente al ácido clorogénico obtenida en el cromatograma de la solución estándar; una banda de fluorescencia verde amarillenta por encima y otra de fluorescencia celeste por debajo de la correspondiente al ácido caféico obtenida en el cromatograma de la solución estándar

- Las muestras 3 y 1 son las que obtuvieron menor intensidad en todas sus bandas
- La muestra 5 presentó la mayor intensidad en todas las bandas, excepto en la A
- La muestra 22 es similar a la 5, con la excepción de la banda G (correspondiente a la banda de ácido caféico)
- La muestra 1 presenta trazas de la banda F
- Las muestras 18 y 17 no presentan la banda A
- Las muestras 33, 11 y 1 que presentan una intensidad similar en la banda A tienen poca intensidad en las bandas C (correspondiente a la Rutina) y F
- Las muestras que presentan poca intensidad en la banda A tienen mayor intensidad en la banda F
- Las muestras 40 y 41 no presentan ningún tipo de bandas

4.3 Valoración espectrofotométrica

4.3.1 Materiales

- Cloruro de aluminio p.a. Sigma
- Hexametilentetramina p.a. Sigma
- Carbonato de sodio anhidro p.a. J.T. Baker
- PEG 4000
- Balanza Shimadzu modelo: AUW220D
- Espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu, modelo: UV-1800

4.3.2 Preparación de la muestra

Se calentó a reflujo en un balón de 100 ml durante 30 minutos, 0.800 g de la droga reducida a polvo fino, 1,0 ml de la solución al 0.5% de hexametilentetramina, 20 ml de acetona y 7 ml de ácido clorhídrico. Se filtró a través de algodón absorbente y se transfirió a un matraz de 100 ml. Se agregó el algodón al residuo en el balón y se extrajo a reflujo con dos porciones de 20 ml de acetona durante 10 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de algodón, se reunieron los extractos, se filtraron a través de un papel de filtro y se transfirió el filtrado al matraz. Se completó a volumen con acetona lavando el balón y el filtro. Se transfirieron 20,0 ml de la solución anterior a una ampolla de decantación, se agregaron 20 ml de agua y se extrajo con 15, 10, 10 y 10 ml de acetato de etilo. Se combinaron los extractos en una ampolla de decantación, se los lavó con dos porciones de 50 ml de agua, se filtró sobre 10 g de sulfato de sodio anhidro y se transfirieron a un matraz aforado de 50 ml. Se llevó a volumen con acetato de etilo.

Se transfirieron 10.0 ml de la preparación de la muestra a un matraz de 25 ml. Se agregó 1 ml de solución de cloruro de aluminio y se llevó a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5% v/v.

4.3.3 Preparación de las soluciones de reactivos

Solución de cloruro de aluminio: Se disolvieron 2,0 g de cloruro de aluminio en 100 ml de una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Solución de compensación: Se transfirieron 10,0 ml de la preparación muestra a un matraz aforado de 25 ml, se agregó 1 ml de *solución de cloruro de aluminio* y se llevó a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

4.3.4 Procedimiento

Se determinó la absorbancia de la *solución problema* luego de 30 minutos por comparación con la *solución de compensación*, a 425 nm. Se calculó el porcentaje total de flavonoides como hiperósido, empleando 500 como coeficiente de extinción específica ϵ (1 %, 1 cm), por la fórmula siguiente: $1,25 A/P$, en la cual A es la absorbancia a 425 nm y P es el peso en g de la droga en polvo empleada para preparar la *preparación muestra*.

4.3.5 Resultados y discusión

Muestra	Contenido de flavonoides (% calculado como hiperósido)
1	0.19
5	0.44
22	0.56
11	0.29
3	0.25
18	0.50
17	0.48
33	0.27
21	0.35
A	0.05
N	0.06

Tabla 3: porcentaje total de flavonoides calculado como hiperósido de cada muestra según la fórmula explicitada anteriormente

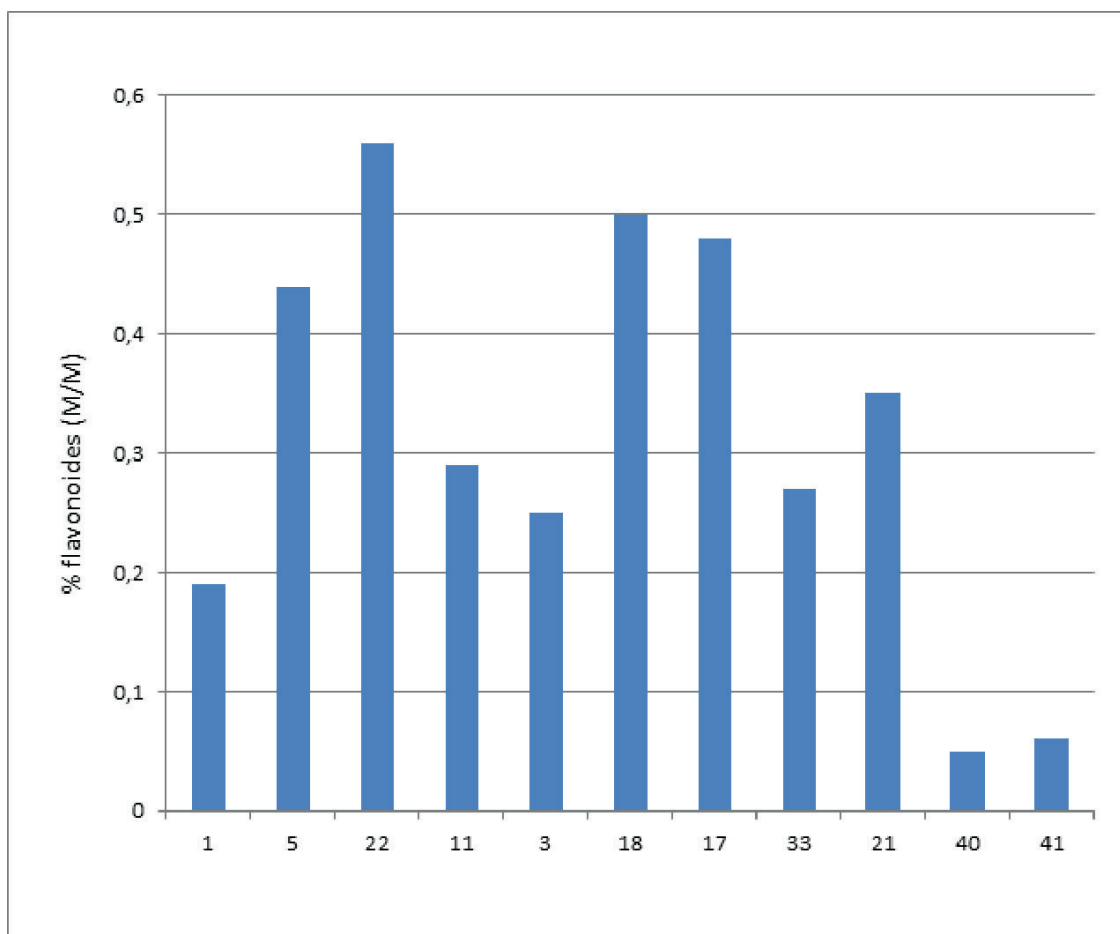


Fig. 3: Contenido de flavonoides expresado en % (M/M) calculados como hiperósido.

De acuerdo a lo calculado se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- Las muestras 1, 11, 3, 33, 21, 40 y 41 no cumplen con el 0.4% de flavonoides calculados como hiperósido que establece la Farmacopea Argentina 8va. ed. como límite para el contenido de los mismos en las flores de *Caléndula officinalis*.
- Cumplen las muestras 5, 22, 18 y 17.

5. Conclusiones

La finalidad del presente trabajo fue la de correlacionar una variable del manejo agronómico del cultivo de Caléndula, el uso de fertilizantes, con la calidad de la droga vegetal (flores de Caléndula) resultante. Por este motivo se eligió como parámetro de calidad el cumplimiento de los requisitos establecidos en la FA VIII, ya que el uso de la Caléndula es medicinal y/o cosmético. Los resultados obtenidos permiten concluir que todas las muestras analizadas, excepto las muestras 40 y 41, cumplen con el perfil cromatográfico cualitativo de flores de *C. officinalis* descripto por la FA VIII.

Con respecto a lo analizado en la técnica de espectrofotometría se observó que varias muestras no cumplían con el requisito, por lo que estas no se aconsejarían para su uso como producto farmacéutico. Se analizó la relación entre el color de las muestras y la cantidad de flavonoides presente en las mismas, destacando que las muestras con más color amarillo/anaranjado son las que mayor contenido de flavonoides arrojaron, lo que podría significar una relación directa pero para confirmar esto se deben realizar más estudios. Es posible que la forma de secado influya en el contenido de flavonoides y sería un factor a optimizar.

La variable analizada en cuanto al manejo agronómico del cultivo fue la fertilización. El fertilizante utilizado tenía 9% de nitrógeno, 46% de fósforo, 2% de azufre y 8% de calcio. Tenía un alto contenido de fósforo ya que los investigadores de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Luján consideran que es una variable limitante en los suelos de la provincia de Buenos Aires. De las condiciones de siembra se pudo concluir que es óptimo el cultivo durante el mes de Junio, ya que las tres muestras sembradas durante este mes (sin fertilizante, con 50 kg/ha y con 100 kg/ha) dieron los mayores contenidos de flavonoides (entre 0.44% y 0.56%), En el caso de cultivos con fertilizante (100 kg/ha) se obtuvieron rendimientos aceptables con fecha de siembra en el mes de Julio (0.50%). Sin embargo al comparar estas muestras entre sí, se observa que es mayor el rendimiento obtenido en plantas sembradas en el mes de Junio aun sin la presencia de fertilizante. Esto podría indicar que el uso de fertilizante no incide en la concentración de los flavonoides, aunque se precisan estudiar más muestras para confirmar esta conclusión. Sin embargo, es importante destacar que estos resultados se refieren al contenido de flavonoides de las flores de *C. officinalis* y no se analiza el rendimiento en cantidad de material vegetal que pudiera obtenerse con la aplicación del fertilizante.

En el presente trabajo no se analizó la influencia de las condiciones de secado de las muestras. Las muestras 40 y 41 si fueron desecadas en condiciones controladas en el laboratorio de la Universidad de Belgrano pero para analizar la influencia de este proceso se precisan mayores estudios al respecto dado que la información recolectada no era la adecuada para este proceso.

A modo de reflexión es interesante señalar la posible inconsistencia en los métodos farmacopeicos por valorar los flavonoides como sinónimo de actividad farmacológica, ya que la mayoría de la evidencia apunta tanto a los carotenoides como al aceite esencial como los responsables de la mayor cantidad de efectos farmacológicos. Esto coincide, por otra parte, con el uso generalizado de oleados de flores de Caléndula, en los cuales se extraen eficientemente estos compuestos lipofílicos pero no se encuentran glicósidos flavonoides debido a que estos son lipofóbicos.

6. Referencias

1. Acosta de la Luz L, Rodríguez Ferradá C, Sánchez Govín E (2001). Instructivo técnico de caléndula officinalis. Revista Cubana plantas medicinales (1):23-7.
2. Araújo CBO, Santos AM, Fernandes LA, Martins ER, Sampaio RA, Costa CA, Leite GLD. Uso da adubação orgânica e cobertura morta na cultura da caléndula (*Calendula officinalis* L.). Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais
3. Bortolo DPG, Marques PAA, Pachecho AC (2009). Teor e rendimento de flavonóides em caléndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. Revista Brasileira Plantas Medicinales, Botucatu, v.11, n.4, p.435-441.
4. Denardi Roveroni-Favaretto L, Bortolin Lodi K, Dias Almeida J (2009). Topical *Calendula officinalis* L. successfully treated exfoliative cheilitis: a case report. *Cases Journal* 2:9077.
5. *ESCOPE Monographs-2nd Edition-2003, pág. 58*
6. Farmacopea Argentina VII edición.
7. Farmacopea Brasileira 5 edición.
8. Fonseca YM, Catini CD, Vicentini F, Nomizoa A, Gerlachb RF, Vieira Fonseca MJ (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology* 127 596-601.
9. García D, Sánchez E, Crespo M, Carballo C(1996) Estudio farmacognóstico de caléndula. Revista Cubana Plantas Medicinales 1(3):21-25.
10. Govín M, Sánchez E, González H, Carballo Guerra C, Milanés Figueredo M (2005). Influencia de los abonos orgánicos y biofertilizantes en la calidad de las especies medicinales *Calendula officinalis* L. y *Matricaria recutita* L. Revista Cubana Plantas Medicinales v.10 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr.
11. The Herb Society of America, 9019 Kirtland Chardon Rd., Kirtland, OH, 44094, (440) 256-0514
12. Khan MU, Rohilla A, Bhatt D, Afrin S, Rohilla S, Ansari SH (2011). Diverse Belongings of *Calendula officinalis*: An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(3): 173-177.
13. Kurowska A. Qualitative and quantitative analysis of phenolics acids in *Calendula officinalis* *Influorescens* (1985). *Acta Pol Pharm* 42(5):473-7.
14. Lastra Valdés H, Piquet García R(1999). *Calendula officinalis*. Revista Cubana Farmacología 33(3): 188-94.
15. Moreira PA, Marchetti ME, Vierira MC, Novelino JO, Goncalves MC, Robaina AD (2005). Desenvolvimento vegetativo e teor foliar de macronutrientes da caléndula (*Calendula officinalis* L.) adubada com nitrogênio e fósforo. Revista Brasileira Pantas Medicinales, Botucatu, v.8, n.1, p.18-23.
16. Moore T, Sánchez Villarreal LP, Desmarchelier C. Manual de Cultivo y Manejo de Caléndula. Asociación Argentina de Fitomedicina (2005).
17. Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB (2009). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (5): 455-465.
18. Muñoz Centeno LM (2004). Plantas medicinales españolas caléndula officinalis L. (Asteraceae). *Medicina naturista* N 5: 257-261.
19. Ociosziynska Y (1977). Study of the chemistry of *C. officinalis* *inflourescences*. *Herba Pol* 23(3):191-9.
20. Pinteá A, Bele C, Andrei S, Socaciu C (2003). HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis* Volume 47(1-4):37-40.
21. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X (2004). Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of clinical oncology* 22:8.
22. Re TA, Mooney D, Antignac E, Dufour E, Bark I, Srinivasan V, Nohynek G (2009). Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food and Chemical Toxicology* 47 1246–1254.
23. Saini P, Al-Shibani N, Sun J, Zhang W, Song F, Gregson KS, Windsor LJ (2012). Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopaty* 101, 92-98.

24. Sharp L, Finnilä K, Johansson H, Abrahamsson M, Hatschek T, Bergenmar M (2012). No differences between Calendula cream and aqueous cream in the prevention of acute radiation skin reactions e Results from a randomised blinded trial. *European Journal of Oncology Nursing* 1-7.
25. WHO (1998). WHO Selected Plants Monographs: Vol. 2: Flos Calendulae <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/>

7. Anexo

Anexo 1: Cálculos correspondientes a la valoración espectrofotométrica de las muestras de Caléndula.

Muestra 1:

Peso: 0.80879

Medición: 0.127

$$1.25 \times 0.127 / 0.80879 = 0.196\%$$

Muestra 5:

Peso: 0.79902

Medición: 0.284

$$1.25 \times 0.284 / 0.79902 = 0.449\%$$

Muestra 22:

Peso: 0.80264

Medición: 0.366

$$1.25 \times 0.366 = 0.569\%$$

Muestra 11:

Peso: 0.8109

Medición: 0.192

$$1.25 \times 0.192 / 0.8109 = 0.295\%$$

Muestra 3:

Peso: 0.7911

Medición: 0.163

$$1.25 \times 0.163 / 0.7911 = 0.257\%$$

Muestra 18:

Peso: 0.7963

Medición: 0.323

$$1.25 \times 0.323 / 0.7963 = 0.507\%$$

Muestra 17:

Peso: 0.7978

Medición: 0.312

$$1.25 \times 0.7978 / 0.312 = 0.488\%$$

Muestra 33:

Peso: 0.8083

Medición: 0.175

$$1.25 \times 0.175 / 0.8083 = 0.270\%$$

Muestra 21:

Peso: 0.7984

Medición: 0.240

$$1.25 \times 0.240 / 0.7984 = 0.357\%$$

Muestra 40:

Peso: 0.7566

Medición: 0.033

$$1.25 \times 0.03 / 0.7566 = 0.05\%$$

Muestra 41:

Peso: 0.8122

Medición: 0.039

$$1.25 \times 0.039 / 0.8122 = 0.06\%$$

Anexo 2: Fotografías de las placas obtenidas por cromatografía en capa delgada

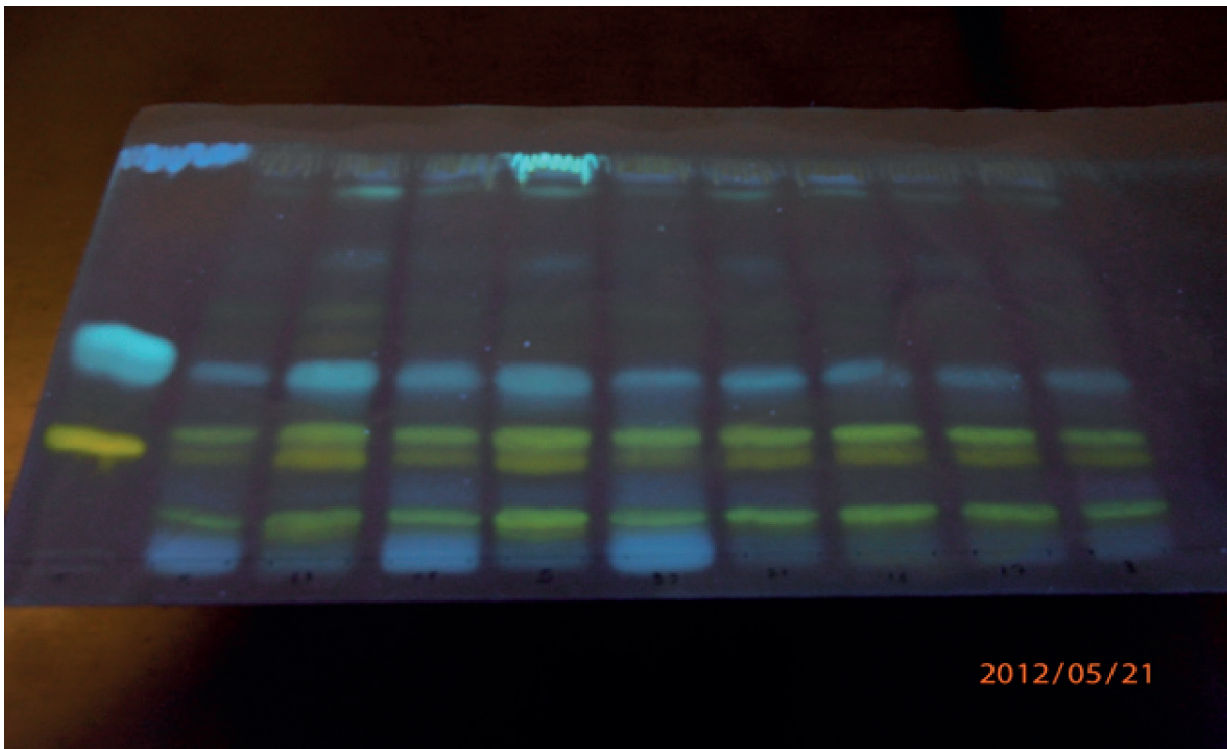


Fig. 4: cromatograma correspondiente a las muestras 1, 22, 11, 5, 33, 21, 18, 17, 3 y a la solución testigo.

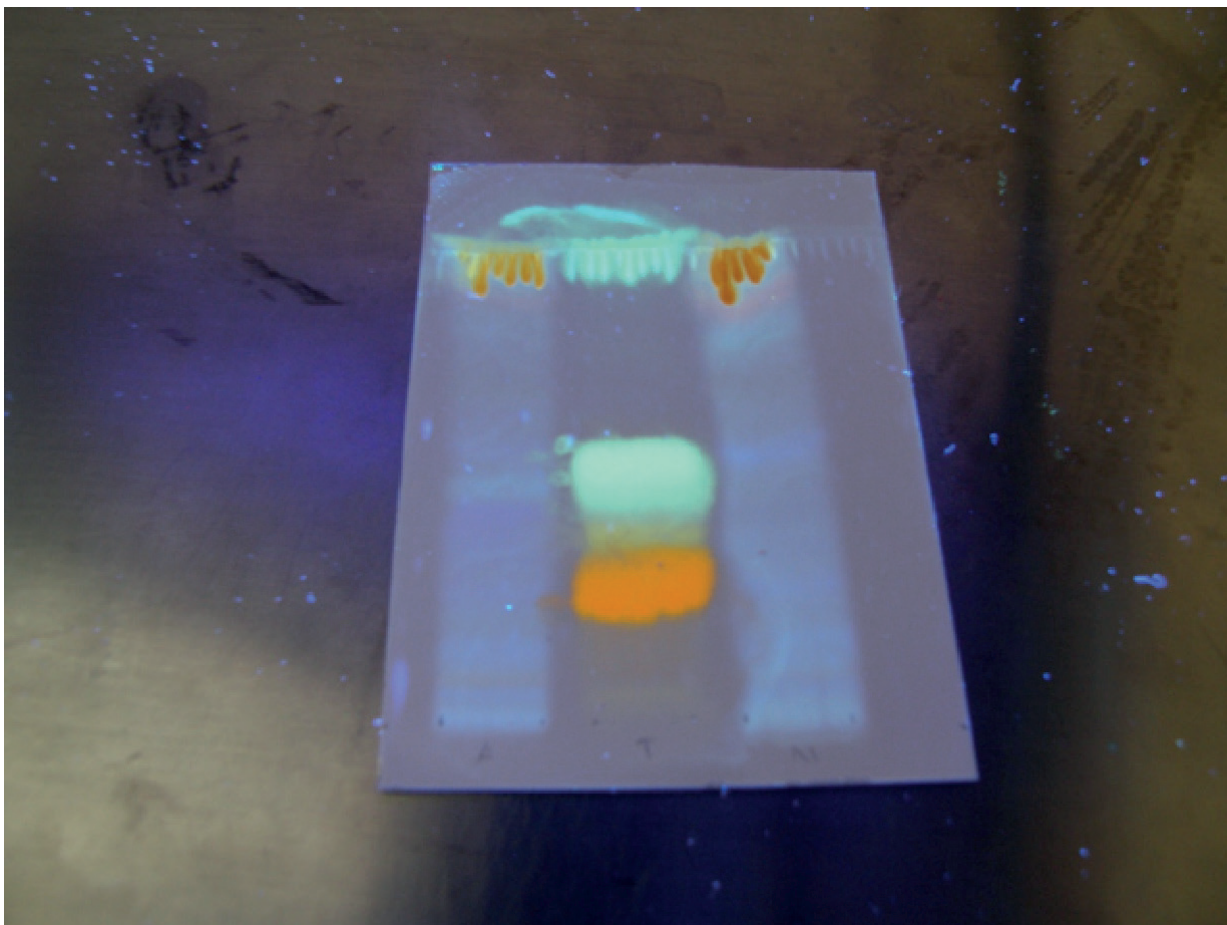


Fig. 5: cromatograma correspondiente a las muestras 40, 41 y a la solución testigo.

Anexo 3: Monografía *C. officinalis*, Farmacopea Argentina VIII edición, tercer volumen.

CALENDULA, flor

Definición - Caléndula consiste en las flores liguladas completamente abiertas, separadas del receptáculo, desecadas, enteras o fragmentadas, de los capítulos simples, semidobles de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Debe contener no menos de 0,4 por ciento de flavonoides totales, calculado como hiperósido sobre la droga desecada y debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactivos bien cerrados, en un sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A - Características macroscópicas - Flores liguladas femeninas de 20 a 30 mm de longitud por 5 a 7 mm de diámetro, de color amarillo o amarillo anaranjado a pardo anaranjado, son pilosas, con tres dientes en el ápice de la ligula; tubo corolino de color pardo amarillento o pardo anaranjado, estilo bifido, ovario de color pardo amarillento a pardo anaranjado, los frutos son aquenios curvados, naviculares, con el dorso cubierto de espinas cortas de color pardo verdoso y sin vilano. Flores tubulosas masculinas con corola de aproximadamente 5 mm de longitud, 5-lobulada, de color amarillo, rojo anaranjado o rojo violáceo, pilosa en la parte inferior.

B - Características microscópicas - En el material diafanizado se observan en vista superficial flores liguladas, fragmentos de la corola cuya epidermis interna está compuesta por células elongadas longitudinalmente, con paredes delgadas y cutícula estriada; en el parénquima en el parénquima subyacente se observa gran cantidad de glóbulos oleíferos de color amarillo-anaranjado y en la base de la corola las células epidérmicas muestran las paredes más engrosadas y con diminutos cristales o drusas de oxalato de calcio; la epidermis externa es similar a la interna excepto por presentar escasos estomas de tipo anomocítico. Se observan tricomas simples, presentes en la base de la corola, ellos son biseriados, largos, cónicos con ápice redondeado, con células de paredes ligeramente engrosadas. En la corola y en la pared del ovario se encuentran tricomas glandulares de dos tipos: uniseriados, con un pie de 3 a 5 células, ocasionalmente pueden ser biseriados con 3 a 4 células por serie; los tricomas glandulares del segundo tipo son sésiles y en todos los casos las cabezas son pluricelulares. Se encuentran fragmentos con papilas estigmáticas, cortas y bulbosas, con granos de polen, retenidos, esfé-

ricos de hasta 40 µm de diámetro, con tres poros germinativos y exina con espinas; fragmentos de la pared del ovario, con células poligonales, las que contienen abundantes pigmentos de color marrón; fruto aquenio, de forma navicular con el dorso espinoso, de color pardo oscuro; restos de corolas de las flores tubulosas, abundantes fragmentos de filamentos y anteras y fragmentos de endotecio de las anteras.

C - Droga en polvo - El polvo es de color pardo amarillento. Presenta fragmentos de las corolas conteniendo gotitas de aceite de color amarillo claro, algunos con abundantes estomas anomocíticos, grandes, otros conteniendo prismas y drusas de oxalato de calcio; pelos glandulares con un pie uniseriado o biseriado (pluricelular); granos de polen esféricos, de hasta 40 µm de diámetro, con una exina fuertemente espinulosa y tres poros germinativos. Ocasionalmente muestra fragmentos de los estigmas con papilas cortas y bulbosas.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. *Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Ácido fórmico, acetato de etilo y agua (80:10:10).

Solución estándar - Disolver 1,0 mg de ácido cafeico, 1,0 mg de ácido clorogénico y 2,5 mg de rutina en 10 ml de metanol.

Solución muestra - Calentar a reflujo durante 10 minutos 1,0 g de droga reducida a polvo con 10,0 ml de metanol. Enfriar y filtrar.

Revelador - Solución al 1 % de difenilborinato de 2-aminoenilo en metanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 µl de la *Solución muestra* y 20 µl de la *Solución estándar*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y secar entre 100 y 105 °C. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, dejar secar al aire y examinar la placa bajo luz ultravioleta a 365 nm. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* debe presentar tres bandas de fluorescencia pardo amarillenta en la parte inferior correspondiente a la rutina, otra celeste en la parte media correspondiente al ácido clorogénico y la tercera también celeste en la parte superior correspondiente al ácido cafeico. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* debe presentar entre otras, una banda de fluorescencia pardo amarillenta con el mismo valor de R_f que la correspondiente a la rutina obtenida a partir de la

Solución estándar. Además debe presentar, una banda de fluorescencia verde amarillenta por debajo de la banda correspondiente a la rutina y otra de fluorescencia celeste por encima de la banda correspondiente al ácido clorogénico obtenida en el cromatograma de la *Solución estándar*; una banda de fluorescencia verde amarillenta por encima y otra de fluorescencia celeste por debajo de la correspondiente al ácido cafeico obtenida en el cromatograma de la *Solución estándar*.

Cenizas totales (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No más de 10,0 %.

Control higiénico (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Límite de metales pesados <590>

Método I. No más de 0,001 %.

Materia extraña (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

No debe contener más de 5 % de brácteas y no más de 2,0 % de otros elementos extraños.

Pérdida por secado (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Secar entre 100 y 105 °C durante 2 horas 1,0 g de droga reducida a polvo: no debe perder más de 12,0 % de su peso.

Residuos de pesticidas (ver 630. *Métodos de Farmacognosia*)

Debe cumplir con los requisitos.

VALORACIÓN

Preparación muestra - Calentar a reflujo en un balón de 100 ml durante 30 minutos, 0,800 g de la droga reducida a polvo fino, 1,0 ml de la solución al 0,5 % de hexametilentetramina, 20 ml de acetona y

7 ml de ácido clorhídrico. Filtrar a través de algodón absorbente y transferir a un matraz de 100 ml. Agregar el algodón al residuo en el balón y extraer a reflujo con dos porciones de 20 ml de acetona a reflujo durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar a través de algodón, reunir los extractos y filtrar a través de un papel de filtro y transferir el filtrado al matraz. Completar a volumen con acetona lavando el balón y el filtro. Transferir 20,0 ml de la solución anterior a una ampolla de decantación, agregar 20 ml de agua y extraer con 15, 10, 10 y 10 ml de acetato de etilo. Combinar los extractos en una ampolla de decantación, lavar con dos porciones de 50 ml de agua, filtrar sobre 10 g de sulfato de sodio anhidro y transferir a un matraz aforado de 50 ml. Completar a volumen con acetato de etilo y mezclar.

Solución de cloruro de aluminio - Disolver 2,0 g de cloruro de aluminio en 100 ml de una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Solución problema - Transferir 10,0 ml de la *Preparación muestra* a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1 ml de *Solución de cloruro de aluminio* y completar a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Solución de compensación - Transferir 10,0 ml de la *Preparación muestra* a un matraz aforado de 25 ml y completar a volumen con una solución de ácido acético glacial en metanol al 5 % v/v.

Procedimiento - Determinar la absorbancia de la *Solución problema* luego de 30 minutos por comparación con la *Solución de compensación*, a 425 nm. Calcular el porcentaje total de flavonoides como hiperósido, empleando 500 como coeficiente de extinción específica E (1 %, 1 cm), por la fórmula siguiente:

$$1,25A/P$$

en la cual A es la absorbancia a 425 nm y P es el peso en g de la droga en polvo empleada para preparar la *Preparación muestra*.

Anexo 4: Monografía de Calêndula, Farmacopea Brasileira 5 edição.

714 Farmacopeia Brasileira, 5ª edição

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Estimulante central.

CALAMINA

ZnO: 81,41
calamina: 01646
Calamina
[8011-96-9]

Calamina é óxido de zinco com uma pequena proporção de óxido de ferro, e contém, após ignição, não menos que 98,0% e não mais que 100,5% de óxido de zinco (ZnO).

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó amorfo, não palpável, róseo ou marrom avermelhado, dependendo da cor da variedade e da quantidade do óxido férrico presente, bem como do processo pelo qual é incorporado.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água. Dissolve com efervescência em ácido clorídrico.

IDENTIFICAÇÃO

A. Dissolver 1 g da amostra com 10 mL de ácido clorídrico 3 M e filtrar. O filtrado responde às reações do íon zinco (5.3.1.1).

B. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de ácido clorídrico 3 M, aquecer à fervura, e filtrar. O filtrado assume coloração avermelhada após a adição de tiocianato de amônio SR.

ENSAIOS DE PUREZA

Cálcio. Fazer a digestão de 1 g da amostra em 25 mL de ácido clorídrico 3 M por 30 minutos. Filtrar para remover o óxido férrico insolúvel, adicionar hidróxido de sódio 6 M ao filtrado, até que o primeiro precipitado que se forma é redissolvido, em seguida adicionar mais 5 mL de hidróxido de sódio 6 M. A 10 mL desta solução adicionar 2 mL de oxalato de amônio a 3,5% (p/v). Não mais que uma leve turbidez é produzida.

Cálcio ou Magnésio. A outra porção de 10 mL da solução preparada para o teste de *Cálcio*, adicionar 2 mL de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado a 12% (p/v). Não mais que uma leve turbidez é produzida.

Chumbo. Para 1 g da amostra, adicionar 15 mL de água, agitar, adicionar então 3 mL de ácido acético glacial, aquecer em banho-maria até dissolver. Filtrar e adicionar cinco gotas de cromato de potássio SR. Nenhuma turvação é formada.

Substâncias insolúveis em ácido. Pesar 2 g e adicionar 50 mL de ácido clorídrico 3 M. Se um resíduo insolúvel remanescer, coletar em um filtro tarado, lavar com água e secar a 105 °C por 1 hora, esfriar e pesar. O peso do resíduo não excede 40 mg (2,0%).

Substâncias alcalinas. Fazer a digestão de 1 g com 20 mL de água em banho-maria por 15 minutos, filtrar, adicionar duas gotas de fenoftaleína SI. Se uma cor vermelha é produzida, não mais que 0,2 mL de ácido sulfúrico 0,05 M é requerido para removê-la.

Arsênio (5.3.2.5). Utilizar o *Método 1*. Utilizar solução de ácido sulfúrico 3,5 M e solução de cloreto estânico a 40% (p/v) em ácido clorídrico. O limite é de 0,0008% (8 ppm).

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Pesar cerca de 2 g da amostra, calcinar a 500 °C até peso constante. No máximo 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Pesquisa e identificação de patógenos (5.5.3.1.3). Cumpra o teste para ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

DOSEAMENTO

Calcinar, exatamente, cerca de 1,5 g de calamina. A esta amostra recentemente calcinada, fazer a digestão com 50 mL de ácido sulfúrico 0,5 M SV, aplicando calor suave, até não ocorrer mais solubilização. Filtrar a mistura, e lavar o resíduo no filtro com água quente até que a última lavagem seja neutra ao papel de tornassol. Ao filtrado combinado e lavagens, adicionar 2,5 g de cloreto de amônio, esfriar, adicionar alaranjado de metila, e titular com hidróxido de sódio M SV. Cada mL de ácido sulfúrico 0,5 M SV equivale a 40,69 mg de óxido de zinco.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados e protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Adstringente; antipruriginoso.

CALÊNDULA

Calendulae flos

Calendula officinalis L. – ASTERACEAE

A droga vegetal consiste de flores liguladas inteiras ou trituradas, acompanhadas de escassas flores tubulosas, separadas do receptáculo e das brácteas involucrais, secas. Não deve conter menos que 0,4% de flavonóides totais.

calculados como hiperosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$, 464,4), em relação ao material dessecado.

CARACTERÍSTICAS

Características organolépticas. A droga possui odor fraco e sabor levemente amargo.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

Flores dispostas em capítulos de 3 cm a 7 cm de diâmetro, envolvidas por um involúcro de duas séries de brácteas. As flores da periferia são liguladas, pistiladas, de 1,5 cm a 3,0 cm de comprimento e 0,5 cm a 0,7 cm de largura na porção mediana da ligula. Corolas amareladas ou alaranjadas, com o limbo tridentado, apresentando quatro ou cinco nervuras e tubo curto coberto de tricomas, ocasionalmente acompanhadas de um estilete filiforme e um estigma bifido. As flores do centro são escassas, tubulosas, pequenas, curtas, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, hermafroditas, amarelas ou alaranjadas, raro quase avermelhadas, com corola quinquedentada; anteras sagitadas e estilete indiviso. Papus ausente.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

Em vista frontal, a face adaxial da epiderme da corola ligulada mostra células retangulares, alongadas, de contorno levemente sinuoso, com cutícula estriada e é destituída de estômatos. Na região apical desta mesma face, as células são menores e arrançadas menos regularmente; no extremo basal da ligula existe uma camada de células com espessamento nas paredes externas contendo prismas e pequenos aglomerados de cristais. A face abaxial da epiderme é semelhante à adaxial, diferindo desta por apresentar poucos estômatos anomocíticos, os quais são relativamente grandes na região apical da ligula, quando comparados com as demais células epidérmicas desta porção. Na região basal da face abaxial ocorrem tricomas tectores longos, multicelulares, bisseriados, cônicos, de ápice arredondado e tricomas glandulares multicelulares, de pedicelo unisseriado, com três a cinco células, ou bisseriado, com três ou quatro células em cada fileira, ambos com cabeça ovalada, multicelular, geralmente bisseriada. As células do parênquima subjacente da corola ligulada apresentam numerosas gotas de óleo de coloração amarelo-alaranjada a amarelo-claro. O parênquima da ligula é atravessado longitudinalmente por quatro ou cinco feixes vasculares, com elementos de vaso apresentando espessamentos anelados e helicoidais. Junto às células parenquimáticas das corolas tubulosas são encontrados cinco feixes vasculares bifurcados abaixo da zona de soldadura das pétalas. Nas brácteas involucrais, quando presentes, ocorrem tricomas tectores longos, multicelulares, bisseriados, cônicos, de ápice arredondado, e tricomas tectores com quatro ou cinco células, unisseriadas, das quais a célula apical é muito mais longa do que as demais e frequentemente dobrada e achatada, além de tricomas glandulares mais raros, multicelulares, de pedicelo bisseriado, cônico, com células basais mais longas e irregulares do que as demais. Nas anteras observa-se o

endotécio, composto de células ligeiramente alongadas que, em vista frontal, mostram espessamentos característicos, restritos às paredes transversais (anticlinais). Associados ao endotécio, ocorrem esclereídes pequenos, alaranjados, com paredes pouco espessadas e numerosas pontuações. Os grãos de pólen são equinados, tricolpados, medindo em torno de 45 μm de diâmetro. As células epidérmicas dos estigmas são poligonais a levemente alongadas em vista frontal e mostram papilas curtas, bulbosas, enquanto as dos ovários são pequenas, poligonais em vista frontal, contendo pigmentos castanhos. Nos ovários ocorrem tricomas glandulares iguais aos das corolas liguladas. Os aquênios, quando presentes, têm forma navicular, com ornamentações dentadas na face dorsal.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DO PÓ

O pó deve atender a todas as exigências estabelecidas para a espécie, menos os caracteres macroscópicos. São características: coloração castanho-amarelada; presença de tubos das flores liguladas; partes de ligulas; fragmentos da epiderme das ligulas com cutícula estriada; fragmentos de parênquima subepidérmico com gotas de óleo; fragmentos de epiderme com estômatos anomocíticos grandes; células basais das corolas contendo cristais; fragmentos de tecido vascular; corolas das flores tubulosas; anteras das flores tubulosas; fragmentos de anteras na maioria das vezes com porções de feixes condutores; grãos de pólen equinados, tricolpados; fragmentos de células epidérmicas dos estigmas com papilas bulbosas; fragmentos de paredes de ovários com células pigmentadas; aquênios e tricomas iguais aos descritos acima.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1), utilizando sílica-gel GF₂₅₄ com espessura de 250 μm , como suporte, e mistura de ácido fórmico anidro, água e acetato de etila (10:10:80), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, em forma de banda, 20 μL da *Solução (1)* e 10 μL da *Solução (2)*, descritas a seguir.

Solução (1): ferver sob refluxo 1 g da droga pulverizada com 10 mL de metanol durante 10 minutos e filtrar.

Solução (2): dissolver 2,5 mg de rutina, 1 mg de ácido cafeico e 1 mg de ácido clorogênico em metanol, e completar o volume para 10 mL utilizando o mesmo solvente.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar em estufa a temperatura entre 100 °C e 105 °C e, ainda morna, nebulizar com uma solução de difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 a 5% (p/v) em metanol. Deixar a placa secar ao ar livre por 30 minutos. Examinar sob luz ultravioleta (365 nm). O cromatograma obtido com a *Solução (2)*, deve apresentar no terço inferior da placa duas manchas fluorescentes, uma de coloração marrom-amarelada (rutina) e outra de coloração azul claro (ácido clorogênico); e no terço superior, uma mancha fluorescente

de coloração azul claro (ácido cafeico). O cromatograma da *Solução (1)* deve apresentar mancha fluorescente marrom-amarelada correspondente em posição à mancha obtida com a rutina no cromatograma da *Solução (2)*; manchas fluorescentes verde amarelada e azul claro, correspondentes em posição à mancha obtida com o ácido clorogênico no cromatograma da *Solução (2)*; manchas fluorescentes verde amarelada e azul claro correspondente em posição à mancha obtida com o ácido cafeico no cromatograma da *Solução (2)*. Outras manchas podem estar presentes.

ENSAIOS DE PUREZA

Matéria estranha (5.4.2.2). No máximo 3,0%.

Água (5.4.2.3). No máximo 12,0%.

Cinzas totais (5.4.2.4). No máximo 10,0%.

DOSEAMENTO

Flavonoides totais

Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível* (5.2.14). Preparar as soluções descritas a seguir.

Solução estoque: pesar, exatamente, cerca de 0,4 g de droga pulverizada (800 µm), e transferir para balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentar 1 mL de solução aquosa de metenamina a 0,5% (p/v), 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aquecer em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos. Filtrar a mistura em algodão para um balão volumétrico de 100 mL, retornar o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, adicionar 20 mL de acetona. Colocar em refluxo, por 10 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, filtrar a solução para o balão volumétrico de 100 mL. Repetir a operação. Em seguida, completar o volume do balão volumétrico com acetona. Em funil de separação, adicionar 20 mL dessa solução e 20 mL de água destilada

e, após, extrair com 15 mL de acetato de etila, repetir três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila cada vez. Reunir as fases de acetato de etila e lavá-las em funil de separação, com duas porções de 50 mL de água destilada. Transferir a fase de acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com acetato de etila.

Solução amostra: a 10 mL da *Solução estoque*, adicionar 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol. Diluir em balão volumétrico de 25 mL com solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol.

Solução branco: adicionar 10 mL da *Solução estoque* em balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol.

Exatamente após 30 minutos, medir a absorvância da *Solução amostra* a 425 nm, em cubeta de 1 cm, utilizando *Solução branco* para ajuste do zero. Calcular a porcentagem de flavonoides totais segundo a expressão:

$$\text{TFT} = \frac{A \times 1,25}{(m - \text{PD})}$$

em que

A = absorvância da *Solução amostra* medida;

m = massa da droga (g);

PD = perda por dessecação (% p/p).

O resultado é fornecido em porcentagem (p/p) de flavonoides totais calculados como hiperosídeo (C₃₀H₃₀O₁₂). Alternativamente, realizar os cálculos considerando A(1%, 1cm) = 500.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes de vidro ou metal, bem fechados, ao abrigo da luz e do calor.

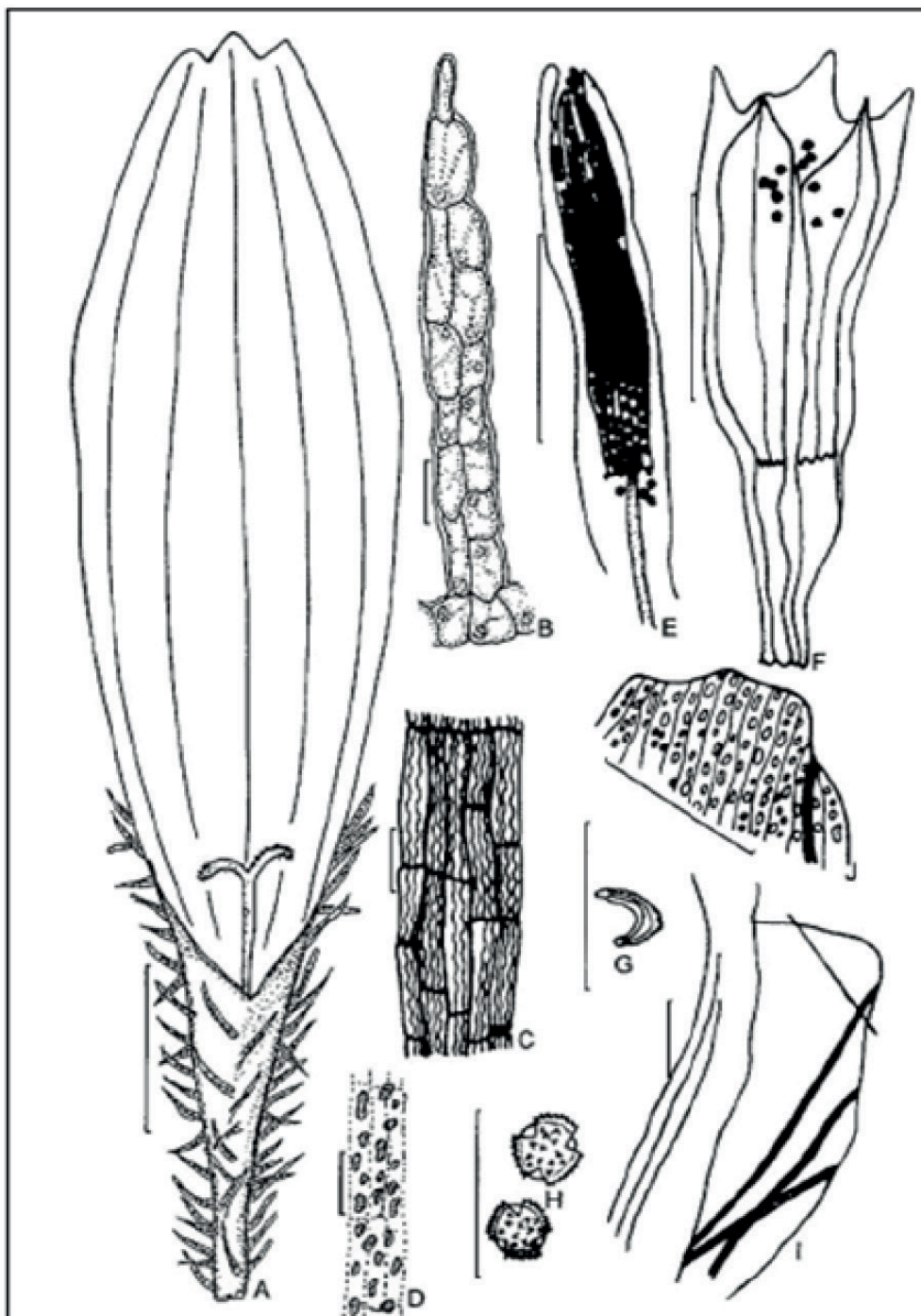


Figura 1 – Aspectos macroscópicos e microscópicos em *Calendula officinalis* L.

Complemento da legenda da Figura 1. As escalas correspondem em A, B, C, D, G, H e J a 100 μ m; em E, F e I a 500 μ m.

A – flor pistilada ligulada. B – tricoma tector multicelular bisseriado do tubo da corola da flor ligulada. C – epiderme da ligula com cutícula estriada. D – parênquima da ligula contendo gotas de óleo. E – asteras da flor tubulosa. F – corola da flor tubulosa do disco. G – fruto. H – grãos de pólen tricolpados. I – fragmento de ligula. J – detalhe do parênquima com gotas de óleo na porção indicada em I.

