

Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae)

Pharmacognostic Study of the Flowers of *Tagetes patula* L. (Asteraceae)

¹Vanessa M. Munhoz; ¹Renata Longhini; ²Tayara A. P. Silva; ³Audrey A. S. G. Lonni; ⁴José Roberto P. Souza; ¹Gisely C. Lopes; ¹João Carlos P. Mello*

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

²Aluna de Iniciação Científica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

⁴Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*Correspondência: e-mail: mello@uem.br

Palavras chave:

Tagetes patula; Avaliação farmacognóstica; Triagem fitoquímica; Perfil cromatográfico; Flavonoides.

Keywords:

Tagetes patula; Pharmacognostic evaluation; Phytochemical screening; Chromatographic profile; Flavonoids.

Resumo

O estudo foi conduzido para o desenvolvimento de parâmetros farmacognósticos de flores de *Tagetes patula* L. As avaliações foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira e/ou literatura especializada. Testes colorimétricos detectaram a presença de flavonoides, taninos e fenólicos simples. Por meio de técnicas cromatográficas: cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível desenvolver um perfil cromatográfico adequado e estabelecer a presença das substâncias quercetina e rutina. Os resultados para a perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco e teor em flavonoides totais foram de: 9,35%, 5,50%, 39,54%, 46,61% e 5,24% respectivamente. No ensaio por hidro-destilação, o rendimento do óleo essencial nas flores foi de 0,15%. Estes dados fornecem informações importantes para a correta identificação e padronização de flores de *T. patula*.

Abstract

The current study was conducted to develop the pharmacognostic standards for *Tagetes patula* flowers. These evaluations were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia and/or literature specialized. Colorimetric tests detected the presence flavonoids, tannins and simple phenolics. By thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) it was possible to develop a fingerprint suitable and correlating the presence of chemical substances, quercetin and rutin. The results for loss on drying, total ash content, extractives content, total solids content and total flavonoid content were: 9.35%, 5.50%, 39.54%, 46.61%, and 5.81%, respectively. The yield of essential oil in flowers was 0.15%. This study provides important information for correct identification and standardization of flowers of *T. patula*.

* Autor para correspondência: João Carlos Palazzo de Mello, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil, E-mail: mello@uem.br, Tel. + 55 44 3011 4816, Fax: + 55 44 3011 5050.





Introdução

Tagetes patula L. (Asteraceae), popularmente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão, tem origem no México. Foi introduzida no Brasil há muitos anos, onde se aclimatou perfeitamente, tornando-se subespontânea. A espécie é muito utilizada como ornamental em jardins e floreiras, sendo comercializada livremente em feiras populares e floriculturas (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997). Na medicina popular suas flores e folhas têm sido utilizadas como antisséptica, diurética, depurativa e repelente de insetos (Chadha, 1976).

A investigação de sua composição química aponta até o presente, flores e folhas ricas em terpenos (Dharmagadda et al., 2005; Restello, Menegatt e Mossi, 2009) flavonoides (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a), alcaloides (Faizi e Naz, 2002), carotenoides (De Las Rivas, 1989), tiofenos (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004) e ácidos graxos (Deineka et al., 2007), substâncias estas que provavelmente estejam envolvidas com as atividades biológicas relatadas até o momento, entre elas: atividade inseticida (Wells, Bertsch e Perich, 1993), nematocida (Buena et al., 2008), larvicida (Rajasekaran, Ravishankar e Reddy, 2004; Dharmagadda et al., 2005; Faizi et al., 2011b), hepatoprotetora (Vasilenko et al., 1990), anti-hipertensiva (Saleem et al., 2004), analgésica (Faizi et al., 2011a), anti-inflamatória (Kasahara et al., 2002), antibacteriana (Rondón et al., 2006), antiviral (Ananil et al., 2000), antifúngica (Mares et al., 2004; Romagnoli et al., 2005; Faizi et al., 2008) e como corante para alimentos (Vasudevan, Kashyap e Sharma, 1997).

No entanto, apesar da ampla literatura sobre as propriedades biológicas e constituição química da espécie, não existem relatos publicados sobre os parâmetros farmacognósticos para a avaliação da droga vegetal *T. patula*. Assim, diante do potencial da espécie para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou insumos naturais inseticidas e nematocidas, é premente o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a espécie. Visando dar uma contribuição ao estudo farmacognóstico da espécie *T. patula*, este trabalho tem o intuito de pesquisar a presença de constituintes do metabolismo secundário, determinar o teor de óleo essencial, perda por dessecação, teor de cinzas totais, teor de extrativos, teor de resíduo seco, teor em flavonoides, e estabelecer um perfil cromatográfico a partir de flores cultivadas.

Materiais e métodos

Material vegetal: Sementes de *T. patula* foram fornecidas por doação por Syngenta Flowers Brazil e cultivadas organicamente no Horto de Plantas Medicinais

da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As flores de *T. patula* foram coletadas em novembro de 2011 e o material foi identificado pelo Prof. Dr. Jimi Naoki Nakagima, da Universidade Federal de Uberlândia. Material testemunho encontra-se depositado como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUM 21.907.

As flores foram secas em estufa de circulação forçada de ar (Pardal), aquecida a 38 ± 2 °C e cominuídas em moinho de martelo (Tigre ASN5).

Preparação do extrato: Para a obtenção do extrato, a droga vegetal foi utilizada sem separação granulométrica. O material vegetal foi inicialmente desengordurado com *n*-hexano por maceração dinâmica durante seis dias. Após secagem, as flores desengorduradas ficaram em maceração por 10 min e em seguida foram submetidas à extração utilizando dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, na proporção de 2,5% (m/v), utilizando como líquido extrator uma mistura etanol:água (1:1 v/v), por um período de 9 min, com intervalos de 10 min, para que a temperatura não excedesse 40 °C. Após, o extrato foi filtrado, evaporado sob pressão reduzida e liofilizado (EB).

Solventes e reagentes: Todos os solventes e reagentes utilizados apresentavam grau analítico. Quercetina (Acros Organics) e Rutina (Fluka) foram usados como substâncias químicas de referência. Soluções estoques dos padrões foram preparadas na concentração de 100 µg/mL em metanol.

Avaliação físico-química: As análises para a determinação de perda por dessecação e determinação do teor de cinzas totais, foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). A determinação do teor de extrativos, empregando-se a água como solvente, está de acordo com a técnica descrita em Deutsches (1986). Para a avaliação do teor de resíduo seco, foi produzido um extrato a 2,5% (m/v) em dispersor Ultra-Turrax® (Ika, T-25) a 8000 rpm, com 9,0 min de agitação e temperatura inferior a 40 °C, utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol na proporção de 1:1:1 (v/v). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Análise fitoquímica preliminar: A droga vegetal foi submetida à análise fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitação, característico para cada classe de substâncias estudadas (Harborne, 1998; Schenkel, Gosmann e Athayde, 2011).

Análise cromatográfica: Para o ensaio por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas





placas de alumínio de gel de sílica F254 (Merck®), (100 x 50 mm). O cromatograma foi desenvolvido em câmara saturada, empregando como fase móvel uma mistura de tolueno, acetato de etila, metanol e ácido fórmico (55:35:15:6; v/v), tendo como substâncias de referência, quercetina e rutina. O EB foi retomado em metanol na concentração de 1,45 mg/mL. Aliquotas do extrato (20 µL) e das soluções padrões (10 µL) foram adicionadas sobre a placa com o auxílio de micropipetas volumétricas, na forma de bandas. A placa foi desenvolvida a uma distância de 80 mm, à temperatura ambiente. Após o desenvolvimento, foi seca em estufa à temperatura de 105 °C, e em seguida pulverizada com difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) em metanol, seguido de uma solução de macrogol 400 a 5% (p/v) em metanol. Após, foi examinada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) para visualização das bandas.

Para a cromatografia líquida de alta eficiência, o EB foi retomado em metanol na concentração de 725 µg/mL. Foi empregado cromatógrafo líquido Thermo® equipado com PDA (photo diode array), detector espectrofotométrico (modelo Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas e degasser integrado (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus), equipado com um loop de 10 µL e controlador de software Chromquest. A temperatura do forno para coluna foi mantida em 25 °C e os cromatogramas foram observados a 210, 254 e 370 nm. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, foram usados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex®, modelo Gemini, porosidade 5 µm. A separação cromatográfica foi realizada utilizando água (fase A) e acetonitrila (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 1,0 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. Após, 5 min para reequilíbrio da coluna com 5% da fase B.

Determinação de flavonoides totais: Medições espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis, modelo PC-1650, com cubetas de quartzo QS. A determinação do teor de flavonoides totais na droga vegetal foi realizada seguindo o método proposto na monografia da calêndula, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, (2010), com algumas modificações. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação do teor de óleos essenciais: A determinação do teor de óleos essenciais foi conduzida de acordo com o método geral proposto para a determinação de óleos voláteis em drogas vegetais (Farmacopeia Brasileira, 2010). A avaliação foi realizada em triplicata.

Análise estatística: A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Software STATISTICA® e Excel®.

Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação físico-química estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas de flores de *T. patula* (n=3).

Especificação	(%) Média ±DP (CV%)
Perda por dessecação	9,35±0,2 (2,14)
Teor de cinzas totais	5,50±0,2 (3,61)
Teor de extrativos	39,54±0,52 (1,32)
Teor de resíduo seco	46,61±0,49 (1,05)

DP= desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em percentagem

A perda por dessecação, ensaio importante para a qualidade de drogas vegetais, refere-se ao teor de umidade e/ou substâncias voláteis presentes na espécie. O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, com a possibilidade da degradação de constituintes químicos e desenvolvimento de fungos e bactérias (Farias, 2011). De acordo com Simões et al. (2011), o teor máximo de umidade estabelecido para drogas vegetais em diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas em monografias. O valor obtido no ensaio para *T. patula* foi inferior a 14%, indicando que as operações preliminares empregadas no processamento pós-coleta (secagem e armazenamento), foram efetivas quanto à normalização do teor de umidade na droga vegetal. Em estudo realizado por Gazim et al. (2007), com as flores de calêndula, os resultados encontrados foram 11,6% de umidade residual nas flores secas, valor indicado como adequado, pois segundo os autores, o teor de umidade permitido em flores secas deve permanecer entre 8 a 15%. Assim, pode-se afirmar que valores característicos de perda por dessecação, além de informação importante do ponto de vista tecnológico, servem também como parâmetro de qualidade para as flores de *T. patula*.

A determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza para verificar impurezas inorgânicas não-voláteis, que podem estar presentes como contaminantes (Farmacopeia Brasileira, 2010). O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie (cinzas intrínsecas) com as substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas) (Simões et al., 2011). Isso significa que essa determinação é uma referência de qualidade e caracterização de um vegetal. Assim, a finalidade desse ensaio foi estabelecer o parâmetro de cinzas totais para *T. patula*, visto que o mesmo ainda não foi descrito na literatura. Na análise de cinzas totais o resultado foi 5,50%±0,2 (3,61%). Como não existem





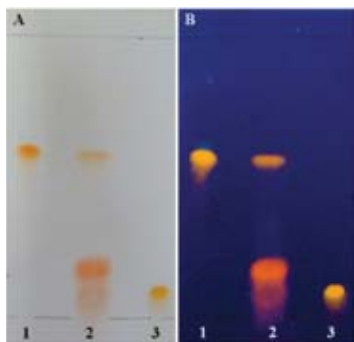
teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, este dado pode nortear futuras averiguações de cinzas totais na espécie.

A determinação do teor de extrativos (TE) é um ensaio utilizado para estimar o potencial de substâncias extraíveis da droga vegetal em água, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. Esta característica individual pode ser considerada como um parâmetro importante na avaliação da qualidade da droga vegetal, pois está relacionada às características sazonais, ou seja, a produção de determinados grupos de metabólitos secundários, durante as estações do ano. As flores de *T. patula* apresentaram um teor de extrativos de $39,54\% \pm 0,52$ (1,32%), que poderá ser utilizado como parâmetro para a avaliação de novos lotes de matéria-prima vegetal. Outro parâmetro avaliado, e considerado como uma característica individual para a droga vegetal é a determinação do teor de resíduo seco (RS), utilizando como líquido extrator uma mistura de água, etanol e metanol em proporção volumétrica. Neste ensaio o resultado foi de $46,61\% \pm 0,49$ (1,05%).

A triagem fitoquímica foi conduzida para caracterizar a composição química das flores de *T. patula*. Os resultados obtidos na avaliação fitoquímica preliminar corroboraram dados de literatura sobre a presença de compostos fenólicos na espécie, entre eles flavonoides, fenólicos simples e taninos. Foi observada uma maior intensidade nas reações para flavonoides. Essa intensidade pode ser devido à função desses constituintes em proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteger contra insetos, fungos, vírus e bactérias. As reações para os taninos foram menos acentuadas do que para os fenólicos simples.

Todas as identificações na CCD foram baseadas na comparação das distâncias de migração (valores de Rf) e da cor das bandas entre a amostra e os padrões utilizados, antes e após a pulverização da placa com o agente cromogênico específico (Figura 1).

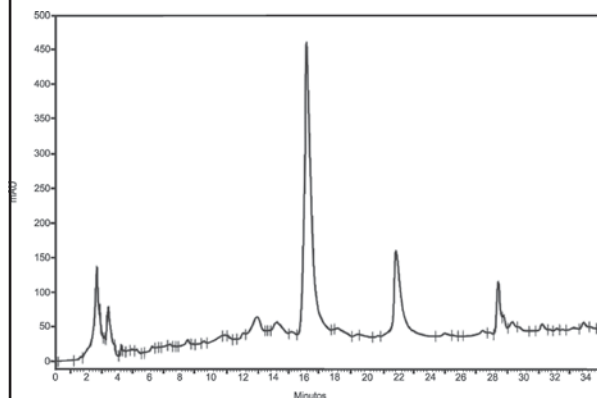
Figura 1. Cromatograma realizado após pulverização com agente cromogênico específico (reagente natural). (A) sob luz natural (B) sob luz UV à 365 nm. (1) quercetina; (2) extrato bruto; (3) rutina.



A CCD é uma ferramenta que permite analisar a composição e a pureza do material estudado, auxiliando na identificação de problemas como a adulteração ou falsificação da espécie vegetal de interesse. É um método descrito em monografias de droga vegetais de vários códigos oficiais como ensaio de identificação e autenticidade. De acordo com o perfil cromatográfico obtido e correspondência com os valores de Rf dos padrões verifica-se que EB apresenta manchas correspondentes à quercetina (Rf= 0,58) e rutina (Rf= 0,10) com maiores intensidades, bem como uma terceira banda muito intensa com valor de Rf de 0,18. Assim, a metodologia desenvolvida na obtenção de um perfil cromatográfico por CCD para o EB de flores de *T. patula* mostrou-se adequada para o reconhecimento da espécie, e pode ser utilizado como "impressão digital" para a droga vegetal, nas condições avaliadas.

Através do desenvolvimento de um sistema gradiente para a separação dos constituintes químicos do EB por CLAE (Figura 2), foi possível obter uma boa separação dos picos de interesse em 35 min. Por esse sistema foi possível determinar o tempo de retenção da quercetina (15,96 min) através dos dados espectroscópicos do padrão.

Figura 2. Perfil cromatográfico a 210 nm do EB de flores de *T. patula*. Pico correspondente a quercetina em 15,96 min. Condições cromatográficas: pré-coluna (4 x 3 mm d.i., 5 µm), C-18, coluna (250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), Phenomenex® Gemini C-18; fase móvel: água (fase A) e acetonitrila (fase B); 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. com 5 min para reequilíbrio da coluna; vazão: 1,0 mL/min; detecção: 210 nm.



Os resultados obtidos com as análises cromatográficas (CCD e CLAE) mostraram que os métodos desenvolvidos são ferramentas simples e sensíveis, e que podem ser prontamente utilizadas como adequados para assegurar a autenticidade de flores de *T. patula*. A presença de flavonoides em *T. patula* foi confirmada pela expressiva intensidade na reação de Shino-





da, e corroborada pelos dados de literatura sobre o isolamento desta classe de metabólitos secundários na espécie (Piccaglia, Marotti e Grandi, 1998; Faizi et al., 2011a). Assim, optou-se pela determinação do teor de flavonoides na droga vegetal. O resultado do ensaio para a determinação de flavonoides totais foi de $5,24\% \pm 0,08$ (1,53%), média muito superior ao encontrado para drogas vegetais ricas em flavonoides descritas na literatura (Santos e Blatt, 1998; Petrovick e Mello, 2000; Borella e Fontoura, 2002). Provavelmente, este dado esteja relacionado com a época de colheita (sazonalidade) e com a intensidade de insolação, visto que a espécie foi cultivada em canteiros ensolarados.

O rendimento de óleo essencial em massa seca foi de $0,15\% \pm 0,007$ (4,66%). Resultado muito semelhante aos 0,14 % (m/m) descrito por Szarka e colaboradores (2006), que avaliaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e tiofenos em flores de *T. patula*.

No Brasil, um dos grandes desafios na utilização das plantas medicinais é a baixa qualidade das matérias-primas vegetais. Os problemas mais frequentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações, que podem ocorrer em qualquer uma das etapas na cadeia produtiva (Farias et al., 1985). Portanto, o estabelecimento de parâmetros de qualidade para as drogas vegetais de uso medicinal é fundamental para a consolidação da Fitoterapia, como prática médica segura e eficaz.

Assim, os resultados obtidos neste estudo desempenham um papel significativo na definição de parâmetros farmacognósticos para a caracterização e identificação de flores de *T. patula*, e contribuem para a obtenção de padrões de qualidade para a espécie vegetal.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação Araucária, Agro Aliança Comercial Atibaia Ltda., distribuidor exclusivo da Syngenta Flowers Brazil pela doação das sementes e a Admir Arantes e Claudio Roberto Novello pela colaboração e auxílio técnico.

Referências

Ananil, K.; Hudson, J.B. Souza, C. Akpaganal, K. Tower, G.H.N. Amason, J.T. e Gbeasson, M. 2000 - Investigation of medicinal plants of togo for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, v.38, p. 40-45.

Borella J.C.; Fontoura, A. 2002 -. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.12, p.63-67.

Buena, A.P.; Diez-Rojo, M.A. Lopez-Perez, J.A. Robertson, L. Escuer, M. Bello, A. 2008 - Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of Meloidogyne. *Crop Protection*, v.27, p.96-100.

Chadha, YR. 1976 -. *Tagetes* Linn (Compositae). *The Wealth of India*, v.10, p.109-112.

De Las Rivas, J. 1989 - Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *Journal of Chromatograph*, v.464, p.442-447.

Deineka, V.I.; Sorokopudov, V.N. Deineka, L.A. Tretyakov, M.Y. 2007 - Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v.41, p.540-542

Deutsches Arzneibuch. 1986 - 9 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche.

Dharmagadda V.S.S.; Naik, S.N. Mittal, P.K. Vasudevan P. 2005 - Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, v.96, p.1235-1240.

Faizi, S.; Naz, A. 2002 - Jafrine, a novel and labile β -carboline alkaloid from the flowers of *Tagetes patula*. *Tetrahedron*, v.58, p.6185-6197.

Faizi, S.; Siddiqi, H. Bano, S. Naz, A. Mazhar, K. Nasim, S. Riaz, T. Kamal, S. Ahmad, A. Khan, A.S. 2008 - Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: preparation of patuletin derivatives. *Pharmaceutical Biology*, v.46, p.309-320.

Faizi, S.; Dar, A. Siddiqi, H. Naqvi, S. Naz, A. Bano, S. Lubna, A. 2011a -. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharmaceutical Biology*, v.49, p.516-525.

Faizi, S.; Fayyaz, S. Bano, S. Iqbal, E.Y. Lubna, A. Siddiqi, H. Naz, A. 2011b - Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.9080-9093.

Farias M.R.; Schenkel, E.P. Bergold, A.M. Petrovick, P.R. 1985 - O problema na qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v.1, p.73-82.

Farias M.R. 2011 - Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões C.M.O.; Schenkel E.P.; Gosmann G.; Mello J.C.P.; Mentz L.A.; Petrovick P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, p. 199-222. 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC.





Farmacopeia Brasileira. 2010 - 5. ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Gazim Z.C.; Ferreira G.A.; Rezende C.M.; Nakamura C.V.; Dias Filho B.P.; Cortez D.A.G. 2007 - Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da *Calendula officinalis* produzida no Paraná. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p.118-121.

Harborne, J.B. 1998 - *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed., London: Chapman and Hall.

Kasahara, Y.; Yasukawa, K. Kitanaka, S. Khan, T.M. Evans, F.J. 2002 - Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytotherapy Research*, v.16, p.217-222.

Mares, D.; Tosi, B. Poli, F. Andreotti, E. Romagnoli, C. 2004 - Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, v.159, p.295-304.

Mello, J.C.P.; Petrovick, P.R. 2000 - Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). hydroalcoholic extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.19, p.213-215.

Piccaglia, R.; Marotti, M. Grandi, S. 1998 -. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *Tagetes erecta*. *Industrial Crops and Products*, v.8, p.45-50.

Rajasekaran, T.; Ravishankar, G.A. Reddy, B.O. 2004 - In vitro growth of *Tagetes patula* L. hairy roots, production of thiophenes and its larvicidal activity. *Indian Journal of Biotechnology*, v.3, p.92-96.

Restello, R.M.; Menegatt, C. Mossi, A.J. 2009 - Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.53, p.304-307.

Romagnoli, C.; Bruni, R. Andreotti, E. Rai, M.K. Vicentini, C.B. Mares, D. 2005 - Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capita from wild Indian *Tagetes patula* L. *Journal Protoplasma*, v.225, p.57-65.

Rondón, M.; Velasco, J. Hernández, J. Pecheneda, M. Rojas, J. Morales, A. Carmona, J. Díaz, T. 2006 - Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela andes. *Revista Latinoamericana de Química*, v.34, p.32-36.

Saleem, R.; Ahmad, M. Naz, A. Siddiqui, H. Ahmad, S.I. 2004 - Hypertensive and toxicological study of citric acid and other constituents from *Tagetes patula* roots. *Archives of Pharm. Research*, v.27, p.1037-1042.

Santos, M.D.; Blatt, C.T.T. 1998 -. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, v.21 n.2, p.135-140.

Schenkel, E.P.; Gosmann, G. Athayde, M.L. 2011 - Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O. (org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, p. 711-740.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2011 - *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Editora UFRGS e UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

Szarka, S.Z; Hethelyi, E. Lemberkovics, E. Kuzovkina, I.N. Banyai, P. Szoke, E. 2006 - GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, v.63, p.S67-S73.

Vasilenko Y.K.; Bogdanov, A.N. Frolova, L.M. Frolov, A.V. 1990 - Hepatoprotective properties of preparations from spreading marigold. *Khimico Farmatsevticheski Zhurnal*, v.24, p.53-56.

Vasudevan, P.; Kashyap, S. Sharma, S. 1997 - *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology*, v.62, p.29-35.

Wells, C.; Bertsch, W. Perich, M. 1993 - Insecticidal volatiles from the marigold plant (genus *Tagetes*). Effect of species and sample manipulation. *Chromatographia*, v.35, p.209-215.

