

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Informações Sistematizadas
da Relação Nacional de

PLANTAS MEDICINAIS

DE INTERESSE AO SUS



*CALENDULA OFFICINALIS L.,
ASTERACEAE – CALÊNDULA*

Brasília – DF
2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde
Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos

Informações Sistematizadas
da Relação Nacional de

PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS



*CALENDULA OFFICINALIS L.,
ASTERACEAE – CALÊNDULA*

Brasília – DF
2021

2021 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: bvsm.sau.gov.br. O conteúdo desta e de outras obras da Editora do Ministério da Saúde pode ser acessado na página: <http://editora.sau.gov.br>.

Tiragem: 1ª edição – 2021 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação
e Insumos Estratégicos em Saúde
Departamento de Assistência Farmacêutica
e Insumos Estratégicos
Coordenação-Geral de Assistência
Farmacêutica Básica
Esplanada dos Ministérios, bloco
G, Edifício Sede, sobreloja
CEP: 70058-900 – Brasília/DF
Tels.: (61) 3315-5897/ 3315-7881/ 3315-8967
Site: www.sau.gov.br/fitoterapicos
E-mail: fitodaf@saude.gov.br

Coordenação do trabalho:

Benilson Beloti Barreto
Clarissa Giesel Heldwein
Daniel César Nunes Cardoso
Katia Regina Torres
Letícia Mendes Ricardo

Elaboração:

Alexsandro Fernandes Marinho
Eduardo de Jesus Oliveira

Foto da capa:

Ana Maria Soares Pereira

Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

Equipe Ministério da Saúde:

Benilson Beloti Barreto
Daniel César Nunes Cardoso
Daniella Magalhães de Carrara
Ediane de Assis Bastos
Sandra de Castro Barros

Editora responsável:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria-Executiva
Subsecretaria de Assuntos Administrativos
Coordenação-Geral de Documentação e Informação
Coordenação de Gestão Editorial
SIA, Trecho 4, lotes 540/610
CEP: 71200-040 – Brasília/DF
Tels.: (61) 3315-7790 / 3315-7794
Site: <http://editora.sau.gov.br>
E-mail: editora.ms@saude.gov.br

Equipe editorial:

Normalização: Delano de Aquino Silva
Revisão: Khamila Silva
Capa, projeto gráfico e diagramação: Renato Carvalho

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde.

Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.

Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : *Calendula Officinalis* L., *Asteraceae* (Calêndula) [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021.

94 p. : il.

Modo de acesso: World Wide Web: http://bvsm.sau.gov.br/publicacoes/informacoes_sistematizadas_relacao_calendula_officinalis.pdf
ISBN 978-85-334-2890-4

1. *Calendula officinalis*. 2. Plantas medicinais e fitoterápicos. 3. Sistema Único de Saúde (SUS). I. Título.

CDU 633.88

Catalogação na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2020/0055

Título para indexação:

Systematized Information on the National List of Medicinal Plants of Interest to SUS: *Calendula officinalis* L. (Calêndula)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Flores da espécie <i>Calendula officinalis</i> L.	9
Figura 2 – Mapa de distribuição da espécie <i>Calendula officinalis</i> L.	10
Figura 3 – Flores da espécie <i>Tagetes erecta</i> L.	14
Figura 4 – Flores, folhas e caule das espécies <i>Tagetes erecta</i> L. (A e C) e <i>Calendula officinalis</i> L. (B e D)	15
Figura 5 – Mapa de distribuição da espécie <i>Tagetes erecta</i>	16
Figura 6 – Perfil cromatográfico da tintura de calêndula (60% v/v) por Clae-DAD-EM com as atribuições dos compostos detectados	25
Figura 7 – Estrutura dos monoésteres do faradiol, onde, R = lauril, miristil ou palmitil	28
Figura 8 – Cromatograma do extrato das flores de <i>Calendula officinalis</i> L. mostrando a separação dos 3-O-monoésteres do faradiol	29
Figura 9 – Cromatogramas obtidos por Clae dos ésteres 1 e 2 do faradiol em extratos obtidos por fluido supercrítico usando uma extração analítica (A) e extração em escala piloto (B). As extrações foram com dióxido de carbono puro por 3h a 50°C e 500 bar. Identificação dos picos: 1 faradiol-3-O-miristato e 2 faradiol-3-O-palmitato	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos de toxicidade aguda de <i>Calendula officinalis</i> encontrados na literatura pesquisada	36
Quadro 2 – Estudos de toxicidade de doses repetidas de <i>Calendula officinalis</i> L. encontrados na literatura pesquisada	37
Quadro 3 – Formas farmacêuticas descritas na literatura e método de obtenção	63
Quadro 4 – Patentes	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais para análise de metais pesados	22
Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para determinação de arsênico e mercúrio	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAM	Membrana corialantóica
CE₅₀	Concentração eficaz média
CI₅₀	Concentração inibitória média
CIM	Concentração inibitória mínima
Clac	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	detector de arranjo de fotodiodos
DL₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDC	Fração diclorometano da calêndula
FHC	Fração hexânica da calêndula
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN-γ	interferon γ
IL-1β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
IPF_{2α}-I	isoprostano IPF _{2α} -I (como índice de peroxidação lipídica)
MM2	Metaloproteínase da matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TPA	tetradecanoil forbol
UV	ultravioleta
VCAM-1	molécula de adesão celular-vascular 1
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 IDENTIFICAÇÃO	8
1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA.....	9
1.2 SINOMÍNIA BOTÂNICA.....	9
1.3 FAMÍLIA	9
1.4 FOTO DA PLANTA	9
1.5 NOMENCLATURA POPULAR	10
1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	10
2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS	12
2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL	13
2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	13
2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	13
2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES.....	14
3 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE	18
3.1 PARA A ESPÉCIE VEGETAL	19
3.1.1 Caracteres organolépticos.....	19
3.1.2 Requisitos de pureza	19
3.2 PARA O DERIVADO VEGETAL E PRODUTO ACABADO.....	26
3.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS	28
4 INFORMAÇÕES SOBRE SEGURANÇA E EFICÁCIA	32
4.1 USOS POPULARES E/OU TRADICIONAIS.....	33
4.2 PRESENÇA EM NORMATIVAS SANITÁRIAS BRASILEIRAS	33
4.3 ENSAIOS NÃO CLÍNICOS	34
4.3.1 Ensaios toxicológicos	34
4.3.2 Ensaios farmacológicos	43
4.4 ENSAIOS CLÍNICOS	54
4.4.1 Fase I.....	54
4.4.2 Fase II.....	54
4.4.3 Fase III.....	57
4.4.4 Fase IV	58
4.4.5 Estudos observacionais.....	58

4.5	RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES PARA CADA DERIVADO DA ESPÉCIE <i>CALENDULA OFFICINALIS</i> L.	59
4.5.1	Via de administração	59
4.5.2	Dose diária e posologia	59
4.5.3	Período de utilização	59
4.5.4	Contraindicações	60
4.5.5	Grupos de risco	60
4.5.6	Precauções de uso	60
4.5.7	Efeitos adversos relatados.....	60
4.5.8	Interações medicamentosas.....	60
4.5.9	Informações sobre superdosagem	61
5	INFORMAÇÕES GERAIS	62
5.1	FORMAS FARMACÊUTICAS / FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA	63
5.2	PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E EM OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS	66
5.3	EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO	67
5.4	ROTULAGEM.....	67
5.5	MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS	67
5.6	PATENTES.....	67
	REFERÊNCIAS	72





1

IDENTIFICAÇÃO

■ 1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA

Calendula officinalis L.^{1,3}

■ 1.2 SINOMÍNIA BOTÂNICA

Caltha officinalis (L.) Moench.

Calendula aurantiaca Kotschy ex Boiss.

Calendula eriocarpa DC.

Calendula hydruntina (Fiori) Lanza.

Calendula prolifera Hort. Ex Steud.²

■ 1.3 FAMÍLIA

Asteraceae, também conhecida como *Compositae*.^{1,2}

■ 1.4 FOTO DA PLANTA

Figura 1 – Flores da espécie *Calendula officinalis* L.



Fonte: Ana Maria Soares Pereira.



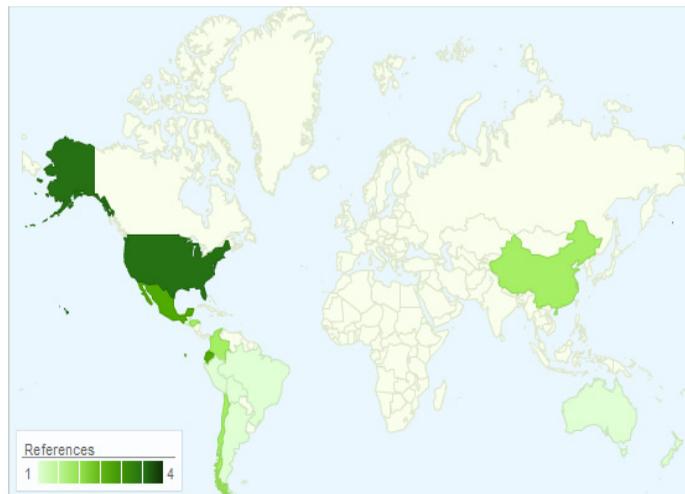
■ 1.5 NOMENCLATURA POPULAR

No Brasil, a espécie *Calendula officinalis* L. é conhecida popularmente como calêndula, malmequer, maravilha, mal-me-quer-dos-jardins, margarida-dourada, calêndula do campo, calêndula do jardim, maravilhas do campo, calêndula de panela e *Pot. Marigold* (em inglês).^{4,5} Em países da Europa, Estados Unidos, Ásia é conhecida popularmente como Atunjaq, calendula, chinese safflower, cuc kim tiên, djamir, djomaira, feminell, flamenquilla, fleur de calandule, fleur de souci, fleur de souci officinal, fleurs de tous les mois, garden marigold, gold-bloom, goldblume, gole hamisheh bahar, hen and chickens, Körömvirag, lellousha, maravilla, marigold, mary-bud, ok-hhawan, pot marigold, qaraqus, qawqhan, quaqahan, ringflower, ringelblüten, saialill, sciure'e Sant'antonio, souci, souci des jardins, tabsoult, toukinsenka, touslat, uchu k'aspa, virreina, xu xi, zergul zertzira, zobeida, zubaydah,⁶ jin zhan ju.¹

■ 1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

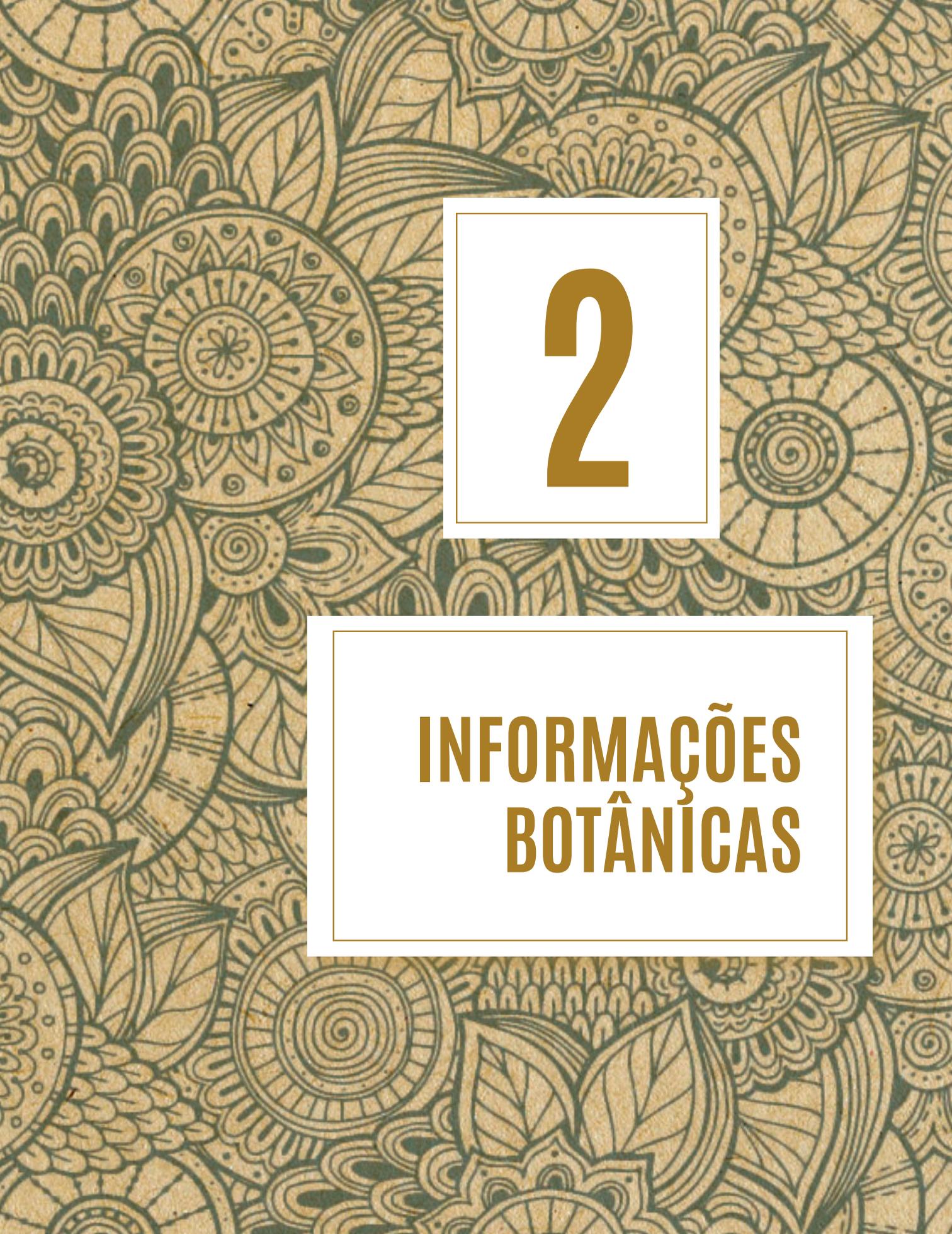
Originária dos países da Europa Central, Oriental e do Sul, foi cultivada comercialmente na América do Norte, nos Balcãs, Europa Oriental e Alemanha.⁶ Os egípcios, gregos, hindus e árabes a cultivaram e ela tem sido usada medicinalmente desde o século XII.⁵ É cultivada em toda zona temperada do mundo também como planta ornamental⁷ (Figura 2).

Figura 2 – Mapa de distribuição da espécie *Calendula officinalis* L.



Fonte: <http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=2709695&usenonflash=1#>.





2

**INFORMAÇÕES
BOTÂNICAS**

■ 2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL

O material vegetal de interesse farmacológico são as flores liguladas e compostas secas.⁶

■ 2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

Flores pequenas liguladas, amarelas, lígula laranja ou amarelo-alaranjada, 3-5 mm de largura e cerca de 7 mm na parte mediana, 3-dentada no ápice, falciforme, amarelado-marrom a laranja-marrom, tubo com projeção do estilete e estigma 2-lobulado; ocasionalmente como ovário parcialmente dobrado, marrom-amarelado a laranja-marrom. Flores tubulares diminutas, cerca de 5 mm de comprimento, com corola vermelho-alaranjado ou vermelho-violeta, 5-lobuladas, com tubo marrom-amarelado ou marrom-alaranjado, piloso na parte inferior, na maior parte marrom-amareladas, com ovário dobrado, laranja-marrom.⁶ As figuras com os aspectos macro e microscópicos encontram-se na base de dados tropicos.org ou na *Farmacopeia Brasileira* (v. 2, p. 171).^{1,8}

■ 2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

Células da epiderme interna alongadas, retangulares, com paredes retas, cutícula levemente estriada na flor radial; estômatos ausentes, células da epiderme exterior semelhantes à interior, com 3 ou 4 estômatos anomocíticos; tricomas muito numerosos no tubo, bisseriados; células epidérmicas do estigma com paredes poligonais, retas. Flores do disco com células epidérmicas exteriores de paredes retas, alongadas a ligeiramente sinuosas, sem estômatos; tricomas abundantes na área abaixo do ponto de inserção dos estames, principalmente do tipo glandular, unisseriados ou bisseriados. Uma camada de células isodiamétricas a alongadas, com paredes moderadamente espessadas, lignificadas e pontoadas, na parte superior das anteras; grãos de pólen esféricos, até 45 µm de diâmetro, com três pores germinais, exina finamente granular com numerosas espinhas curtas; ápice do estigma coberto por papilas bulbosas, curtas.⁶

■ 2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES

Uma das espécies que mais se confunde com a *C. officinalis* é a espécie *Tagetes erecta* L., por ser da mesma família (*Asteraceae*) e em muitos países ser também conhecida popularmente por “Marigold” (Figura 3). A importância de se diferenciar as duas espécies é para evitar equívocos na utilização da planta e possível adulteração, já que as duas são bastante semelhantes quanto às atividades antioxidantes.⁹⁻¹⁴ A Figura 4 mostra a diferença das flores, do caule e das folhas entre *Tagetes erecta* L. e *Calendula officinalis* L. A Figura 5 mostra o mapa da distribuição geográfica da espécie *Tagetes erecta* L., e pode ser comparado ao da *Calendula officinalis* L., conforme Figura 2, na página 10. Com relação à descrição botânica da planta, as folhas são simples (inteiras ou lobadas, porém não separadas em folíolos) e com arranjo foliar alternado (com apenas uma folha por nó ao longo do caule) ou oposto (com duas folhas paralelas por nó ao longo do caule). O capítulo floral possui flores tubulares no centro do disco e flores radiais, estas frequentemente liguladas, à margem do disco, também conhecidas como flores marginais e suas cores são laranja ou amarelo. O fruto é aquênio aristado: aristas coronadas ou reniformes (denteadas ou lobadas). A planta não possui espinhos. O tamanho da lâmina foliar varia de 30-250 mm e a largura do capítulo floral, de 6 a 10 mm.¹⁵

Figura 3 – Flores da espécie *Tagetes erecta* L.



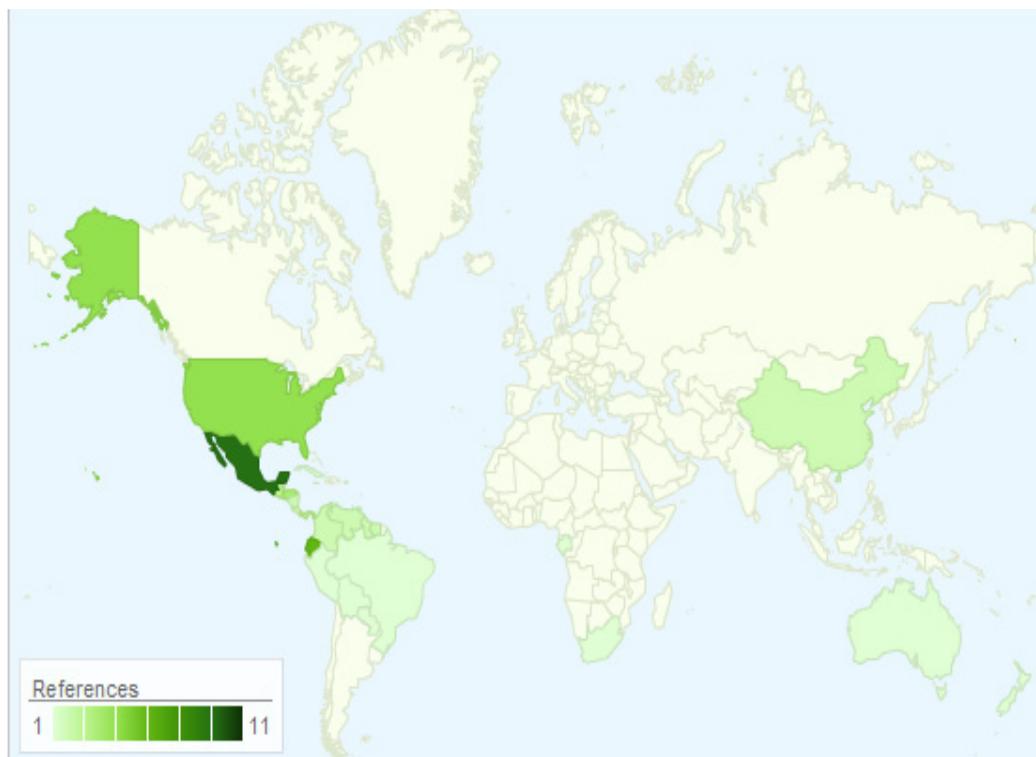
Fonte: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/tagetes/erecta/>.

Figura 4 – Flores, folhas e caule das espécies *Tagetes erecta* L. (A e C) e *Calendula officinalis* L. (B e D)



Fontes: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/calendula/officinalis/> e <https://gobotany.newenglandwild.org/species/tagetes/erecta/>.

Figura 5 – Mapa de distribuição da espécie *Tagetes erecta*



Fonte: <http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=2703314>.





3

**CARACTERIZAÇÃO
E CONTROLE DE
QUALIDADE**

■ 3.1 PARA A ESPÉCIE VEGETAL

3.1.1 Caracteres organolépticos

As características organolépticas descritas tanto nas monografias da WHO quanto na *Farmacopeia Brasileira*ⁱ incluem: odor fraco, agradavelmente aromático e sabor amargo.^{6,8}

3.1.2 Requisitos de pureza

3.1.2.1 Perfil de contaminantes comuns

Materiais estranhos: não mais do que 5% das brácteas e não mais de 2% para outros materiais estranhos.⁶

3.1.2.2 Cinzas totais

As cinzas totais incluem cinzas fisiológicas e não fisiológicas, e são de no máximo 10%.^{6,8} Foram encontradas duas metodologias bastante semelhantes para descrever a determinação de cinzas totais em plantas, que foram o da *Farmacopeia Brasileira*ⁱⁱ¹⁶ e do guia de controle de qualidade para plantas pertencente a WHO.¹⁷ A seguir descrevemos o método da *Farmacopeia Brasileira*.

Determinação de cinzas totais. Pesar, exatamente, cerca de 3 g da amostra pulverizada, ou a quantidade especificada na monografia, transferir para cadinho (de silício ou platina) previamente tarado. Distribuir a amostra uniformemente no cadinho e incinerar aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo, $600 \pm 25^\circ\text{C}$, até que todo o carvão seja eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C) pode ser utilizado. Resfriar em dessecador e pesar. Nos casos em que o carvão não puder ser eliminado totalmente, resfriar o cadinho e umedecer o resíduo com cerca de 2 mL de água ou solução saturada de nitrato de amônio. Evaporar até secura em banho-maria e em seguida, sobre chapa quente, e incinerar até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar.¹⁶

3.1.2.3 Cinzas insolúveis em ácido

Segundo a *Farmacopeia Brasileira*, as cinzas insolúveis em ácido constituem o resíduo obtido na fervura, de cinzas totais ou sulfatado com ácido clorídrico diluído após filtração, lavagem e incineração, sendo o método utilizado na determinação de sílica e constituintes silícicos da droga.¹⁶ São de no máximo 2%.⁶ A metodologia descrita a seguir foi transcrita da *Farmacopeia Brasileira*.ⁱⁱⁱ

ⁱ A *Farmacopeia Brasileira* 5ª edição não está mais vigente. Em 2019, foi publicada a 6ª edição e o seu volume II contém a monografia de Calêndula, com texto atualizado.

ⁱⁱ Idem.

ⁱⁱⁱ Idem.

Determinação de cinzas insolúveis em ácido. Ferver o resíduo obtido na determinação de cinzas totais durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavar o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Recolher o resíduo, insolúvel em ácido, sobre papel de filtro isento de cinza, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostre neutro. Transferir o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secar sobre chapa quente e incinerar a 500°C até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar.¹⁶

3.1.2.4 Substâncias extraíveis em água

No mínimo 20%.⁶

Determinação de cinzas solúveis em água:¹⁷ Para o cadinho contendo cinzas totais, adicionar 25 mL de água e ferver por 5 min. Colete o material insolúvel em um cadinho de vidro ou em um papel de filtro isento de cinzas. Lavar com água quente e incinerar num cadinho durante 15 min. a uma temperatura não superior a 450°C. Subtrair o peso do resíduo em mg do peso das cinzas totais. Calcular o teor de cinzas, solúveis em água, em mg por g de material seco ao ar.

3.1.2.5 Perda por dessecação

No máximo 10%.⁶

Método gravimétrico. Reduzir a substância a pó fino, caso se apresente na forma de cristais volumosos. Pesar, exatamente, cerca de 1 a 2 g e transferir para pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Após resfriamento em dessecador, pesar o pesa-filtro, tampado, contendo a amostra. Agitar o pesa-filtro brandamente para distribuir a amostra da maneira mais uniforme possível, a uma altura ideal de 5 mm. Colocar o pesa-filtro na estufa, retirar a tampa, deixando-a também na estufa. Secar a amostra (geralmente a 105°C) e por um determinado prazo (geralmente 2 horas) especificado na monografia. Esfriar até temperatura ambiente em dessecador. Pesar. Repetir a operação até peso constante. A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação a seguir.¹⁶

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

em que

P_a = peso da amostra.

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação.

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

3.1.2.6 Resíduos de pesticidas

O limite máximo recomendável de aldrina e dieldrina não é mais do que 0,05 mg/kg. Para outros pesticidas, é necessário consultar a Farmacopeia Europeia, e diretriz da OMS sobre métodos de controle de qualidade para plantas medicinais e resíduos de pesticidas.⁶ Atualmente, a *Farmacopeia Brasileira*^{iv} não estabelece limite máximo para resíduos de pesticidas, portanto, não é permitida a presença destes nos produtos e derivados vegetais.¹⁶

3.1.2.7 Metais pesados

Determinação de metais tóxicos específicos. A espectrometria de absorção atômica é usada para a determinação da quantidade ou concentração de metais pesados específicos. Para iniciar o método, primeiramente, limpar todos os equipamentos de vidro e de laboratório com 10 g/L de solução de ácido nítrico em água livre de dióxido de carbono antes do uso. Para a solução teste, pegar um frasco de digestão e colocar a quantidade prescrita da substância a ser examinada (cerca de 0,5 g de droga em pó ou 0,5 g de óleo). Adicionar 3 mL de ácido nítrico, 1 mL de peróxido de hidrogênio e 1 mL de ácido clorídrico. Fechar o frasco hermeticamente. Colocar os frascos de digestão em forno micro-ondas. Realizar a digestão em três passos de acordo com o seguinte procedimento, para sete frascos cada um contendo a solução teste: 80% de potência durante 15 minutos, potência de 100% por 5 minutos, depois 80% de potência durante 20 minutos. No final do ciclo, permitir que os frascos se arrefeçam no ar e para cada um adicionar 4 mL de ácido sulfúrico. Repetir o programa de digestão. Após arrefecimento ao ar, abrir cada frasco de digestão e introduzir a solução límpida, incolor obtida para um balão volumétrico de 50 mL. Lavar cada frasco de digestão com duas quantidades, cada uma de 15 mL de água e recolher o líquido no balão volumétrico. Adicionar 1 mL de solução de nitrato de magnésio a 10 g/L e 1 mL de solução de di-hidrogenofosfato de amônio a 100 g/L e diluir para 50 mL com água. Para preparar a solução branco, misturar 3 mL de ácido nítrico, 1 mL de peróxido de hidrogênio (30%) e 1 mL de ácido hidrocloreídrico em um frasco de digestão. Realizar a digestão da mesma maneira como foi feito para a solução teste.¹⁷

- **Determinação de cádmio (Cd), cobre (Cu), ferro (Fe), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn)**

Medir o conteúdo de cada um deles pelo método de adição de padrão usando soluções de referência de cada metal pesado. O valor da absorbância da

^{iv} A *Farmacopeia Brasileira* 5ª edição não está mais vigente. Em 2019, foi publicada a 6ª edição e o seu volume II contém a monografia de Calêndula, com texto atualizado.

solução branco é subtraído do valor obtido com a solução teste. Os parâmetros instrumentais adequados estão listados na Tabela 1 a seguir.¹⁷

Tabela 1 – Parâmetros instrumentais para análise de metais pesados¹⁷

		Cd	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Comprimento de onda	nm	228,8	324,8	248,3	232	283,5	213,9
Largura da fenda	nm	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5
Corrente da lâmpada do cátodo	mA	6	7	5	10	5	7
Temperatura de ignição	°C	800	800	800	800	800	800
Temperatura de atomização	°C	1.800	2.300	2.300	2.500	2.200	2.000
Correção de <i>background</i>		on	on	On	on	on	on
Fluxo de nitrogênio	Litros/min.	3	3	3	3	3	3

- **Determinação de arsênio (As) e mercúrio (Hg)**

Medir o teor de arsênio e mercúrio em comparação com soluções de referência contendo estes elementos a uma concentração conhecida pela calibração direta, usando um sistema de geração de vapor de hidreto de fluxo contínuo automatizado. O valor da absorvância da solução branco é automaticamente subtraído do valor obtido com a solução teste.¹⁷

Arsênio

Solução da amostra. Para 19 mL da solução de ensaio ou da solução em branco, tal como descrito anteriormente, adicionar 1 mL de uma solução a 200g/L de iodeto de potássio. Permitir a solução teste repouso à temperatura ambiente durante cerca de 50 min. ou a 70°C durante cerca de 4 min.¹⁷

Reagente ácido. Ácido clorídrico livre de metais pesados.¹⁷

Reagente redutor. Uma solução de 6 g/L de borohidreto de sódio em uma solução de 5 g/L de hidróxido de sódio.¹⁷

Mercúrio

Solução da amostra. Solução teste ou solução branco, como descrito anteriormente.¹⁷

Reagente ácido. Uma solução de 515 g/L de ácido clorídrico livre de metais pesados.¹⁷

Reagente redutor. Uma solução de 10 g/L de cloreto estanhoso ou borohidreto de sódio em ácido clorídrico diluído.¹⁷

Os parâmetros instrumentais na Tabela 2 podem ser usados.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais para determinação de arsênio e mercúrio¹⁷

		As	Hg
Comprimento de onda	nm	193,7	253,7
Largura da fenda	nm	0,2	0,5
Corrente da lâmpada do cátodo	mA	1,0	4
Taxa de fluxo do reagente ácido	ml/min.	1,0	1,0
Taxa de fluxo do reagente redutor	ml/min.	1,0	1,0
Taxa de fluxo da solução amostra	ml/min.	7,0	7,0
Célula de absorção		Quartzo (aquecido)	Quartzo (não aquecido)
Correção de <i>background</i>		on	on
Taxa de fluxo de nitrogênio	Litro/min.	0,1	0,1
Aquecimento		800°C	100°C

3.1.2.8 Identificação

Os testes de identificação e de doseamento não estão presentes na monografia da Calêndula na WHO,⁶ portanto, estes dois testes foram retirados da *Farmacopeia Brasileira*,^v podendo sofrer adaptações, se necessário. Para o teste de identificação será utilizada a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando sílica gel GF254, com espessura de 250 µm e mistura de ácido fórmico anidro, água e acetato de etila (10:10:80) como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 20 µL da solução¹ e 10 µL da solução.² Para preparar a solução¹ é necessário ferver sob refluxo 1 g da droga pulverizada com 10 mL de metanol durante 10 min. e filtrar. Para a solução² deve-se 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

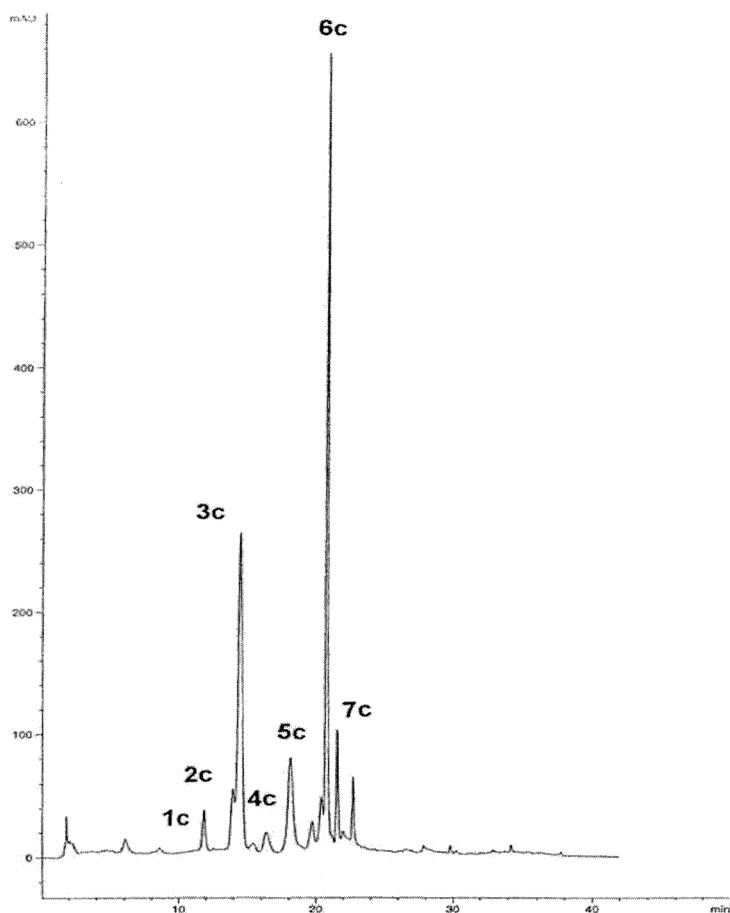
^v A *Farmacopeia Brasileira* 5ª edição não está mais vigente. Em 2019, foi publicada a 6ª edição e o seu volume II contém a monografia de Calêndula, com texto atualizado.

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, depois examinar sob luz ultravioleta (365 nm). O cromatograma obtido com a solução² deve apresentar no terço inferior da placa duas manchas fluorescentes, uma de coloração marrom-amarelada (rutina) e outra de coloração azul-clara (ácido clorogênico); e no terço superior, uma mancha fluorescente de coloração azul-clara (ácido cafeico). O cromatograma da solução¹ 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-clara, correspondentes em posição à mancha obtida com o ácido clorogênico no cromatograma da solução;² manchas fluorescentes verde-amarelada e azul-clara correspondente em posição à mancha obtida com o ácido cafeico no cromatograma da solução.^{2,8}

3.1.2.9 Doseamento

Na literatura foram encontrados vários métodos para quantificação de marcadores da calêndula utilizando tanto Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae) quanto espectrofotometria de ultravioleta. Como no estudo para quantificação do laurato de faradiol, miristato de faradiol e palmitato de faradiol por Clae, utilizando como padrão interno o acetato de lupeol, pelo método de calibração externa.¹⁸ Em outro estudo, foi realizada a quantificação usando Clae com detector de arranjo de diodos acoplado a um espectrômetro de massas (Clae-DAD-EM). Neste estudo foi analisada a tintura da calêndula (60%, v/v) onde foram quantificados sete picos (1c-7c). Todos os constituintes 1c-7c mostraram idêntica absorção no UV com máximos de absorção em torno de 256 e 355 nm, típico de flavonoides. Além disso, a presença em todas as massas do íon em m/z 303 ou 371 indicou que os constituintes 1c-7c eram derivados de quercetina ou isoramnetina (Figura 6). Os constituintes químicos identificados foram: queercetina-3-O-rutinosilramnosídeo (**1c**), rutina (**2c**), isoramnetina-3-O-rutinosilramnosídeo (**3c**), isoquercitrina (**4c**), isoramnetina-3-O-glicosilglicosídeo (**5c**), narcisina (**6c**) e isoramnetina-3-O-glicosídeo (**7c**).¹⁹

Figura 6 – Perfil cromatográfico da tintura de calêndula (60% v/v) por Clae-DAD-EM com as atribuições dos compostos detectados¹⁹



Como o custo na aquisição e na manutenção de um instrumento com o cromatógrafo líquido de alta eficiência é alto para a maioria dos laboratórios, será descrito o método da *Farmacopeia Brasileira*^{vi} para o doseamento utilizando um espectrofotômetro de UV para quantificar flavonoides totais. Primeiramente, devem-se preparar as soluções estoque, amostra e branco. Para preparar a solução estoque é necessário pesar 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 min. 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 min. Após resfriamento até temperatura ambiente filtrar a solução para o balão

^{vi} A *Farmacopeia Brasileira* 5ª edição não está mais vigente. Em 2019, foi publicada a 6ª edição e o seu volume II contém a monografia de Calêndula, com texto atualizado.

volumétrico de 100 mL. Repetir a operação e em seguida completar o volume do balão volumétrico com acetona. Em um funil de separação adicionar 20 mL dessa solução e 20 mL de água destilada, depois 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 acetato de etila e lavá-las em funil de separação, com duas porções de 50 mL de água destilada. Transferir a fase acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com acetato de etila. Para preparar a solução amostra serão necessários 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. Fazer uma diluição em balão volumétrico de 25 mL com solução de ácido acético 5% (v/v) em metanol. Para a solução branco é necessário 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. 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 de acordo com a expressão:

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

Na qual,

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 ($C_{21}H_{20}O_{12}$). Realizar os cálculos considerando $A(1\%, 1\text{ cm}) = 500$.⁸ Não deve conter menos que 0,4% de flavonoides totais, calculados como hiperosídeo, por espectrofotometria.^{6,8}

■ 3.2 PARA O DERIVADO VEGETAL E PRODUTO ACABADO

Primeiramente, com relação ao derivado vegetal, um estudo fez uma comparação das propriedades físico-químicas de extratos hidroalcoólico e glicólico de *C. officinalis*. Os autores demonstram que o extrato hidroalcoólico e glicólico possuem características físico-químicas semelhantes com relação à concentração de flavonoides totais segundo determinação espectrofotométrica, mas os dois extratos diferiram com relação ao peso seco, com o extrato hidroalcoólico possuindo um valor de 3,6% (m/m), diferentemente do extrato glicólico com peso seco de

2,4% (m/m). O perfil cromatográfico por intermédio de CCD também foi diferente, com o extrato hidroalcoólico mostrando a presença de rutina, ácido clorogênico e hiperosídeo, enquanto que o extrato glicólico mostrou a presença apenas de heterosídeo.²⁰ Em outro estudo, foi feita uma análise comparativa da qualidade de extratos de *C. officinalis* preparados em farmácias de manipulação de Ribeirão Preto (São Paulo). Foram adquiridos do comércio local tinturas ou extratos glicólicos de *C. officinalis*. Os extratos comerciais (dez amostras) foram comparados a extratos de referência preparados pelos autores segundo o preconizado pela *Farmacopeia Brasileira* (segunda edição). Os parâmetros avaliados foram: densidade relativa, pH, resíduo seco, teor de flavonoides totais, e o perfil cromatográfico por meio de CCD. Entre os resultados relatados, o valor encontrado para densidade relativa foi de 0,955 g/ mL (\pm 0,0145; CV 1,5%) para as tinturas e 1,050 g/mL (\pm 0,0405; CV 3,9%) para os extratos glicólicos. O pH teve valor de 5,46 (\pm 0,1972; CV 3,6%) para tinturas e 5,24 (\pm 0,3346; CV 6,4%) para os extratos glicólicos. Resíduo seco foi de 1,9% m/m (\pm 0,7841; CV 40,7%) para tinturas e de 1,6% m/m (\pm 0,9779; CV 60,4%) para os extratos glicólicos. Quantificação dos flavonoides resultou em 0,022% m/m (\pm 0,0122; CV 54,3%) para as tinturas e 0,005% m/m (\pm 0,0040; CV 89,8%) para extratos glicólicos. Perfis cromatográficos foram semelhantes ao extrato padrão em 60,0% das amostras das tinturas e 90,0% das amostras dos extratos glicólicos.²¹ A avaliação comparativa de certificados de análise de empresas que comercializam a tintura de *C. officinalis* foi realizada em outro estudo. Os certificados foram obtidos de uma amostra aleatória entre aqueles recebidos de fornecedores do Laboratório de Manipulação Farmacêutica da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto. Os autores demonstraram que faltam nestes certificados uma padronização com relação aos parâmetros de análise, aos valores de referência inconsistentes entre os certificados, à omissão de dados referentes ao processo de extração e a uma quantidade muito pequena de certificados com informações referentes a análises quantitativas dos princípios ativos e análises microbiológicas.²²

Com relação ao produto acabado, um estudo avaliou a espalhabilidade e o teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *C. officinalis*. Os autores realizaram estudo reológico com pomadas à base de extratos hidroalcoólico e glicólico de *C. officinalis*, preparadas a quente (solução) ou a frio (suspensão). Os resultados demonstram que as pomadas preparadas a frio tiveram melhores características de espalhabilidade, enquanto que aquelas preparadas à base de extratos hidroalcoólicos resultaram em pomadas com maiores teores de flavonoides do que aquelas preparadas à base de extratos glicólicos.²³

■ 3.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS

Os constituintes majoritários são saponinas triterpênicas (2-10%) tendo como base o ácido oleanólico (ex.: Calendulosídeos) e flavonoides (3-O-Glicosídeos de isoramnetina e quercetina), incluindo astragalina, hiperosídeo, isoquercitrina e rutina. Outros constituintes incluem óleos essenciais, sesquiterpenos (ex.: cariofileno) e triterpenos (ex. α - e β - amirinas, lupeol e lupenona).⁶ Usando a técnica de Clae foram encontrados os seguintes carotenoides: licopeno, luteína, β -caroteno, neoxantina, violaxantina e anteraxantina.²⁴ Triterpenoides, especialmente os ésteres palmitato de faradiol, miristato de faradiol e laurato de faradiol, são considerados como sendo os princípios ativos em preparações de calêndula, utilizados para aplicação tópica contra inflamações da pele e mucosas e na cicatrização de feridas. Foi realizado um estudo para a quantificação destes faradiol-3-O-monoésteres por meio de Clae de fase reversa, com padronização interna (usando o acetato de lupeol), em diferentes partes da planta, como, flores, discos florais, brácteas e folhas. Os estudos demonstraram que houve uma diferença significativa destes constituintes em diferentes partes da planta.¹⁸ A Figura 7 mostra a estrutura dos 3-O monoésteres do faradiol e a Figura 8 mostra o cromatograma obtido neste estudo.

Figura 7 – Estrutura dos monoésteres do faradiol, onde, R = lauril, miristil ou palmitil¹⁸

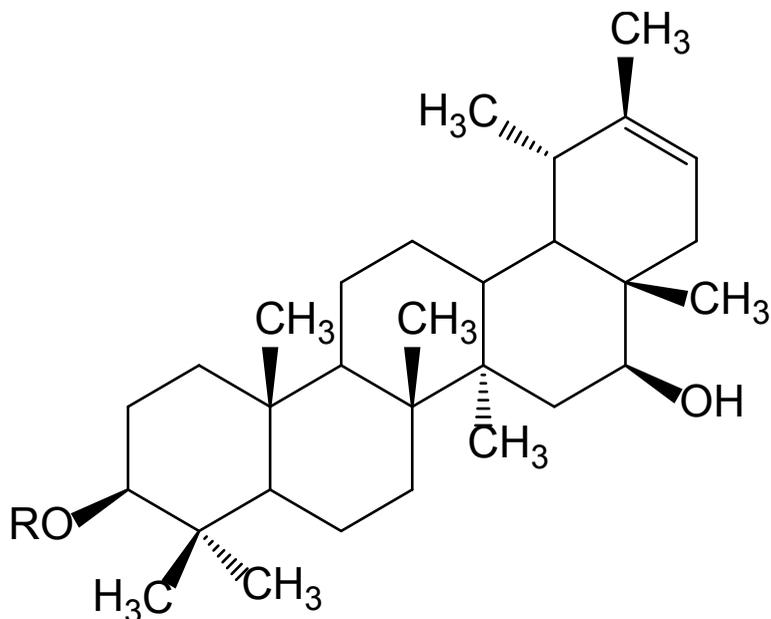
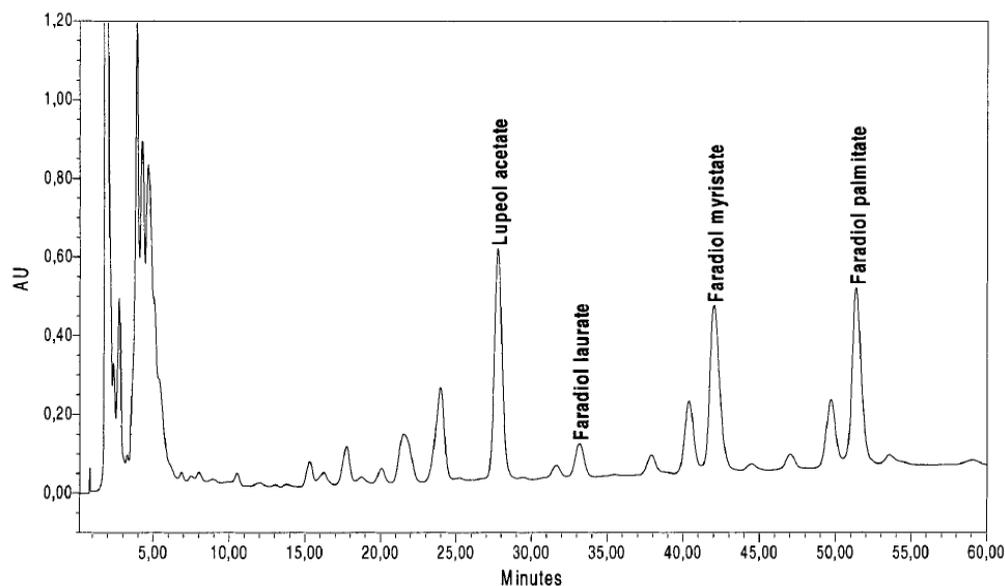
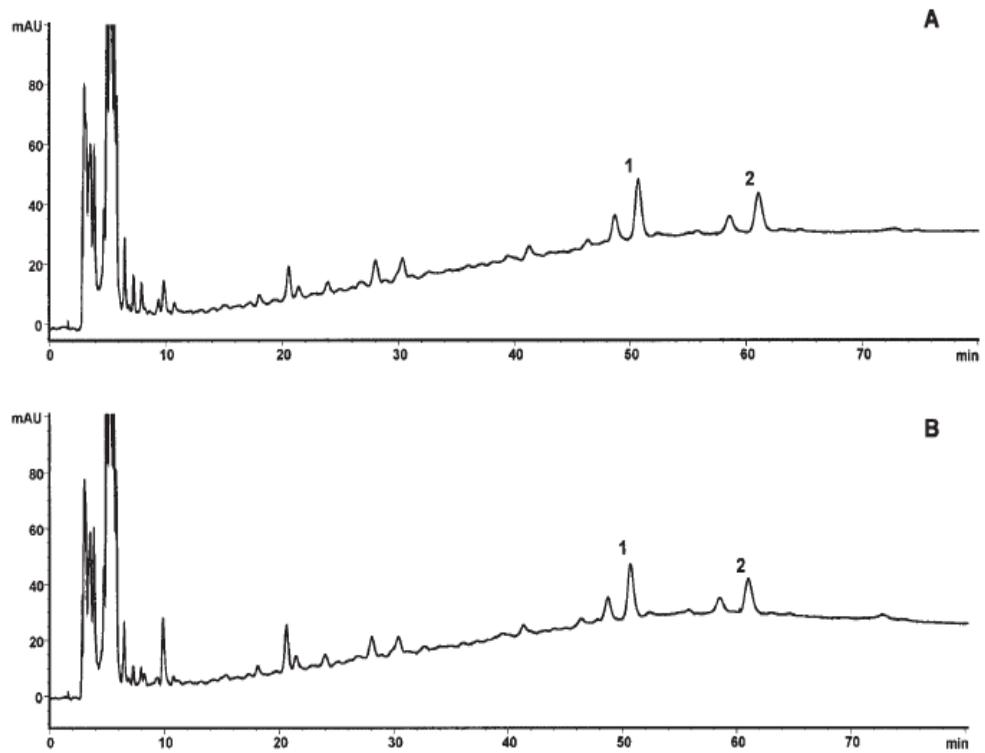


Figura 8 – Cromatograma do extrato das flores de *Calendula officinalis* L. mostrando a separação dos 3-O-monoésteres do faradiol¹⁸

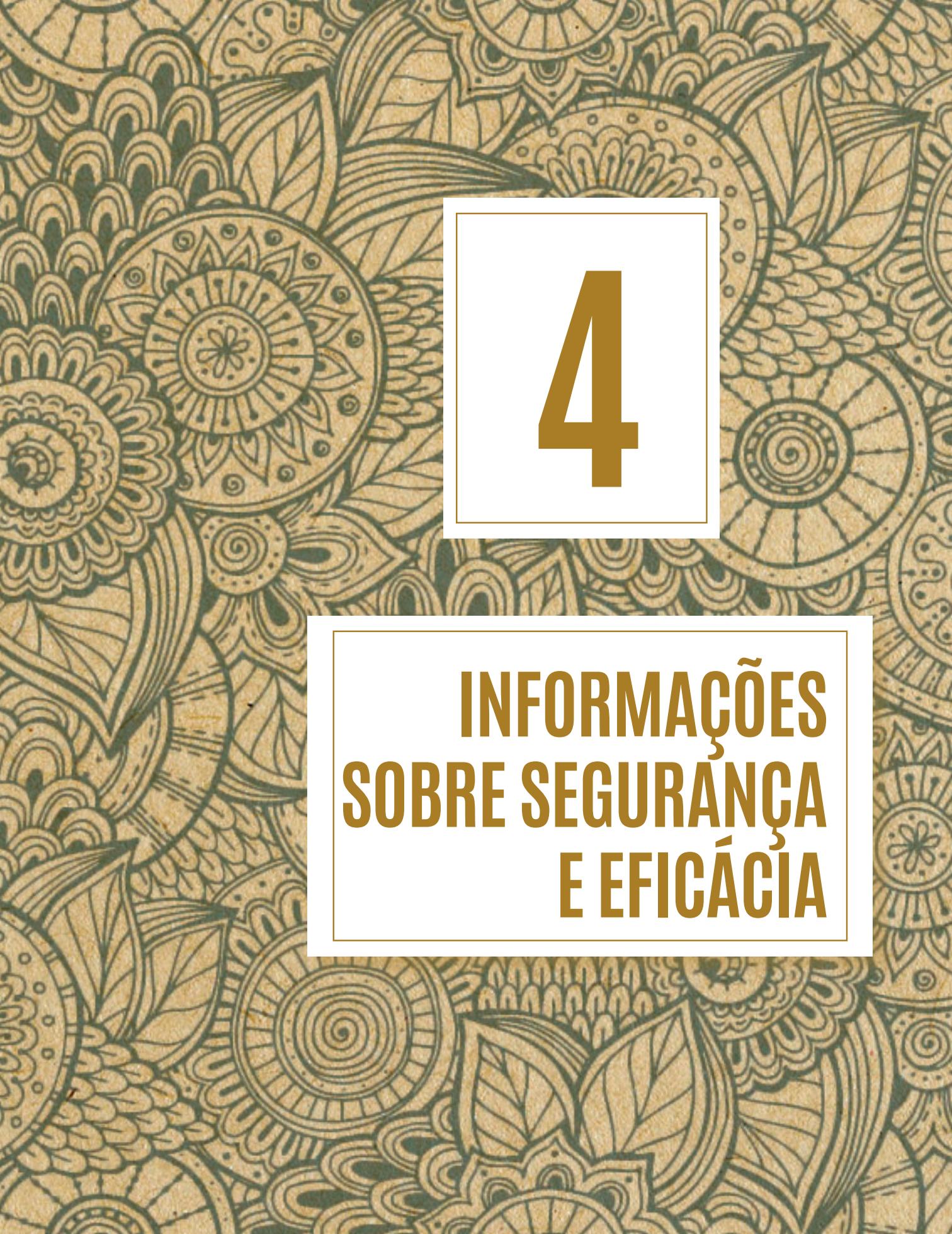


Outro estudo envolvendo o palmitato de faradiol e miristato de faradiol foi para investigar os efeitos da pressão e do solvente na extração por fluido supercrítico destas substâncias com dióxido de carbono em altas pressões. Pressões maiores do que 300 bar e mudanças na concentração de metanol de 0-20% (v/v) foram usadas na extração à temperatura de 50°C.²⁵ O cromatograma obtido do extrato identificando os dois ésteres, extraídos com fluido supercrítico, está mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Cromatogramas obtidos por Clae dos ésteres 1 e 2 do faradiol em extratos obtidos por fluido supercrítico usando uma extração analítica (A) e extração em escala piloto (B). As extrações foram com dióxido de carbono puro por 3h a 50°C e 500 bar. Identificação dos picos: 1 faradiol-3-O-miristato e 2 faradiol-3-O-palmitato²⁵







4

**INFORMAÇÕES
SOBRE SEGURANÇA
E EFICÁCIA**

■ 4.1 USOS POPULARES E/OU TRADICIONAIS

A *Calendula officinalis* é utilizada na medicina popular e/ou tradicional para o tratamento de afecções de pele, como cortes superficiais, inflamação da pele e mucosas,⁶ eritemas, queimaduras, gengivite,²⁶ artrite,^{6,27} eritema²⁸ e como cicatrizante.^{6,29} Outros usos descritos, mas não fundamentados em estudos pré-clínicos ou clínicos, incluem o tratamento de amenorreia, febre, angina, gastrite, hipotensão, icterícia, reumatismo e vômitos.^{6,26} Também são relatados usos como antiespasmódico, diaforético, anti-hemorrágico e emenagogo.³⁰

■ 4.2 PRESENÇA EM NORMATIVAS SANITÁRIAS BRASILEIRAS

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa n.º 10/2010, já revogada, incluía *C. officinalis* como droga vegetal sujeita a notificação.³¹ Da mesma forma, a espécie consta na Instrução Normativa (IN) da Anvisa n.º 2, de 13 de maio de 2014,³² inclui a *Calendula officinalis* como produto tradicional fitoterápico de registro simplificado:

Nomenclatura botânica: *Calendula officinalis*

Nomenclatura popular: Calêndula

Parte utilizada: Flores

Forma de utilização: Infusão: 1-2 g (1 a 2 col. chá) em 150 mL (xíc. chá)

Posologia e modo de usar: Aplicar compressa na região afetada 3 x ao dia

Via: Tópico

Uso: Adulto/Infantil

Alegações: Inflamações e lesões, contusões e queimaduras.



■ 4.3 ENSAIOS NÃO CLÍNICOS

4.3.1 Ensaios toxicológicos

4.3.1.1 Toxicologia aguda

O Quadro 1, a seguir, mostra os estudos de toxicidade aguda envolvendo extratos de *C. officinalis* encontrados na literatura pesquisada. Todos os estudos envolveram a administração por via oral (gavagem) de extratos obtidos das flores de *C. officinalis* a ratos ou camundongos, e os estudos envolveram animais de ambos os sexos, com exceção do trabalho conduzido por Ropashree *et al.*³³ Os extratos foram sempre aquosos ou uma fração aquosa de extrato hidroalcoólico. O estudo de Ropashree *et al.*³³ apresentou como limitação, além de ter utilizado apenas ratas, ter utilizado uma associação de extratos de várias espécies vegetais, e portanto, a ausência de toxicidade nas doses investigadas não pode ser conclusiva. Os parâmetros monitorados envolveram desde a observação de alterações comportamentais até parâmetros bioquímicos e estudos histopatológicos. Apesar de comprovada ausência de toxicidade dos extratos em doses de até 5 g/kg peso, o significado destes estudos para o uso tópico de *C. officinalis* não é diretamente correlacionável. Como o uso de *C. officinalis* é majoritariamente tópico, para afecções da pele, testes de irritabilidade cutânea são claramente os mais relevantes, especialmente por tratar-se de espécie da família *Asteraceae*, uma família que possui plantas com conhecida capacidade de sensibilização cutânea. Entretanto, os estudos relatados aqui são importantes, pois demonstram um potencial muito baixo de toxicidade caso o uso tópico venha a resultar em absorção sistêmica significativa.

4.3.1.2 DL_{50}

A Cooperação Científica Europeia para Fitoterapia³⁴ relata alguns estudos que determinaram a DL_{50} de extratos de *C. officinalis*. A fração aquosa das folhas de *C. officinalis* demonstrou uma DL_{50} de 375 mg/kg peso quando administrada por via intravenosa em camundongos, enquanto que, quando administrada por via intraperitoneal a DL_{50} foi de 580 mg/kg peso. Já a toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico (extraído com etanol a 30%, e com uma razão droga vegetal: líquido extrator de 1:1) administrado por via subcutânea foi relatada como sendo de 45 mg em camundongos e a DL_{50} deste mesmo extrato para administração por via intravenosa foi de 526 mg/100 g em ratos. Um extrato glicólico (2:1) de *Calendula officinalis* administrado a 10 mL/kg por via subcutânea em camundongos não demonstrou sinais de toxicidade.

4.3.1.3 Toxicidade de doses repetidas

Estudos de doses repetidas de extratos de *C. officinalis* variaram de uma duração de tratamento de 20 dias (para avaliação da toxicidade reprodutiva) a até 90 dias em um único estudo. Todos os estudos encontrados na literatura avaliaram a via de administração oral (gavagem). As alterações encontradas com maior frequência após a administração de doses repetidas do extrato foram modificações no perfil bioquímico e elevações das enzimas hepáticas (Tabela 4). Assim, em um estudo³⁵ que avaliou a toxicidade de um extrato aquoso das flores de *Calendula officinalis* administrado a ratos Wistar nas doses de 50, 250 e 1.000 mg/kg, verificou-se ausência de toxicidade aguda, mas no estudo subcrônico vários parâmetros hematológicos foram afetados, tais como a taxa de hemoglobina, eritrócitos, leucócitos e a coagulação sanguínea. As enzimas ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) e a fosfatase alcalina também sofreram alterações e os exames histopatológicos hepáticos demonstraram anormalidades no parênquima do fígado consistentes com as alterações bioquímicas observadas. A análise do grupo satélite demonstrou que a maioria destas alterações foi reversível e os autores concluem que o potencial tóxico da calêndula, após administração de doses repetidas, é baixo. Em outro estudo,³⁶ que avaliou o efeito da administração diária durante quatro semanas, por via oral, da fração solúvel em água do extrato etanólico das flores de *C. officinalis* nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos, utilizando doses de 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, também foram observadas alterações bioquímicas em relação ao grupo controle, como nas taxas de creatinina, na glicemia, proteínas totais e albuminas, além de alterações no número de neutrófilos e linfócitos, mas todas estas alterações se deram dentro dos limites da normalidade para estes parâmetros. Uma baixa toxicidade para o extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* também foi observada em estudo³⁷ com a administração diária por 30 dias (via oral) em ratas Wistar. As alterações mais significativas relatadas foram um aumento de 24,2% para ureia na maior dose estudada e aumento de 62,3; 30,2 e 44,4%, para ALT nas doses de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente. Este mesmo padrão de toxicidade foi observado em estudo³⁸ que avaliou a administração por via oral de extrato hidroalcoólico nas doses de 0,025; 0,25; 0,5; e 1,0 g/kg diariamente por 30 dias em ratos Wistar machos. No estudo, os parâmetros hematológicos mantiveram-se dentro da normalidade, e também os parâmetros bioquímicos, exceto pelo aumento dose-dependente de nitrogênio/ureia sanguíneos, além da creatinina e alanina aminotransferase. No estudo histológico, sinais de inflamação leve foram observados. Tomados em conjunto, a toxicidade de doses repetidas de extratos das flores de *Calendula officinalis* pode ser considerada baixa, mas cautela deve ser exercitada na administração oral por períodos prolongados, especialmente em indivíduos com problemas hepáticos, renais ou hematológicos.

Quadro 1 – Estudos de toxicidade aguda de *Calendula officinalis* encontrados na literatura pesquisada

REF.	Via	Dose e tipo de extrato	Frequência Administrativa	Espécie animal/ Número de animais	Parâmetros observados	Período de observação	Valor DL ₅₀	Resultado Observado	Limitações do Estudo
(39)	Oral (gavagem)	2 g/kg peso corporal; extrato aquoso (3:1) seco por spray dryer. Extrato padronizado em quercetina.	Dose única	Ratos Wistar, 3 machos e 3 fêmeas	Mudanças comportamentais e sinais de toxicidade e exame macroscópico de órgãos e tecidos.	14 dias	N.D.	Nenhuma alteração foi relatada durante o período de observação.	Número pequeno de animais.
(33)	Oral (gavagem)	5g/kg peso corporal. Tratamento foi com uma associação de extratos aquosos de diferentes espécies (<i>Momordica charantia</i> , <i>C. officinalis</i> e <i>Cassia tora</i>).	Dose única	Ratos Sprague-Dawley, 6 fêmeas	Parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos, peso corporal, peso órgãos, e exame histopatológico.	14 dias	N.D.	Nenhuma alteração foi relatada durante o período de observação.	Número pequeno de animais. Tratamento foi com associação de extratos.
(40)	Oral (gavagem)	0.625; 1,25; 2,5 e 5,0 g/kg peso corporal. Extrato hidroalcoólico (70%), seco e redissolvido em água.	Dose única	Ratos Wistar e Camund. Swiss, 10 por grupo, machos e fêmeas	Sinais gerais de toxicidade e mortalidade.	14 dias	Maior que 5 g/kg peso	Nenhuma alteração foi relatada durante o período de observação	Não descrito.

Fonte: Autoria própria.

Quadro 2 – Estudos de toxicidade de doses repetidas de *Calendula officinalis* L. encontrados na literatura pesquisada

REF	Via	Dose e tipo de extrato	Frequência Administrativa	Espécie animal/ Número de animais	Parâmetros observados	Período de observação	Resultado Observado	Limitações Estudo
(39)	Oral (gavagem)	Extrato aquoso das flores, padronizado em quercetina. Grupos de animais e doses: animais controle, 50 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 1.000 mg/kg/dia e grupo satélite na dose de 1.000 mg/kg/dia.	Diária durante 90 dias	Ratos Wistar. 50 animais machos e 50 fêmeas alocados aleatoriamente em 5 grupos de 10 animais.	Hematócrito, hemoglobina, contagem de hemácias e leucócitos, tempo de coagulação, glicose, colesterol total, ureia, ALT, AST, histologia e peso de órgãos selecionados.	90 dias	Aumento na contagem de leucócitos totais em fêmeas (28 dias), e contagem diferencial de leucócitos em fêmeas e machos no grupo de 1.000 mg/kg/dia, aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos no grupo de 100 mg/kg/dia. Diminuição de hemoglobina em fêmeas nas doses de 250 e 1.000 mg/kg/dia. Eritrócitos e leucócitos tanto em machos e fêmeas aumentados de maneira dose-dependente, tempo de coagulação aumentado em machos nas doses de 250 e 1.000 mg/kg/dia. Concentração da hemoglobina corpuscular média diminuída em fêmeas nas concentrações de 250 e 1.000 mg/kg/dia. Aumento nos eritrócitos e diminuição de hemoglobina não foram reversíveis. Aumento no peso cardíaco no grupo de dose mais baixa, mas não no grupo todo com dose média e alta. Algumas alterações histológicas hepáticas	Não utilizou espécie de não roedor.
(41)	Oral (gavagem)	0,1; 0,3; e 1,0g/kg peso do extrato etanólico (etanol a 96°C) das flores dissolvido em água.	Diariamente por 4 semanas.	Ratos Wistar 10 animais machos/grupo 160-190 g (2 meses)	Evolução ponderal, parâmetros hematológicos (hemograma completo), bioquímicos (função hepática, com dosagem de fosfatase alcalina), alanina aminotransferase – AST –, proteínas totais e albumina). A função renal foi avaliada por meio da dosagem da ureia e creatinina. Também foram avaliadas as concentrações séricas de colesterol, triglicérides e glicemia.	30 dias	Diferença significativa, mas dentro dos valores de referência quanto aos parâmetros creatinina, glicemia, proteínas totais e albuminas em relação ao controle. O tratamento com extrato etanólico de calêndula a 1 g/kg diminuiu significativamente o número de linfócitos e aumentou significativamente o número de neutrófilos em relação ao grupo controle, mas dentro dos limites de normalidade.	Não utilizou espécie de não roedor e não realizou estudo histopatológico. Sem grupo satélite para testar reversão das alterações

continua



conclusão

REF	Via	Dose e tipo de extrato	Frequência Administrativa	Espécie animal/ Número de animais	Parâmetros observados	Período de observação	Resultado Observado	Limitações Estudo
(37)	Oral (gavagem)	0,25; 0,5 e 1g/kg de peso do extrato hidroalcoólico das flores.	Diariamente por 30 dias consecutivos.	40 ratas Wistar, 3 meses de vida.	Sinais clínicos de toxicidade, massa corporal e consumo de água e ração. Parâmetros hematológicos e bioquímicos.	30 dias	Os resultados mostram que durante o período do tratamento não se observou sinais de toxicidade ou morte. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a massa dos órgãos não foram modificados pela administração subcrônica do EHA, excetuando-se aumento significativo de 24,2% para ureia na maior dose estudada e aumento, respectivamente, de 62,3%, 30,2% e 44,4%, para ALT. Na hematologia, registrou-se flutuação dentro dos valores de referência na contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos.	Não utilizou espécie de não roedor e não usou satélite para testar reversão das alterações
(42)	Oral (gavagem)	Extrato hidroalcoólico (70% álcool) das flores, dissolvido em água para concentração de 350-450 mg/mL (possuindo >0,4% flavonoides totais, <i>Farmacopeia Brasileira</i>). A dose administrada foi de 0,25; 0,5 e 1,0 g/kg/dia por 60 dias para toxicidade reprodutiva em machos e 19 dias para toxicidade fetal em fêmeas.	Diariamente por 60 dias (machos) e 20 dias (fêmeas).	4 grupos de ratos machos foram aleatoriamente alocados e o extrato administrado diariamente. Ganho ponderal e sinais de toxicidade geral foram observados diariamente. Do dia 53 ao 60, os animais foram colocados com fêmeas para acasalamento e vários parâmetros de toxicidade reprodutiva foram avaliados. Para o estudo de toxicidade fetal, as fêmeas foram acasaladas e tratadas com o extrato de <i>C. officinalis</i> nas doses citadas nas 3 fases do desenvolvimento fetal (pré-implantação, do dia 1º ao 6, organogênese, do dia 7 a 14, e crescimento fetal, 15 a 19) e parâmetros de toxicidade geral e fetal observados.	Estudo de toxicidade reprodutiva (machos): toxicidade geral, mortalidade, número de nascidos/fêmea, índice de fertilidade, índice de viabilidade, índice de lactação, e ganho ponderal nos nascidos; peso e exame histológico dos órgãos do aparelho reprodutor. Para o estudo com as fêmeas foram observados sinais de toxicidade geral e ganho ponderal durante a gravidez, o número de sítios de implantação e reabsorção, número de neonatos vivos e mortos, peso da placenta e índices de perda pré e pós-implantação.	60 dias para os machos e 19 dias para as fêmeas.	Não foram observados sinais de toxicidade reprodutiva em ratos machos com doses de até 1g/kg/dia. No estudo de toxicidade em fêmeas, observou-se redução ponderal apenas com o grupo tratado com a dose mais elevada (1g/kg/dia) durante fase final da gravidez (20 dias). Sinais de toxicidade materna ou fetal não foram observados na fase inicial da gravidez.	Espécie de não roedor não foi usada. Reversibilidade dos efeitos não foi avaliada.
(43)	Oral (gavagem)	Extrato hidroalcoólico (70% álcool) das flores, dissolvido em água para concentração de 350-450 mg/mL foi administrado nas doses 0.025, 0.25, 0.5 e 1.0 g/kg/dia.	Diariamente por 30 dias	Ratos Wistar machos 310-340 g (idade não especificada) em 5 grupos foram alocados aleatoriamente (1 grupo controle e 4 grupos teste). Ganho ponderal, sinais de toxicidade geral, e mortalidade eram observados diariamente. Ao fim do tratamento, estudo hematológico e morfológico (histopatológico) foram conduzidos.	Eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração hemoglobina corpuscular média, glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta, proteínas totais, albumina e globulina.	30 dias	A administração oral do extrato em doses de até 1g/kg/dia não levou a sinais de toxicidade. Os parâmetros hematológicos mantiveram-se dentro da normalidade para o grupo controle e para os grupos teste. Quase todos os parâmetros bioquímicos se comportaram da mesma maneira, com exceção de um aumento dose-dependente do nitrogênio/ureia sanguíneo, bem como de creatinina e alanina aminotransferase. No estudo histológico, sinais de inflamação leve hepática.	Sem espécie de não roedor. Reversibilidade dos efeitos observados não foi investigada em grupo satélite.

Fonte: Autoria própria.

4.3.1.4 Toxicidade Reprodutiva

Estudos relacionados à toxicidade reprodutiva de extratos ou outras preparações à base de *Calendula officinalis* são escassos na literatura. Um estudo pré-clínico⁴⁴ envolvendo um extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* (etanol a 70%, padronizado em flavonoides totais) administrado por gavagem a ratos Wistar machos e fêmeas diariamente por 60 dias nas doses de 0,25; 0,5; e 1,0 mg/kg, avaliou a toxicidade reprodutiva por meio do acasalamento de ratos machos tratados e fêmeas não tratadas entre os dias 53 e 60 de tratamento. No mesmo estudo, em um segundo protocolo, grupos de ratas grávidas foram tratadas por via oral, nas mesmas doses descritas anteriormente, entre os dias 1º a 6 (período de pré-implantação), 7 a 14 (período de organogênese) ou 15 a 19 (período fetal) de gravidez. No 20º dia, os animais foram sacrificados para avaliação dos parâmetros maternos e fetais. O estudo demonstrou que o tratamento com o extrato não afetou os parâmetros reprodutivos masculinos, tais como número de crias/fêmea, índice de viabilidade e índice de lactação. O estudo também não encontrou sinais de toxicidade nos períodos de pré-implantação e organogênese fetal. O único parâmetro que sofreu alteração foi o peso corporal materno durante o período fetal, que foi diminuído ($p < 0,05$) no grupo tratado na dose de 1 mg/kg em relação a animais do grupo controle.

4.3.1.5 Estudos de mutagenicidade e genotoxicidade

Na literatura pesquisada, alguns estudos foram encontrados relativos a ensaios de genotoxicidade envolvendo extratos de *Calendula officinalis*, tanto com o foco em seu uso como insumo para medicamentos fitoterápicos quanto em seu uso em preparações cosméticas. Em um ensaio para avaliar a atividade genotóxica de um extrato hidroalcoólico das flores de *Calendula officinalis* (resíduo seco de 101 mg/mL, em 60% álcool, v/v), Ramos, *et al.*⁴⁵ relatam atividade genotóxica concentração-dependente do extrato em concentrações variando de 50 a 5.000 µg sólidos/placa. Não foi observado aumento dos reversores de genótipo no teste de Ames para as quatro cepas bacterianas utilizadas (com ou sem ativação metabólica) na faixa de concentrações utilizadas (50-5.000 µg sólidos/placa). Evidência de genotoxicidade foi observada com um modelo que utiliza o fungo *Aspergillus nidulans* em concentrações mais elevadas (0,1 a 1,0 mg/mL), na forma de permutação e de desagregação cromossômicas. Este efeito foi atribuído pelos autores ao componente calendina, uma terpeno-lactona presente na fração clorofórmica, com base em resultados preliminares de fracionamento biomonitorado do extrato hidroalcoólico. Em outro estudo, conduzido por Pérez-Carreón *et al.*,⁴⁶ o objetivo foi investigar o efeito genotóxico e antígenotóxico de extratos de *C. officinalis* (incluindo os extratos aquoso, hidroalcoólico, etanólico

e clorofórmico das flores) em um modelo de cultura de células hepáticas de rato tratadas com dietilnitrosamina. Os extratos aquoso, hidroalcoólico, etanólico e clorofórmico foram dissolvidos de forma a ajustar a sua concentração para 225 µg de sólidos/mL solvente. Os extratos foram dissolvidos em salina (extrato aquoso e hidroalcoólico) ou DMSO (extrato etanólico e clorofórmico) e então adicionados à cultura de hepatócitos. Como medida da síntese não programada de DNA (“unscheduled DNA synthesis”), a incorporação de timidina tritiada foi medida com um contador de cintilação. Como resultado, os autores descrevem que os extratos etanólico e clorofórmico não são genotóxicos em concentrações de até 50 microgramas/mL e protegem parcialmente as células hepáticas da síntese de DNA induzida por dietilnitrosamina. O extrato aquoso ou hidroalcoólico em concentrações da ordem de ng/mL protegem completamente as células hepáticas frente à síntese de DNA induzida por dietilnitrosamina, mas em concentrações três ordens de magnitude maior são genotóxicas. Em outro estudo que teve como objetivo testar o efeito protetor do extrato glicólico das pétalas e do botão floral de *C. officinalis*, Frankic T *et al.*⁴⁷ avaliaram o efeito de extratos de calêndula sobre dano oxidativo e dano ao DNA induzido por ingestão elevada de ácidos graxos poli-insaturados. A metodologia do estudo envolveu animais (porcos) alocados aleatoriamente em cinco grupos experimentais. O primeiro grupo (controle) foi alimentado com uma dieta baixa em substâncias antioxidantes e com 10% de sua energia oriunda de gorduras. Nos outros quatro grupos experimentais uma quantidade apropriada de óleo de linhaça foi utilizada de forma a elevar a proporção de energia que seria oriunda de gordura para 30%. O segundo grupo serviu como controle positivo (óleo). O terceiro e quarto grupos tiveram sua alimentação suplementada com o extrato glicólico de *C. officinalis*. Um deles com 3 mL/dia do extrato glicólico das pétalas e o outro com 3 mL/dia dos botões florais completos. O quinto grupo recebeu como suplemento, em sua dieta, 100 mg/kg de vitamina E como comparador. Os seguintes parâmetros foram medidos: estado antioxidante total, ensaio cometa, determinação de malondialdeído (MDA), dano ao DNA nuclear em linfócitos, isoprostanos urinários, glutathione peroxidase de eritrócitos. Como resultado, o extrato 1 de *C. officinalis* (extrato das pétalas) protegeu de forma efetiva os animais do dano oxidativo ao DNA. O tratamento levou a uma tendência numérica em direção à redução da concentração plasmática de MDA e de isoprostanos (iPF2) urinários. O seu efeito foi comparável ao da Vitamina E. O extrato do botão floral demonstrou um potencial antioxidante menor. Quanto ao dano ao DNA, a dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados induziu dano oxidativo ao DNA em linfócitos do sangue periférico. Ambos os extratos foram capazes de reduzir o dano oxidativo, com potência comparável a 100 mg/kg de vitamina E. O extrato glicólico das pétalas também foi capaz de reduzir a excreção

urinária de 8-hidróxi-desoxi guanosina (8-OHdG), indicando redução do dano ao DNA. Outro estudo com saponinas isoladas de flores secas de *C. officinalis* e outras espécies foi conduzido por Dumenil *et al.*⁴⁸ Neste estudo, as saponinas testadas não exibiram potencial mutagênico em doses de 80-200 µg/tubo. As saponinas (em doses de até 400 µg/tubo), também não foram capazes de reverter o fenótipo de linhagens de *S. typhimurium*.

Mais recentemente, um estudo de Leffa *et al.*⁴⁹ avaliou o efeito mutagênico e genotóxico após duas semanas de tratamento por via oral com extratos etanólico (250 e 500 mg/kg) e aquoso (90 mg/kg) de *C. officinalis* em amostras de sangue e medula óssea de camundongos CF-1. Nenhum efeito genotóxico ou mutagênico foi observado com os extratos após duas semanas de tratamento, conforme analisado pelo ensaio cometa e ensaio de micronúcleo. Os extratos demonstraram um efeito antígeno-tóxico nas doses avaliadas em modelo de dano ao DNA induzido por metanosulfonato de metila (MMS) segundo evidenciado pelo ensaio cometa, enquanto que apenas o extrato aquoso demonstrou efeito antígeno-tóxico como evidenciado pelo ensaio de micronúcleo.

4.3.1.6 Sensibilização dérmica

Apesar de várias espécies da família *Asteraceae* (*Compositae*) serem reconhecidas como capazes de causar reações de hipersensibilidade tardia, este efeito tem sido relativamente raro com extratos de *Calendula officinalis*.^{6,50} Casos de sensibilização dérmica de baixa intensidade foram relatados anteriormente.⁵¹ No estudo de Reider *et al.*,⁵⁰ 443 pacientes foram testados não apenas com a mistura padrão de sensibilização dérmica para a família *Compositae* (*Asteraceae*), mas também com uma mistura de sesquiterpenolactonas, Arnica, Calendula e própolis. Os testes de oclusão foram aplicados por meio de câmaras Finn® com fita Scanpor® nas costas dos pacientes por dois dias e a leitura foi realizada 15 minutos e um dia após o término do período de exposição. Os resultados demonstraram que do total de 443 pacientes, nove reagiram à calêndula (2,03%). A positividade com a mistura padrão para *Compositae* foi de 18 pacientes (4,06%). Dos pacientes que responderam positivamente à exposição com extrato de calêndula, apenas quatro também reagiram positivamente à mistura padrão para *Compositae*, ou seja, cinco pacientes que sofreram sensibilização dérmica ao extrato de *Calendula officinalis* não reagiram positivamente à mistura padrão para *Compositae*, e os autores sugerem que a frequência relativamente baixa de reações a extratos de *C. officinalis* pode ser devido ao uso generalizado da mistura padrão para *Compositae*, em vez de extratos específicos de *C. officinalis* nos testes de sensibilidade dérmica. Em uma revisão sobre o uso de extratos de *Calendula officinalis* em preparações cosméticas,⁵² vários testes submetidos pela *Cosmetic*,

Toiletry and Fragrance Association, mas não publicados, todos envolvendo extratos de *C. officinalis* incorporados em produtos cosméticos deram resultado negativo em ensaios de sensibilização dérmica.

4.3.1.7 Irritação cutânea

Não foram encontradas referências originais a ensaios de irritação dérmica na literatura pesquisada, exceto quanto a uma revisão do uso de extratos de *Calendula officinalis* em preparações cosméticas.⁵² Neste artigo, os autores citam alguns estudos de irritação cutânea submetidos pela *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*, mas não publicados que demonstram baixo potencial de irritação cutânea de extratos de *C. officinalis*. Assim, um teste de oclusão envolvendo extrato aquoso de *C. officinalis* a 10%, realizado em nove coelhos, o índice primário de irritação dérmica foi de 0,0. Um creme ocular contendo extrato de *C. officinalis* também foi testado quanto ao potencial de irritação dérmico e não se mostrou irritante. Além disso, um extrato de *Calendula officinalis* (1%-5%), óleo de soja (>50%), e tocoferol (<0.1%), testado em parafina líquida a 10% não produziu irritação em coelhos no teste de Draize. Em outro teste envolvendo extrato de Calêndula, butileno glicol e água, no qual a mistura (0,5 mL) foi aplicada na pele intacta e escoriada de seis coelhos albinos, que foram avaliados 4, 24 e 48 horas depois do insulto, sinais de um eritema leve após 4 horas foram observados. Esta mesma mistura, aplicada por 19 vezes na pele de cobaias durante um período de quatro semanas não demonstrou sinais de eritema ou edema.

4.3.1.8 Irritação ocular

Não foram encontrados estudos originais envolvendo o potencial de irritação ocular de extratos da espécie na literatura pesquisada. Entretanto, um artigo de revisão sobre o uso de extratos de *C. officinalis* em preparações cosméticas⁵² cita resultados não publicados de testes de irritação ocular submetidos por associações da indústria de cosméticos. Em um destes testes, o potencial de irritação ocular de um extrato aquoso a 10% de *C. officinalis* foi avaliado em seis coelhos. O produto foi instilado no saco conjuntival de cada animal e os olhos não foram lavados. O extrato produziu irritação mínima. Em outro estudo, o potencial de irritação ocular de um creme para os olhos contendo 1% de extrato foi avaliado, tendo demonstrado não ser irritante nas condições testadas. Produtos contendo de 1-5% de extrato de *C. officinalis*, óleo de soja (compreendendo mais de 50% da formulação) e tocoferol (menos de 0,1% da formulação), veiculado em parafina líquida a 10% não demonstrou potencial de irritação em um teste de Draize em olhos de coelhos. Uma reação conjuntival foi observada em um coelho albino, de

um total de seis testados, com exposição a 0,1 mL de uma mistura de extrato de *C. officinalis*, butileno glicol e água (proporções não especificadas).

4.3.2 Ensaios farmacológicos

4.3.2.1 Atividade cicatrizante e indutora da vascularização

Como o uso principal de extratos de *Calendula officinalis* ocorre por via tópica, para afecções da pele e como auxiliar na cicatrização, esta atividade é relativamente bem caracterizada do ponto de vista pré-clínico em vários estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em um destes estudos,⁵³ o efeito do extrato hexânico de *C. officinalis* sobre a proliferação de fibroblastos foi estudado *in vitro*, utilizando um ensaio com fibroblastos de camundongos albinos Swiss 3T3, sendo estes cultivados em placas de 96 poços, sob lamínulas, até a confluência de uma monocamada e em seguida com o auxílio da ponteira de uma micropipeta, uma banda retangular desta monocamada era raspada da lamínula (*scratch assay*). Após a raspagem, a migração de fibroblastos para a área raspada foi estudada com o auxílio de microscopia óptica de fluorescência, e o número de células que proliferavam na área raspada pôde ser quantificado. Utilizando este ensaio, os autores demonstraram que o efeito em aumentar a proliferação de fibroblastos dos extratos hexânico e etanólico (10 g material vegetal/ 150 mL solvente extrator) de *C. officinalis*, presentes em uma concentração de 10 µg/ mL nos poços, foi de 64,3 e 74,5%, respectivamente, em relação ao tratamento com controle (0,25% de DMSO). Os autores também demonstraram que duas substâncias isoladas, presentes nos extratos de *C. officinalis*, o palmitato de faradiol e o miristato de faradiol (dois ésteres triterpênicos) quando em uma concentração de 50 µg/mL possuem efeito estimulante da proliferação com potência similar à dos extratos testados, o que demonstra que participam do efeito estimulante observado para os extratos, mas que não são os únicos constituintes com esta ação. Outro estudo,⁵⁴ desta vez utilizando fibroblastos gengivais humanos, confirmou a capacidade proliferativa do extrato etanólico (50%) de *Calendula officinalis*, que promoveu efeito proliferativo nas concentrações de 500 e 750 µg/mL após 12 horas de tratamento, embora a tintura de *C. officinalis* a 20% neste mesmo estudo tenha inibido a proliferação dos fibroblastos. Extratos de *Calendula officinalis* também são capazes de aumentar a revascularização, um efeito que pode contribuir para a atividade cicatrizante atribuída à espécie. Neste sentido, o efeito de extrato aquoso (3%) das flores de *C. officinalis* sobre a neovascularização foi estudado⁵⁵ utilizando o ensaio da membrana corioalantóica de galinha, que consiste em colocar o extrato em contato com a membrana corioalantóica (CAM) por meio de um orifício nos ovos e após um tempo de contato pré-determinado avaliar a vascularização por microscopia ou outra técnica

apropriada. No estudo, os ovos férteis de galinha foram incubados a 37°C durante três dias, e em seguida um orifício foi aberto na casca do ovo, o que permitiu o colapso das membranas. Os ovos foram então fechados com fita adesiva e devolvidos à incubadora até dez dias de idade. O extrato aquoso liofilizado de *Calendula officinalis* foi colocado sobre a superfície da CAM utilizando uma espátula esterilizada, enquanto que lactose serviu como controle. Os ovos foram selados e incubados durante quatro dias. Após este período, procedeu-se à avaliação “cega” das membranas para investigar a atividade angiogênica por meio de um estereomicroscópio. O número de microvasos observados nas membranas tratadas com extrato foi significativamente maior do que nas membranas tratadas com o controle ($20,3 \pm 2,9$ versus $3,8 \pm 0,2$, respectivamente, $p < 0,0001$). Este efeito foi associado à deposição de ácido hialurônico, observada nas membranas tratadas, mas não nas membranas controle. Outro estudo⁵⁶⁻⁶⁰ envolvendo a mesma metodologia para avaliação da angiogênese testou o extrato etanólico (a 1%), as frações hexânicas (1%) e diclorometano(1%), do extrato etanólico. Tanto o extrato etanólico quanto suas frações foram eficazes em aumentar o número de vasos da membrana corioalantóica em relação ao tratamento controle. Além disso, o extrato etanólico (1%) também foi capaz de reduzir o tempo de cicatrização de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos, com menor deposição de fibrina e menor hiperemia no grupo tratado, em relação ao controle, efeito este confirmado em estudo anterior também em ratos.⁶¹ Em outro estudo, o extrato aquoso de *C. officinalis*⁶² não foi capaz de promover uma cicatrização melhor do que o grupo controle não tratado em modelo de cicatrização de feridas em ratos Wistar. O efeito cicatrizante do extrato etanólico das flores de *C. officinalis* foi testado também em queimaduras térmicas induzidas em ratos.⁶³ Os animais tratados com o extrato (20, 100 ou 200 mg/kg) mostraram uma melhoria significativa na cura quando comparado com os animais controle, não tratados. Os indicadores de cicatrização da ferida, tais como a hidroxiprolina associada ao colágeno, e conteúdo de hexosamina aumentaram significativamente no grupo tratado, indicando a cicatrização acelerada em animais tratados. As proteínas de fase aguda haptoglobina e orosomucoide, que foram aumentadas devido à lesão por queimadura, tiveram sua concentração significativamente diminuída em animais tratados com o extrato na dose de 200 mg/kg de peso corporal. O mecanismo de defesa antioxidante, que foi diminuído no fígado durante o ferimento de queimadura, foi melhorado nos animais tratados. A peroxidação lipídica foi significativamente reduzida no grupo tratado, quando comparada com animais controle. Marcadores de danos teciduais como as enzimas fosfatase alcalina, alanina e aspartato transaminases foram significativamente reduzidos nos grupos tratados de um modo dependente da dose. Em um modelo animal semelhante,⁶⁴ utilizando ratos, o efeito cicatrizante de

um gel à base de extrato etanólico das flores de *C. officinalis* (5%, 7% ou 10%) foi avaliado em um experimento envolvendo 65 ratos machos adultos divididos aleatoriamente em três grupos (controle, placebo e grupo de tratamento). Sob condições estéreis, um retalho, de 2 × 2 cm, de pele da região cervical foi retirado em cada animal. O grupo tratado recebeu uma aplicação tópica diária de 5%, 7% e 10% de gel de *C. officinalis*. O grupo placebo recebeu uma aplicação tópica diária da base do gel, e o grupo controle não recebeu nenhum tratamento durante o estudo. Quatorze, 21, e 45 dias após a cirurgia os ratos foram sacrificados, biópsias foram retiradas do local das incisões iniciais e foram coletadas amostras para investigação bioquímica. Como resultado, o grupo tratado com o gel a 7% e 10% tiveram, no 21º dia após a incisão inicial, conteúdo de colágeno e hidroxiprolina, maiores do que o grupo controle. Uma combinação de extratos hidroalcoólicos de *Plantago major* e *C. officinalis* foram incorporados⁶⁵ em microcápsulas biodegradáveis de carbonato de cálcio com quitosana e carragenana. Estas microcápsulas foram capazes de acelerar a cicatrização de úlceras gástricas induzidas por ácido acético em ratos, em comparação com o grupo controle, tratado com microcápsulas sem extratos incorporados, entretanto os autores não fornecem nenhuma informação sobre o tipo do extrato, dose ou padronização. O extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* incorporado em uma base gel (a 5% ou 10%) foi testado também em modelo de mucosite da cavidade oral em hamsters induzida pelo tratamento com uma dose de 60 mg/kg de 5-fluorouracil,⁶⁶ administrado por via intraperitoneal. Os grupos tratados com o gel (5% e 10%) administrado diariamente após o 12º dia topicamente, foram capazes de reduzir os escores da mucosite comparados ao grupo controle. Estes escores estavam associados a uma completa epiteliação e a presença de tecido conectivo normal no grupo tratado com gel a 10%, embora cicatrização com a presença de infiltrado de células inflamatórias e ingurgitação vascular tenha sido observada no grupo tratado com o gel a 5%. Já no grupo controle, hemorragia extensa e ulceração foram observadas. Em um estudo⁶⁷ envolvendo coelhos machos (raça Nova Zelândia), um creme à base de tintura de *C. officinalis* a 5% administrado por via tópica diariamente, foi capaz de aumentar o número de fibroblastos nas feridas cirúrgicas induzidas na região cervical dorsal dos animais em relação ao grupo controle. Uma pomada à base de *C. officinalis* foi testada em um estudo envolvendo coelhos da raça Nova Zelândia, mas não demonstrou diferença quanto ao tempo de cicatrização das feridas cirúrgicas em relação ao grupo tratado com óleo de girassol ou o controle, tratado com soro fisiológico.⁶⁸ Uma pomada em base de vaselina formulada com extrato etanólico de *C. officinalis*⁶⁹ também foi capaz de acelerar o processo de cicatrização em feridas cirúrgicas de cães, segundo avaliação macroscópica e histopatológica das lesões. Entretanto, nenhum detalhe sobre a formulação ou a preparação do extrato foi descrito.

4.3.2.2 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória relatada para os extratos das flores de *Calendula officinalis* está relacionada à sua ação cicatrizante, já que em muitos casos o processo inflamatório normal que acompanha a cicatrização e que leva à formação do tecido de granulação pode estar exacerbado. Muitos estudos relatam a atividade anti-inflamatória de extratos de *C. officinalis* em diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Em um estudo que avaliou o efeito de um extrato de Calêndula a 2-3% nenhum detalhe sobre o tipo de extrato foi fornecido em relação à atividade de metaloproteinase da matriz (MM2), uma importante classe de enzimas no processo de remodelagem tecidual e cuja inibição está associada ao tratamento de gengivites foi observada que o extrato de Calêndula foi capaz de inibir completamente a atividade da enzima, conforme ensaio de zimografia em gel.⁷⁰ Além disso, o extrato inibiu a degradação de colágeno induzida por fibroblastos gengivais em uma proporção maior do que a quercetina, um dos constituintes do extrato, demonstrando que deve haver outras substâncias, no extrato, responsáveis por esta inibição. O efeito anti-inflamatório de extrato etanólico das flores de *C. officinalis* (preparado a partir de 750 g de material vegetal para 1 litro de etanol) também foi avaliado em modelo de edema de pata induzido por carragenana, dextrana ou formalina em camundongos BALB/C.⁷¹ O extrato de *Calendula officinalis* foi capaz de inibir em 50,6% e 65,9% o edema de pata induzido por carragenana nas doses de 250 e 500 mg/kg, respectivamente, por via oral, quando comparado aos animais controle. O grau de inibição quando o agente flogístico foi a dextrana foi de 41,9 e 42,4% para as doses de 250 e 500 mg/kg, respectivamente. Já no modelo de inflamação crônica induzida por formalina, a inibição foi de 32,9% e 62,3% para as mesmas doses anteriormente especificadas. Além disso, o extrato inibiu também a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e proteína C reativa. Em um estudo⁷² com o mesmo modelo de inflamação aplicado a uma formulação granulada à base de extratos etanólicos de *Calendula officinalis* e *Matricaria recutita* (especificações da preparação não informadas) administrado nas doses de 100 e 250 mg/kg por via oral, observou-se inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina e dextrana em ratos ($p < 0,05$). Em um estudo que avaliou o efeito combinado da terapia com ultrassom e aplicação tópica de gel à base de *Calendula officinalis* em lesões musculares feitas cirurgicamente em ratos, foi relatado um efeito benéfico na cicatrização e inflamação quando da aplicação combinada do gel e a terapia com ultrassom quando comparado apenas ao ultrassom isoladamente. Entretanto, neste estudo não foi citada a concentração ou outros detalhes da composição do gel utilizado.⁷³ O efeito anti-inflamatório da

espécie tem sido atribuído à presença de ésteres de álcoois triterpênicos, como o palmitato e miristato de faradiol e a glicosídeos triterpênicos. Outro estudo envolvendo a ação de ésteres de faradiol em modelo de inflamação induzido por ésteres de forbol em orelha de camundongos por Zitterl-Eglseer *et al.*,⁷⁴ os percentuais de inibição do edema encontrados foram de 55%, 46%, 45%, 49% e 73% para a mistura de monoésteres de faradiol, 3-miristato de faradiol, 3-palmitato de faradiol, ψ -taraxasterol e faradiol, respectivamente. A atividade de vários glicosídeos triterpênicos isolados de *C. officinalis* sobre a inflamação induzida por acetato de tetradecanoil forbol (TPA) em orelha de camundongos também foi estudada.⁷⁵ Nove glicosídeos triterpênicos foram capazes de inibir a inflamação induzida por TPA em orelha de camundongo com valores de inibição médios (DI_{50}) variando entre 0,05 a 0,2 mg/orelha. As substâncias testadas incluíram: calendulaglicosídeo A, éster 6'-O-metílico do calendulaglicosídeo A, éster 6'-O-n-butílico do calendulaglicosídeo A, calendulaglicosídeo B, éster 6'-O-n-butílico do calendulaglicosídeo B, calendulaglicosídeo C, éster 6'-O-metílico do calendulaglicosídeo C, éster 6'-O-n-butílico do calendulaglicosídeo C, éster 6'-O-n-butílico do calendulosídeo F. Todos os glicosídeos testados, à exceção do calendulaglicosídeo A foram ativos no modelo animal utilizado.

4.3.2.3 Atividade imunomoduladora

Um estudo⁷⁶ utilizando linfócitos de doadores humanos sadios e com imunodeficiência celular por transformação linfoblástica não observou qualquer efeito do extrato (solvente não especificado) de *C. officinalis*. O efeito de dois extratos de *Calendula officinalis* preparados a partir da planta inteira e das flores foi comparado ao de lectina isolada de *Solanum tuberosum* quanto à sua capacidade de aumentar a proliferação de células progenitoras endoteliais.⁷⁷ Tanto a lectina (em concentrações de 50 ng/mL a 5 μ g/mL) quanto os extratos aquosos de *Calendula* (em concentrações de 50 ng/mL a 1 μ g/mL) foram capazes de estimular a proliferação de células endoteliais e aumentar a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), sendo que o extrato de *Calendula* preparado a partir das flores foi mais eficaz. Já no estudo avaliando a atividade imunomoduladora de 31 espécies de plantas medicinais,⁷⁸ a *C. officinalis* foi uma das espécies que exibiu maior efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, mas o estudo não especifica o tipo de extrato utilizado e nem mesmo a dose. Em um estudo que avaliou várias espécies frente à suas capacidades antioxidante em ensaio de estabilidade oxidativa do óleo de girassol e de colza,⁷⁹ o extrato de *C. officinalis* foi o mais eficaz nas concentrações de 10 e 30 mg/kg (peso de extrato por peso óleo) para os óleos de girassol e colza, respectivamente.

4.3.2.4 Atividade antimicrobiana

Uma das atividades farmacológicas mais estudadas e com resultados mais contraditórios do ponto de vista pré-clínico para extratos de *C. officinalis* tem sido a antimicrobiana. A comparação entre os estudos de atividade antimicrobiana é dificultada pela variabilidade no método de execução dos estudos e pela descrição muitas vezes incompleta da metodologia nos artigos. Apesar desta heterogeneidade dos resultados, os estudos demonstram, em sua maioria, atividade antimicrobiana do extrato das flores de *C. officinalis* e de substâncias deste isoladas. A atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos etanólico e metanólico de flores de *C. officinalis* (15 µL dos extratos a 300 mg/mL no disco de difusão) foi avaliada tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas de isolados hospitalares utilizando o método de difusão por disco em ágar.⁸⁰ O halo de inibição promovido contra as bactérias Gram-positivas e negativas foi similar, sendo o extrato metanólico ligeiramente superior ao extrato etanólico. Já frente a fungos do gênero *Candida* e *Aspergillus*, os dois extratos mostraram atividade antifúngica comparável e semelhante àquela promovida pelo fluconazol (10 mm para o extrato metanólico, 9 mm para o etanólico e 7 mm para o fluconazol). Este resultado está em desacordo com aquele obtido por Herman *et al.*⁸¹ que avaliou o efeito antimicrobiano de extrato hidroglicólico de *C. officinalis* (concentração não especificada) e de óleos essenciais sobre os seguintes micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans*. O objetivo do estudo foi comparar o efeito de extratos vegetais e óleos essenciais com o efeito antimicrobiano do metilparabeno, a fim de avaliar se este poderia ser substituído em preparações cosméticas. O extrato de *Calendula officinalis* não teve ação sobre *Candida albicans*. Ação antifúngica contra *Candida* também apenas discreta de extrato glicólico (40%) de *Calendula*; foi observado em estudo em que apenas 10% das cepas foram sensíveis.⁸² O efeito antifúngico do extrato hidroglicólico de *C. officinalis* extraído com uma parte de material vegetal e 5 de líquido extrator e aplicado a 20% sobre os discos de difusão, em ensaio com *Candida* sp (isolado hospitalar) foi entretanto confirmado em outro estudo,⁸³ embora os diâmetros dos discos de difusão tenham sido pequenos (média de 3,3 mm). Em um estudo realizado para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *C. officinalis* sobre bactérias enteropatogênicas,⁸⁴ o extrato foi preparado com 90% de etanol, com uma razão de extração de 1:2, e resíduo seco de 500 mg/mL. Neste estudo, o extrato diluído a 1:25 (v/v) provocou 100% de inibição sobre *Campylobacter jejuni*, um micro-organismo implicado como a segunda causa mais frequente de diarreia do viajante e uma das causas mais comuns de diarreia em países desenvolvidos. Efeito antimicrobiano sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*, foi

observado em estudo,^{85,86} que avaliou o efeito antimicrobiano dos extratos éter de petróleo, diclorometano e metanólico (20 µL aplicados no disco de difusão, correspondendo a 0,2 mg de extrato). Dos três tipos de extratos avaliados, apenas o extrato diclorometano demonstrou alguma atividade sobre *Staphylococcus*, com halo de inibição de cerca de 9 mm, enquanto que para *P. acnes* os extratos de éter de petróleo e metanólico demonstraram alguma atividade (9,1 e 12,4 mm, respectivamente), com o extrato diclorometano demonstrando ser inativo contra este micro-organismo. A concentração inibitória mínima do extrato etanólico (CEE) das flores de *C. officinalis* e de suas frações hexânica (FHC) e diclorometano (FDC) frente a algumas bactérias foi determinada.^{56,58} As menores concentrações capazes de inibir o crescimento microbiano foram: CEE, CIM de 0,39 mg/mL frente a *S. aureus* e *Bacillus stearothermophilus*; FDC, CIM de 4,37 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* 6532 e *S. aureus* 13048, CIM de 1,08 mg/mL frente a *B. stearothermophilus* e *B. cereus*, CIM de 0,5 mg/mL frente a *M. roseus*; FHC, MIC de 0,19 mg/mL frente a *S. aureus* 13048. Além de extratos preparados a partir das flores de *Calendula*, o óleo essencial também já foi testado quanto à sua atividade antibacteriana.⁸⁷ O óleo essencial (nas concentrações de 30 e 3 µL por poço) promoveu um halo de inibição de 21,3 e 0,6 mm, respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*. Em outro estudo avaliando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. officinalis*,⁸⁸ discos impregnados com 15 µL do óleo essencial foram capazes de promover halos de inibição (11 a 30 mm) contra todos os 23 micro-organismos testados. Os principais constituintes do óleo essencial encontrados foram: hidrocarbonetos sesquiterpênicos (68.0%) e sesquiterpenols (27.0%). Δ-cadineno (22.53%), α-cadinol (20.40%) e epi-α-muurolol (12.87%). O óleo essencial das flores de *Calendula* foi testado também⁸⁹ quanto à sua atividade antifúngica, tendo inibido completamente o crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* and *Fusarium moniliforme* em uma concentração de 3.000 ppm. Algumas substâncias isoladas de *C. officinalis* também já foram avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana. Em um estudo de Szakiel *et al.*,⁴⁶ o ácido oleanólico, seus glicosídeos e glicuronídeo foram avaliados. O ácido oleanólico apresentou uma concentração inibitória mínima de 35 µg/mL para *Escherischia coli*, 60 µg/mL para *Yersinia enterocolitica*, 100 µg/mL para *Klebsiella pneumoniae*, 125 µg/mL para *Klebsiella oxytoca*, 50 µg/mL para *Shigella flexneri*, 55 µg/mL para *Shigella sonnei*, 35 µg/mL para *Bacillus megaterium*, 15 µg/mL para *Listeria monocytogenes*, e 10 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*. O extrato etanólico de flores de *C. officinalis* também foi testado frente a patógenos relevantes para contaminação em alimentos.⁹⁰ Os micro-organismos testados incluíram: *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection) ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e isolados

clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. O extrato etanólico foi preparado com 25 g de material vegetal para 400 mL de líquido extrator (etanol 70% ou 95%). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar (com 100 µL dos extratos a 10% p/v nos orifícios de difusão). O extrato etanólico não foi ativo frente aos seguintes micro-organismos: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes* ATCC 19111 e *C. albicans*, mas demonstrou uma inibição pequena contra *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (com halos de inibição pequenos em torno de 0,73 a 5,35 mm). O extrato hidroalcoólico de *C. officinalis* a 10% também foi testado contra bactérias (*Staphylococcus* sp.) do leite bovino obtido de animais com mastite.⁹¹ O halo de inibição obtido para o extrato de *Calêndula* foi de 14,93 mm. Também foram testados os efeitos de sinergia do tratamento com *Calendula* e diversos antibióticos-padrão, mas o efeito antimicrobiano dos antibióticos não foi potencializado pelo extrato. O efeito do extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* (nenhum detalhe sobre o extrato foi fornecido) sobre micro-organismos relevantes para doença periodontal foi avaliado.⁹² A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método da microdiluição como sendo 62,5 mg/mL frente a *Porphyromonas gingivalis* e 250 mg/mL frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Croton lechleri*. Em outro estudo,⁹³ o extrato metanólico de *C. officinalis* exibiu uma CIM de 512 µg/mL frente a *Porphyromonas asaccharolityca*, tendo também demonstrado menor atividade frente a outras 17 bactérias anaeróbias ou aeróbias facultativas periodontais. Extratos de *Calendula officinalis* também demonstraram atividade contra micro-organismos responsáveis pelo mau hálito.⁹⁴

O extrato metanólico de *C. officinalis* foi testado quanto à sua capacidade de reduzir a infectividade de cercarias de *Schistosoma mansoni*, quando administrado às cercarias tanto em período prévio à infecção quanto quando a exposição das cercarias ao extrato foi realizada durante a infecção em camundongos albinos.⁹⁵ A exposição das cercarias por 30 minutos a concentrações de 25 ppm do extrato durante a fase de infecção reduziu consideravelmente a carga parasitária/camundongo em 83% e o número de ovos/g tecido no fígado e intestino em 77,2% e 83,5%, respectivamente, em comparação com aqueles infectados no grupo controle. Além disso, camundongos infectados pelas cercarias expostas a 50 ou 75 ppm durante a infecção não desenvolveram vermes adultos. Outro estudo⁹⁶ envolvendo o ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* avaliou o efeito de uma preparação à base de saponinas parcialmente hidrolisadas (resultando em glicosídeos do ácido oleoico) sobre caramujos, que são o hospedeiro intermediário deste parasita. Foi visto que uma concentração de 10,25 mg/mL da saponina parcialmente hidrolisada foi letal a 100% dos caramujos, embora apenas

uma concentração de 50 mg/mL da saponina não hidrolisada tenha produzido o mesmo efeito.

Uma tintura comercial de *C. officinalis* (nas concentrações de 5 e 10 mg/mL) foi testada em relação à sua atividade viral contra vírus da hepatite B, mas não demonstrou nenhuma atividade antiviral. A atividade antiviral contra HIV-1 de extratos aquoso e orgânico (solvente não especificado) foi avaliada em outro estudo.⁹⁷ O extrato orgânico conferiu um efeito citoprotetor com uma $CE_{50}=400 \mu\text{g/mL}$. O extrato também inibiu a formação de células sinciciais quando presente em concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, além de ter inibido a atividade da transcriptase reversa viral com uma $CI_{50}=51 \mu\text{g/mL}$.

4.3.2.5 Atividade antioxidante

O extrato etanólico de *C. officinalis* (preparado com 700 g de material vegetal para um volume de 1 L de extrato, fornecendo um resíduo seco de 1,1 g/100 mL) foi avaliado quanto à sua atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*.¹⁴ O extrato foi capaz de inibir a produção de radicais superóxido, radicais hidroxila e a peroxidação lipídica com valores de $CI_{50}=500, 480$ e 2.000 mg/mL , respectivamente. O extrato também inibiu a produção de radicais ABTS, DPPH e NO. A administração oral do extrato em camundongos por 1 mês (em doses de 50-250 mg/kg) aumentou a atividade da catalase, níveis sanguíneos e hepáticos de glutathiona e diminuiu a atividade da glutathiona peroxidase. O extrato hidroalcoólico de *C. officinalis* (1:9, p/p) foi também avaliado frente à sua ação antioxidante e de diversos radicais.⁹⁸ Os valores de CI_{50} foram de $97,1 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$, $350,0 \pm 13,1 \mu\text{g/mL}$ e $4,4 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ para os testes com radical DPPH, ensaio de peroxidação lipídica e o ensaio xantina/luminol/XOD, respectivamente. Além disso, em doses baixas (150 e 300 mg/kg) o extrato foi capaz de manter os níveis de glutathiona em camundongos expostos à radiação ultravioleta em valores próximos ao grupo controle não irradiado, embora em doses maiores (600 mg/kg), este efeito de proteção não foi observado. O mesmo grupo de pesquisa demonstrou efeito protetor sobre a irradiação ultravioleta com diversas formulações à base do mesmo extrato.⁹⁹ A fração butanólica de um extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* foi avaliada frente à sua ação antioxidante *in vitro*.¹⁰⁰ A fração inibiu a produção de radicais superóxido e hidroxila ($CI_{50}=1,0 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$ e $0,5 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$, respectivamente). A peroxidação lipídica em microsossomos hepáticos induzida por Fe+2/ascorbato foi inibida 100% por 0,5 mg/mL da fração ($CI_{50}=0,15 \text{ mg/mL}$). Seu potencial antioxidante reativo total (Trap), expresso em mM de equivalentes de Trolox, foi de $249,19 \pm 14,5 \text{ mM}$. A formulação de cremes à base de um extrato comercial de *C. officinalis* também foi avaliada quanto à sua capacidade antioxidante.¹⁰¹ A concentração ideal de extrato de *C. officinalis* no creme que promoveu um efeito antioxidante significativo foi de

0,9%. Esse creme possuía uma concentração de carotenoides totais (mg/100 g), polifenóis totais (em equivalentes de ácido gálico, GAE, mg/100 mL), flavonoides e flavonas totais (em equivalentes de quercetina, EQ, mg/100 mL) e atividade sequestradora de radicais DPPH (expressa em equivalentes de quercetina, EQ, $\mu\text{Mol}/100\text{ mL}$) de: 0,73 mg/100 g, 92 mg GAE/100 mL, 4,2 mg/100 mL, e 163 $\mu\text{Mol EQ}/100\text{ mL}$. Em uma comparação entre a capacidade antioxidante das espécies *Calendula arvensis* e *C. officinalis* frente ao radical DPPH e capacidade redutora férrica do plasma (Frap), o extrato hexânico das flores de *C. officinalis* demonstrou atividade maior que o de *C. arvensis*.¹⁰² Efeito semelhante foi confirmado em outro estudo comparativo entre as duas espécies,¹² que demonstrou que os extratos aquoso e metanólico de *C. officinalis* possuem maior atividade antioxidante que aqueles de *C. arvensis*. O extrato metanólico de *C. officinalis* (detalhes da extração não especificados) e de outras espécies foi avaliado quanto à sua capacidade de inibir a produção e radicais DPPH e também frente ao ensaio de capacidade redutora férrica (Frap), tendo demonstrado um efeito antioxidante com uma $\text{CI}_{50} = 111,96 \pm 1,13\ \mu\text{g}/\text{mL}$ no ensaio de DPPH e $460,09 \pm 1,94\ \text{mg}/\text{g}$ de equivalentes de Trolox no ensaio de Frap.⁸⁶

4.3.2.6 Atividade antitumoral

A atividade antitumoral e o mecanismo de ação de um extrato aquoso de *C. officinalis*, obtido por um novo processo de extração assistida por *laser*, foram determinados. Várias linhagens de células tumorais murinas e humanas foram utilizadas no estudo.¹⁰³ A inibição do crescimento celular variou entre 70-100% e os mecanismos foram identificados como envolvendo a interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 e apoptose induzida por Caspase-3. O mesmo extrato foi capaz de ter efeito proliferativo sobre células sanguíneas (linfócitos periféricos) e células NKL (células leucêmicas). O tratamento via intraperitoneal ou oral com o extrato foi capaz de inibir o crescimento tumoral *in vivo* e prolongar a sobrevivência de camundongos. Uma atividade citotóxica significativa frente a uma linhagem de células leucêmicas foi obtida para um extrato hidrometanólico de *C. officinalis*.¹⁰⁴ Frente à linhagem J-45.01 de leucemia humana aguda, o extrato apresentou uma $\text{CI}_{50} = 0,23\ \text{mg}/\text{mL}$. Os chás de *Calendula officinalis* (2 g/100 mL) e *Matricaria recutita* (5 g/100 mL) foram comparados quanto aos seus efeitos citotóxicos e quanto à composição química a atividade antioxidante.¹⁰⁵ Apesar da composição química e a atividade antioxidante dos dois chás terem sido semelhantes, a atividade citotóxica do chá de calêndula foi mais pronunciada do que o chá de camomila ($\text{CI}_{50} = 0,36\ \text{mg}/\text{mL}$ versus $>16,67\ \text{mg}/\text{mL}$, respectivamente) e seletiva frente a uma linhagem tumoral de melanoma (Fem-x). Um decocto de *C. officinalis* (rendimento = 32,7%) foi avaliado frente a diversas linhagens de células tumorais hepáticas, produzindo

uma inibição média da proliferação destas células de 12,9% a uma concentração de 2 mg/mL. Em outro estudo,¹⁰⁶ o extrato etanólico das flores de *C. officinalis* (preparado com 700 g de material vegetal para um volume de 1 L de extrato, fornecendo um resíduo seco de 1,1 g/100 mL) foi avaliado quanto à sua capacidade de reduzir metástases de um melanoma como tumor primário. A administração simultânea por gavagem do extrato (250 mg/kg por dez dias) a camundongos inoculados com células tumorais (C57BL/6) através da veia caudal resultou em uma redução dos nódulos pulmonares em 74% com aumento da sobrevivência em 43,3%. Também pôde ser observada uma redução nos níveis de hidroxiprolina, ácido urônico, ácido siálico sérico e γ -glutamiltanspeptidase. O extrato também inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, MMP-2, MMP-9, prolil hidroxilase e lisil hidroxilase e ativou TIMP-1 e TIMP-2. O extrato hidroalcoólico de *C. officinalis* (1:9, p/p) foi também avaliado frente à sua ação citotóxica em células HepG2 e fibroblastos murinos L929.¹⁰⁷ O extrato foi capaz de estimular a proliferação dos fibroblastos em baixas concentrações (11-15 mg/mL). Entretanto, concentrações maiores foram capazes de inibir a proliferação celular (21,6% de redução a 37,5 mg/mL). Já frente às células HepG2 nenhum efeito proliferativo foi observado para o extrato, e o tratamento com 30,0 e 37,5 mg/mL reduziu a viabilidade destas células em aproximadamente 84% e 93%, respectivamente. Em estudo¹⁰⁸ que avaliou o efeito de três extratos diferentes de *C. officinalis* (acetato de etila, heptano e metanólico) sobre diferentes linhagens celulares, incluindo células de fibroblastos humanos e uma linhagem de câncer de mama humano (T47D), ECACC número 85102201, verificou-se que o extrato acetato, mas não o heptano e metanólico, estimula a proliferação celular em concentrações acima de 25 μ g/mL, contudo concentrações a partir de 75 μ g/mL são tóxicas para as células. A análise do extrato revelou a presença dos seguintes compostos: ácido oleanólico, β -amirina, acetato de β -amirina, rutina, narcissina, 3-glicosídeo de isoramnetina, quercetina, isoquercitrina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico e ácido siríngico.

4.3.2.7 Outras atividades relatadas

Algumas outras atividades farmacológicas não incluídas nas seções anteriores e pouco relacionadas ao uso terapêutico da espécie foram avaliadas em testes pré-clínicos envolvendo extratos de *C. officinalis*, e incluem: antifertilidade,¹⁰⁹ neuroprotetora,¹¹⁰ nematocida,¹¹¹ anticolinesterásica,¹⁰² hepatoprotetora,^{102,112} gastroprotetora,¹¹³⁻¹¹⁵ antidiabética e antilipidêmica,^{116,117} analgésica,^{118,119} depressora sobre o sistema nervoso central,¹²⁰ fotoprotetora,¹²¹ hipoglicemiante,¹²² antidiarreica,¹²³ quimioprotetora,¹²⁴ antiofídica,¹²⁵ cardioprotetora,¹²⁶ inibidora da contratilidade cardíaca,¹²⁷ espasmolítica¹²⁸ e bioadesiva.¹²⁹

■ 4.4 ENSAIOS CLÍNICOS

Foram encontrados na literatura ensaios clínicos de fase I, II e III envolvendo indicações diversas de extratos de *C. officinalis*. Na descrição destes estudos, sempre que possível foi dada atenção particular à metodologia e ao desenho do estudo, já que durante a revisão da literatura um número grande de estudos foi identificado com falhas metodológicas severas como, por exemplo, número insuficiente de voluntários, método de aleatorização não descrito e estudo não cego.

4.4.1 Fase I

O único estudo clínico de Fase I encontrado na literatura pesquisada avaliou a segurança de enxaguatório bucal contendo 1% de extrato das flores de *C. officinalis* em associação com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (0,67%), óleo de Manuka (*Leptospermum scoparium*) (0,33%) e 0,5% de extrato seco de chá verde (*Camellia sinensis*). O enxaguatório foi testado quanto à sua segurança e eficácia preliminar para reduzir a placa bacteriana. Oito voluntários (cinco mulheres e três homens) completaram o estudo de fase I, utilizando o enxaguatório duas vezes ao dia (15 mL a cada enxague com um tempo de contato de 30 segundos), diariamente. Uma mulher relatou sinais de alergia, semelhantes à febre do feno, e interrompeu o estudo após dois dias. Os demais voluntários concluíram o estudo sem nenhuma intercorrência.¹³⁰ Não houve diferença significativa entre a preparação e o enxaguatório placebo com relação ao índice gengival, índice de placa bacteriana ou abundância relativa das espécies bacterianas.

4.4.2 Fase II

A fim de avaliar o efeito de um creme à base de uma associação de extratos de *C. officinalis* e alecrim a 5% no tratamento de dermatites de contato, um estudo de fase I aberto foi realizado¹³¹ utilizando-se como comparador um creme de hidrocortisona a 0,25%. Vinte voluntários saudáveis submeteram-se a indução de dermatite de contato e foram avaliados quanto à resposta a diferentes formulações da associação. Cinquenta microlitros das formulações foram aplicadas na área teste por cinco dias consecutivos após a indução da dermatite. O estudo descreve que a alocação dos voluntários foi aleatorizada. Os desfechos medidos foram: a perda de água transdérmica, o tamanho do eritema e a redução da irritação. Algumas das preparações testadas forneceram proteção contra a dermatite de contato induzida.

No mesmo sentido, um creme contendo 1,5% de extrato de flores de *C. officinalis* foi avaliado em um estudo aberto, randomizado, controlado com um creme à base de *Aloe vera* para o tratamento de dermatite induzida por fralda em crianças.¹³² Sessenta e seis crianças foram alocadas aleatoriamente (método não descrito) no grupo controle (32, creme de *Aloe vera*) ou tratamento (34, creme com *C. officinalis*). As crianças foram tratadas por três vezes ao dia, durante dez dias, e a severidade da dermatite foi avaliada em uma escala de cinco pontos no início do estudo e aos dias cinco e dez após início do tratamento. A severidade da dermatite foi reduzida em ambos os grupos ao fim do tratamento, mas de forma mais pronunciada no grupo tratado com *C. officinalis* ($p=0,001$). Não houve relato de nenhuma reação adversa aos tratamentos.

Alguns estudos clínicos foram realizados no sentido de avaliar o efeito de *C. officinalis* em patologias da cavidade oral.^{130,133-135} Um ensaio clínico de fase I e um ensaio piloto de fase II envolvendo enxaguatório bucal, que consistiu de uma associação de óleos essenciais e extratos de quatro espécies (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium*, *C. officinalis* e *Camellia sinensis*), foram realizados a fim de avaliar a segurança e a eficácia no tratamento da gengivite e da placa bacteriana.¹³⁶ Esse estudo consistiu de um ensaio clínico randomizado (embora o método de randomização tenha sido por meio de uma moeda, um método considerado inadequado) aberto, controlado por placebo envolvendo 15 voluntários na fase I e 17 na fase II. Dois voluntários reportaram efeitos adversos leves e um voluntário deixou o estudo. A preparação teste não foi significativamente diferente do placebo quanto aos desfechos mensurados, que incluíram: índice gengival, índice de placa bacteriana ou abundância relativa das espécies bacterianas testadas. Nenhum efeito adverso da preparação teste foi observado quanto a lesões anormais na cavidade oral, sinais vitais, mudanças na função hepática ou renal e na função da medula óssea. Outra aplicação na área Odontológica envolveu a avaliação de um dentífrico à base de extrato etanólico das flores de *C. officinalis* em pacientes portadores de gengivite.¹³⁵ O estudo, envolvendo 40 pacientes (21 mulheres e 19 homens) com diagnóstico de gengivite, foi um ensaio clínico duplo-cego, randomizado (protocolo de randomização não descrito), controlado por placebo (20 pacientes em cada grupo). Os pacientes foram orientados a escovar os dentes três vezes ao dia com o dentífrico contendo 2% do extrato etanólico de flores de Calêndula (grupo teste) ou dentífrico base, sem extrato (grupo controle), por quatro semanas de tratamento. A avaliação dos voluntários ocorreu no início e nas segunda, terceira e quarta semanas após o início do tratamento, e envolveu a medida do índice de placa bacteriana, índice gengival e sangramento à sondagem. O índice de placa foi reduzido em 33,4% ao 28º dia

em comparação com uma redução de 9,8% no grupo controle. O índice gengival sofreu uma redução de 46,3% no grupo tratado em comparação com 18,4% no grupo controle, e o sangramento à sondagem foi reduzido em 50,8% no grupo tratado em comparação com 21,8% no grupo controle.

A ação antimicrobiana de *C. officinalis* em suturas de cirurgia dental também foi avaliada. Um enxaguatório bucal à base de *C. officinalis* foi avaliado quanto à sua capacidade de reduzir a carga bacteriana de suturas em cirurgias para extração do terceiro molar.¹³³ O estudo foi aberto, randomizado, cruzado (o terceiro molar contralateral foi removido e permaneceu sem uso de enxaguatório bucal) e envolveu 18 pacientes alocados aleatoriamente (método de aleatorização não descrito) para tratamento com enxaguatório de *C. officinalis* (1% da tintura), *Camellia sinensis* (25% de extrato fluido hidroalcoólico 1:1) ou solução oral de 0,12% de gluconato de clorexidina. Não houve diferença significativa entre a carga bacteriana nas suturas do grupo controle e do grupo tratado com enxaguatório bucal à base de *C. officinalis*. No mesmo sentido, uma pomada à base de um óleo derivado da espécie (detalhes não informados) e iodofórmio aplicado em suturas de cirurgia dental foi avaliada quanto à sua ação antimicrobiana.¹³⁴ O estudo envolveu 40 voluntários (20 no grupo controle e 20 no grupo teste) e consistiu de um ensaio clínico cego, randomizado (protocolo de randomização não descrito) e controlado. Não houve perdas de seguimento ou efeitos adversos. O estudo consistiu da aplicação da pomada às suturas dos pacientes no grupo teste e sutura sem pomada no grupo controle. Nos dias 1, 3, 5, 7 e 15 pós-cirurgia um profissional de saúde que não tinha conhecimento de que grupo pertencia o paciente removeu um fragmento de 2 mm da sutura que foi submetida à cultura microbiológica para contagem do número de unidades formadoras de colônia. Houve uma redução estatisticamente significativa ($p=0,002$) no número de unidades formadoras de colônia nas culturas obtidas a partir de suturas do grupo tratado, em comparação com o grupo controle.

Para o tratamento de vaginite há relato na literatura de um estudo aberto, não randomizado e não controlado, avaliando a efetividade de uma solução aquosa (1,5%) à base de tintura de *C. officinalis* (a 20%).¹³⁷ Quarenta e seis mulheres foram selecionadas de um universo de 127 para participação no estudo. A tintura de *Calendula* foi aplicada três vezes por semana, em dias alternados, durante duas semanas, e a avaliação das mulheres foi realizada no início do estudo, no dia 21 e dia 30 após o início do tratamento. Como desfechos foram avaliados o grau de leucorreia através de uma escala analógica visual de 0 a 10, evolução clínica, persistência de prurido e exame microbiológico para pesquisa de *Candida albicans*. Aos 30 dias após início do tratamento, 86,1% das pacientes foram avaliadas e não

apresentaram leucorreia; 97,6% sem prurido; e 90,5% das mulheres tiveram exsudato vaginal negativo para cultura microbiológica de *Candida albicans*. O uso de um gel à base de *C. officinalis* (2% de uma tintura a 10%) sozinho ou em associação ao gel de *Stryphnodendrum barbatiman* no tratamento de úlceras varicosas e lesões de pele domésticas foi avaliado.¹³⁸ O estudo aberto, não randomizado envolveu 38 voluntários em quatro grupos: dois grupos (I e II) apresentando úlcera varicosa e dois outros (III e IV) apresentando lesões domésticas. Os grupos I e III foram tratados com calêndula e os grupos II e IV foram tratados com calêndula mais barbatimão, com uma aplicação diária por um mês, sendo o grupo com a associação das duas espécies o que apresentou maior eficácia na cicatrização das lesões, seguido do grupo da calêndula.

4.4.3 Fase III

Dois ensaios clínicos de Fase III encontrados na literatura, envolvendo preparações à base de *C. officinalis*, avaliaram a utilidade destas formulações em prevenir a ocorrência de dermatite aguda associada à irradiação em pacientes com câncer de mama, e os resultados dos dois ensaios foram conflitantes. O estudo inicial, de Pommier *et al.*,¹³⁹ foi um ensaio clínico randomizado (blocos com listas de alocação aleatória foram gerados utilizando *software* apropriado), controlado, simples-cego – uma vez que as características organolépticas da calêndula não permitiram que o estudo fosse duplo-cego – em que a eficácia de uma pomada comercial de *C. officinalis* foi comparada a uma pomada a base de Trolamina na prevenção de dermatite pós-irradiação em pacientes com adenocarcinoma de mama. O estudo envolveu 254 pacientes, sendo 128 alocados ao tratamento com a pomada de trolamina e 126 alocados ao tratamento com calêndula. Os pacientes foram instruídos a aplicar a pomada na pele irradiada duas vezes ao dia ou mais, dependendo da ocorrência de dermatite e dor, iniciando no começo do tratamento radioterápico e seguindo até a sua conclusão. Cada paciente foi consultado semanalmente pelo seu radioterapeuta, que avaliou a toxicidade dérmica aguda, segundo a escala do Grupo de Oncologia e Radioterapia (RTOG) em cada um dos volumes envolvidos: mama ou parede torácica e, caso necessário, prega submamária, axilas, nódulos mamários internos e nódulos supram claviculares. A dor foi avaliada semanalmente utilizando uma escala visual analógica de 10 cm. Por uma razão não relacionada ao tratamento, ele foi interrompido em um paciente recebendo a pomada de *C. officinalis*. Quinze interrupções foram observadas no grupo recebendo a pomada de trolamina, a maioria delas devido à toxicidade dérmica (9%). Como resultado, o estudo mostrou que a incidência de toxicidade dérmica aguda de grau 2 a 3 foi de 41% (intervalo de confiança de

95%, 37 a 46) no grupo tratado com calêndula e 63% (IC 95%, 59 a 68) no grupo tratado com trolamina ($p < 0,001$). Nove pacientes (7%) que receberam calêndula e 20 pacientes (20%) que receberam trolamina apresentaram toxicidade de grau 3 ($p = 0,034$). Nenhum caso de toxicidade grau 4 foi observada.

O segundo estudo, mais recente,¹⁴⁰ não encontrou diferenças na eficácia de um creme à base de *C. officinalis* comparado a um creme aquoso sem calêndula para a prevenção de dermatite aguda associada à radioterapia em pacientes com câncer de mama. O estudo avaliou 420 pacientes e consistiu de um ensaio clínico duplo-cego, controlado, randomizado. Os 420 pacientes foram alocados aleatoriamente ao grupo tratamento (creme contendo um extrato de *C. officinalis* a 10%, 210 pacientes alocados, 203 iniciaram e 199 concluíram o estudo) ou ao grupo controle (creme hidrofílico Essex®, 210 pacientes alocados, 208 iniciaram e 206 finalizaram). O desfecho primário foi a diferença entre os grupos na proporção de pacientes com reações dérmicas agudas à radiação (ARSR) e desfechos secundários incluíram o escore em um questionário estruturado sobre a qualidade de vida (European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Quality of Life Questionnaire Core-30 (QLQ-C30)), distúrbios do sono. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os dois grupos quanto à incidência de reações dérmicas agudas. Também não foram observadas diferenças entre os dois grupos quanto à incidência de sintomas como dor, queimação, coceira e hiperestesia na área irradiada.

4.4.4 Fase IV

Não foram encontradas na literatura referências a estudos farmacológicos clínicos de fase IV.

4.4.5 Estudos observacionais

Não foram encontradas na literatura referências a estudos observacionais envolvendo a espécie.

■ 4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES PARA CADA DERIVADO DA ESPÉCIE *CALENDULA OFFICINALIS* L.

A maioria dos estudos pré-clínicos e todos os estudos clínicos encontrados para a espécie foram conduzidos com extratos etanólicos ou hidroalcoólicos dos capítulos florais de *C. officinalis* ou com formulações derivadas destes extratos. As ações mais bem fundamentadas em ensaios pré-clínicos e clínicos são a sua ação cicatrizante e anti-inflamatória para afecções da pele, e em menor grau de evidência a sua ação antioxidante e antimicrobiana.

4.5.1 Via de administração

A *C. officinalis* é empregada quase que exclusivamente para uso tópico,^{6,30} embora existam referências ao seu uso interno.³

4.5.2 Dose diária e posologia

Uso Interno:

Capítulos florais

1-4 g ou por infusão três vezes ao dia.³⁰

Extrato líquido

0.5-1.0 mL (1:1 em etanol 40%) três vezes ao dia.³⁰

Tintura

0.3-1.2 mL (1:5 em etanol 90%) três vezes ao dia.¹⁴¹

Uso Externo:

Tintura/extrato líquido (1:1) em etanol 40% ou tintura 1:5 em etanol 90%. Aplicar às feridas ou diluir 1:3 com água para compressas. Pomada a 2,5%: aplicar na área afetada, conforme indicação médica.³⁰

4.5.3 Período de utilização

A maioria dos estudos clínicos envolve o uso tópico de *C. officinalis*. Estes estudos recomendam o uso de formas farmacêuticas à base de *C. officinalis* por 2 ou 3 vezes ao dia, até melhora dos sintomas.³⁰ O período de utilização de 14 dias é

sugerido por pelo menos um estudo clínico,³⁰ e persistindo os sintomas o médico deve ser consultado.

4.5.4 Contraindicações

Calendula officinalis pode causar reações alérgicas em indivíduos sensíveis, especialmente aqueles que já tiveram histórico de hipersensibilidade a outras espécies da família *Asteraceae* (*Compositae*).³⁰ Não utilizar em crianças (abaixo de 12 anos).¹⁴²

4.5.5 Grupos de risco

Um possível efeito uterotônico de *C. officinalis*,¹⁴³ observado em coelhos e porquinhos da Índia, combinado com o seu possível efeito espermicida, aliado ao fato de que não existem estudos sobre a segurança reprodutiva em humanos, faz com que o uso de *C. officinalis* não seja recomendado em mulheres grávidas ou em período de lactação ou ainda a crianças sem supervisão médica.⁶

4.5.6 Precauções de uso

Pacientes com hipersensibilidade a espécies da família *Asteraceae*.^{6,32}

4.5.7 Efeitos adversos relatados

Sensibilização dérmica tem sido relatada.⁶). Além disso, efeito espermicida,¹⁴⁴ antifertilidade¹⁰⁹ e uterotônico¹⁴³ foram relatados. Por esta razão o uso não é recomendado em mulheres grávidas ou em período de lactação.

4.5.8 Interações medicamentosas

4.5.8.1 Interações medicamentosas descritas

Não há informações sobre interações medicamentosas associadas ao uso de *C. officinalis*.

4.5.8.2 Interações medicamentosas potenciais

Não há informações sobre interações medicamentosas associadas ao uso de *C. officinalis*.

4.5.9 Informações sobre superdosagem

Não há relatos de intoxicações por superdosagem de *C. officinalis* na literatura pesquisada. Plantas ricas em fenóis totais, como a *C. officinalis*, quando usadas em doses excessivas, podem causar irritação da mucosa gástrica e intestinal, provocando vômitos, cólicas intestinais e diarreia.

4.5.9.1 Descrição do quadro clínico

Informação não encontrada na literatura pesquisada.

4.5.9.2 Ações a serem tomadas

Em caso de superdosagem, suspender o uso e procurar orientação médica de imediato para que sejam adotadas as medidas habituais de apoio e controle das funções vitais.



5

**Informações
Gerais**

■ 5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS / FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

As outras formas farmacêuticas descritas na literatura para as quais estavam disponíveis as informações de obtenção e de padronização estão descritas no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3 – Formas farmacêuticas descritas na literatura e método de obtenção

Forma farmacêutica			
Referência	Tipo	Método de obtenção	Padronização
(145)	Pomadas	Método I: preparo por solução, com a fusão dos excipientes a 45°C, através da elevação da temperatura em chapa de aquecimento e posterior adição e homogeneização do extrato e antioxidante. Método II: preparo por suspensão, quando o extrato e o antioxidante são suspensos no excipiente através da incorporação a frio.	Teor de flavonoides totais (% p/p) para as pomadas preparadas com os extratos de <i>C. officinalis</i> .
(5)	Gel	Foi preparada uma base galênica geleificante de característica hidrofílica empregando-se como polímero o hidroxietilcelulose (Natrozol®250) comumente empregado na farmacotécnica de formas farmacêuticas semissólidas, na qual foi incorporada a tintura de <i>C. officinalis</i> L. na concentração de 10%.	Caracterização físico-química do marcador químico rutina por espectrometria na região do infravermelho (IV), termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA). Determinação de flavonoides totais expressos em rutina após permeação cutânea <i>in vitro</i> em modelo de biomembrana alternativo.

continua



continuação

Forma farmacêutica			
Referência	Tipo	Método de obtenção	Padronização
(146)	Gel- -creme e creme.	As formulações tópicas foram desenvolvidas utilizando dois agentes autoemulsionantes diferentes e um polímero. Formulação I (gel-creme): foi preparado utilizando o agente autoemulsionante SAF Hostacerin [®] e a formulação II (creme) , utilizando o disponível comercialmente cera auto emulsionante Polawax [®] , isodecil oleato e palmitato de isopropilo como emolientes e glicerol como um hidratante. Formulação III (gel) foi preparado usando o polímero não iônico de Natrosol [®] 250HHR, o ácido hialurônico como um hidratante e polioxietileno (20) sorbitano e álcool etílico como cossolvente.	O método desenvolvido foi utilizado para quantificação de rutina e narcisina nas formulações tópicas e analisadas por HPLC.
(147)	Creme	A fase oleosa foi composta de álcool estearílico, cera de abelhas, monooleato de sorbitano, ao passo que uma solução de sorbitol, polissorbato 80, metilparabeno, propilparabeno, e água deionizada constituíam a fase aquosa. Óleo de flor de calêndula 5% foi usado como agente de proteção solar ativo na formulação de creme. O creme foi armazenado à temperatura ambiente, em seguida foi pesado óleo de calêndula (5%) e incorporado na emulsão formada sob homogeneização constante. Formulação toda foi armazenada em frasco de vidro âmbar fechado.	Não descrito.

continua

conclusão

Forma farmacêutica			
Referência	Tipo	Método de obtenção	Padronização
(148)	Creme	Foram feitas cinco formulações diferentes de creme, sendo que, em uma dessa continha extrato de calêndula, e depois foi avaliada qual a melhor formulação. Partes A, B e C foram misturadas. A mistura foi agitada continuamente até a temperatura de 35°C ser alcançada. Em seguida, parte D (extrato de calêndula) foi adicionada (se o creme com extrato de calêndula foi preparado), misturada adequadamente e a mistura foi arrefecida com agitação até a temperatura ambiente. Os cremes foram armazenados à temperatura ambiente (25 ± 2°C) em recipientes de plástico hermeticamente fechado e protegido da luz.	Determinação de carotenoides e polifenóis totais, além de flavonas e flavonóis para os cremes preparados com os extratos de <i>C. officinalis</i> .
(149)	Creme	As micropartículas lipídicas sólidas (MLS) foram obtidas pela emulsificação do óleo em água (o/w) empregando a técnica de inversão de fase. A emulsão foi preparada por Siverson, emulsificando a 6200 rpm. A emulsão obtida foi resfriada à temperatura ambiente por agitação magnética até a solidificação das micropartículas ocorrer.	Quantificação de flavonoides por HPLC, através de construção de curva de calibração e regressão linear.
(150)	Pomadas	A partir dos extratos, foram manipuladas pomadas, cuja formulação teve como base uma mistura de lanolina anidra e vaselina sólida acrescida do antioxidante e do próprio extrato. Foram seguidos dois protocolos de produção: Método I: Preparo por solução. Método II: Preparo por suspensão.	A monografia de <i>C. officinalis</i> , na 4a edição da <i>Farmacopeia Brasileira</i> (2001), descreve a técnica espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides totais (estimados como hiperosídeos), tendo como amostras as drogas vegetais derivadas dessa espécie.

Fonte: Autoria própria.

■ 5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E EM OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS

Fazendo-se uma busca no *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) na área de medicamentos foi encontrado apenas um produto registrado que é um creme dermatológico, cuja categoria é de fitoterápico simples com ação cicatrizante.

O extrato hidroglicólico de *C. officinalis* a 4% é um derivado vegetal e consta como produto registrado na Anvisa.

No banco de dados “i-helps”, o único produto com registro ativo foi uma tintura de calêndula com os dados a seguir:

Produto com Registro ativo (base de dados: “i-helps”):

Tintura de calêndula

0,2 g sol derm fr plas amb x 100 mL

Calendula officinalis L. – capítulos florais de calêndula secos e triturados 200 mg solução de álcool de cereais a 650 gl qsp 1 mL

No Reino Unido, por meio de consulta a base de dados EMC (Electronic Medicines Compendium), as seguintes formulações registradas foram encontradas:

“Boots Alternatives Bite & Sting Relief”. Esta preparação é indicada para o tratamento sintomático de picadas de insetos. Possui as seguintes tinturas:

<i>Hypericum perforatum</i> tincture	HSE 2.4% v/v
<i>Rumex crispus</i> tincture	HSE 2.4% v/v
<i>Echinacea angustifolia</i> tincture	HSE 1.2% v/v
<i>Ledum palustre</i> tincture	HSE 2.4% v/v
<i>Calendula officinalis</i> tincture	HSE 4.8% v/v
<i>Arnica montana</i> tincture	HSE 1.2% v/v
Pyrethrum pale extract	HSE 4.8% v/v

Outra preparação, um creme registrado como “Boots Alternatives Calendula Sore Skin Relief” também foi encontrada. Sua composição inclui:

Calendula officinalis tincture 1/10, HSE 9.0% v/w

A formulação está indicada para o tratamento sintomático de pele áspera ou dolorida.

■ 5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Na *Farmacopeia Brasileira* (vol. 2) a forma de armazenamento e embalagem é em recipientes de vidro ou metal, bem fechados, ao abrigo da luz e do calor.⁸

■ 5.4 ROTULAGEM

Não foi encontrado na literatura pesquisada.

■ 5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS

A *Calêndula officinalis* está presente nas seguintes fontes oficiais:

Farmacopeia Brasileira (volume 2, página 714).⁸

Farmacopeia Europeia.¹⁵¹

Monografias da OMS (WHO Monographs on Selected Medicinal Plants).⁶

Monografias da Comissão E (German Commission E Monographs).¹⁵²

Monografias da ESCOP (The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products).¹⁵³

Monografia da Health Canada.³

Monografia da Comunidade Europeia.¹⁴²

■ 5.6 PATENTES

O Quadro 4 a seguir mostra a lista de patentes que foi compilada a partir de uma busca feita (em agosto de 2014) no banco de dados “Derwent Innovations Index” (ISI, Thomsom Reuters) com a palavra-chave “*Calendula officinalis*” como “Tópico”. A busca retornou 470 registros. Inicialmente uma triagem destes registros foi realizada, e todos os registros que envolveram usos não medicinais e associação de várias plantas foram removidos. Esta triagem resultou em 67 registros, que após leitura do resumo da patente com o mesmo critério de seleção, mencionado anteriormente, forneceu os 43 registros aqui listados.

Quadro 4 – Patentes

Nº	Inventores	Título	Código da patente	Referência
1	CUTAN KOSMETIK VERT (CUTA-Non-standard) CUTAN KOSMETIK VERTRIEBS GMBH & CO KG (CUTA-Non-standard), assignee	Herbal medicaments for treating skin diseases - prepd. from <i>Calendula flowers</i> and ointment	DE3836519-A1; DE3836519-A; DE3836519-C	(154)
2	; FARMEC SA (FARM-Non-standard), assignee	Infection prevention and therapy composition comprises a clay, <i>Calendula officinalis</i> oil extract, vitamins and elastin mixture	RO121404-B1	(155)
3	Nissin Shokuhin Kaisha Ltd (Nisp-C), assignee	New cell adhesion inhibitor	JP11236334-A	(156)
4	KALYTA W G (KALY-Individual), assignee	Topical formulation useful for relieving pain, itching or tissue damage, or treating inflammation, comprises natural sources including tinctures and/or natural extracts, e.g. <i>Hamamelis virginiana</i> , topical anesthetic and base patent	CA2627021-A1.	(157)
5	Baratto G, Riva E, inventors; UNIFARCO SPA (UNIF-Non-standard), assignee	Extracting flowering tops of <i>Calendula officinalis</i> , comprises subjecting flowering tops of <i>Calendula officinalis</i> to extraction with carbon dioxide in supercritical phase at specified temperature and pressure, and decreasing the pressure patent	EP2520306-A1..	(158)
6	Bi Y, inventor; WEIHAI TIANHONG AGRIC TECHNOLOGY CO LTD (WEIH-Non-standard), assignee	Preparation of lutein by extracting <i>Calendula officinalis</i> extract by using backflow extract method, filtering eluting filter fluid, collecting eluent, depressurizing and concentrating eluent, recycling ethanol, and drying patent	CN102408368-A	(159)
7	Bidamant F, Imfeld D, Joller P, Moser H, Imfeld D, inventors; DSM IP ASSETS BV (STAM-C) BIDAMANT F (BIDA-Individual) IMFELD D (IMFE-Individual) JOLLER P (JOLL-Individual) MOSER H (MOSE-Individual), assignee	Composition comprises panthenol, an antiinflammatory plant extract and a collagen synthesis stimulating peptide patent	WO2009124971A2; WO2009124971A3; US2011086060-A1; JP2011516524-W	(160)
8	Biryuk VA, Bozhko NG, Fateeva ZM, inventors; MEDICINAL AGENTS CHEM TECHN RES INST (MEDI-Soviet Institute), assignee	Herbal anti-inflammatory preparation synthesis method - by extracting <i>Calendula officinalis</i> flower heads with 80-85%ethanol, evaporating, purifying, drying, and treating with n-butanol patent	SU1181171-A1	(161)
9	Cha YL, inventor; CHA Y L (CHAY-Individual) LEE C Y (LEEC-Individual), assignee.	Toothpaste composition useful for preventing gingivitis and tooth decay, comprises <i>Calendula officinalis</i> , abrasive agent, wetting agent, fungicide and sweetener patent	KR2011067358-A; KR1216427-B1	(162)
10	Chae BG, Kang BY, Kim HK, Park MJ, inventors; Amorepacific Corp (Amor-C), assignee.	Composition for treating or alleviating diaper rash, comprises zinc oxide, polyglyceryl-two-dipolyhydroxystearate, allantoin and <i>Calendula officinalis</i> extract patent	KR2009056299-A; KR1326679-B1	(163)
11	Chen L, inventor; SHANGHAI YANZI CHEM TECHNOLOGY CO LTD (SHAN-Non-standard), assignee.	Moisturizing cream comprises <i>Calendula officinalis</i> seed oil, sorbitan stearate, cetanol, DL-proline, humectant and water patent	CN103520038-A	(164)
12	Domb AJ, Wolnerman JS, inventors; AXIOMEDIC LTD (AXIO-Non-standard), assignee	Solid, self-bioadhesive and topical composition useful for preventing and/or treating oral mucosal disorder e.g. oral mucositis, contains homeopathic agent or combination of anti-inflammatory and solid bioadhesive carrier patent	EP2324821-A1	(165)
13	Duggan A, Baratoux J, inventors; PASSION LIFE HEALTHCARE LTD (PASS-Non-standard) PASSION FOR LIFE HEALTHCARE LTD (PASS-Non-standard), assignee.	Soluble composition, useful in alleviation of throat disorders, oral care conditions, snoring/sleep apnoea or wound/ skin repair comprising an active ingredient patent	WO2005120455-A1; EP1758554-A1; US2007218114-A1	(166)
14	Enomoto Y, Akiko E, Enomoto A, inventors; FANCL CORP (FANC-Non-standard) FANCL CORP (FANC-Non-standard), assignee	Macrophage migration inhibitory factor secretion inhibitory agent useful as skin external preparation for treating inflammatory diseases e.g. atopic dermatitis and rheumatoid arthritis, comprises <i>Calendula officinalis</i> extract patent	JP2012254955-A; KR2012137226-A; TW201249452-A; CN102813691-A; HK1177685-A0; JP5552461-B2	(167)
15	Erdman CL, inventor; ERDMAN C L (ERDM-Individual), assignee.	Absorbent article, e.g. absorbent garment including diapers for absorbing and containing body exudates, includes adhesive comprising skin wellness ingredient patent	US2004043049-A1.	(168)
16	Erdman CL, inventor; ERDMAN C L (ERDM-Individual) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard), assignee	Absorbent article, e.g. diaper for absorbing extrudates, includes selectively-permeable topsheet having treated hydrophilic zones and non-treated hydrophobic zones patent	WO2003041626-A; US2003093045-A1; WO2003041626A1; AU2002340457A1; MX2004004511-A1	(169)



continuação

Nº	Inventores	Título	Código da patente	Referência
17	Erdman CL, inventor; ERDMAN C L (ERDM-Individual) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard), assignee	Absorbent article, e.g. diapers, comprises top sheet material, back sheet material, absorbent core and adhesive containing skin care ingredient patent	WO2003045142-A; US2003100877-A1; WO2003045142A1; AU2002346453A1; MX2004005007-A1	(170)
18	Gupta SK, inventor; GUPTA S K (GUPT-Individual), assignee.	Mask composition, useful to e.g. treat acne and rosacea, comprises biopolymer, polymer or polyvalent metal complexing composition; divalent/trivalent metal cation; and skin, hair or body beneficial cosmetic/pharmaceutical composition patent	US2004219124-A1	(171)
19	Hatinguais P, Belle R, Negol P, Delhon A, inventors; Pf Medicament Sa (Fabr-C), assignee	New saponin extracted from <i>Calendula officinalis</i> - having hypocholesterolaemic and hypoglycaemic activity patent.	FR2574799-A1; FR2574799-A	(172)
20	Koganov M, inventor; INTEGRATED BOTANICAL TECHNOLOGIES LLC (INTE-Non-standard) AKZO NOBEL SURFACE CHEM LLC (ALKU-C), assignee.	Bioactive botanical cosmetic composition for preparing cosmetic formulation for inhibiting antiinflammatory activity in skin tissue of mammal, comprises membrane fraction derived from cell juice from fresh plant biomass, and stabilizer patent	US2009017144-A1; US8101212-B2	(173)
21	Koganov M, inventor; KOGANOV M (KOGA-Individual) INTEGRATED BOTANICAL TECHNOLOGIES LLC (INTE-Non-standard), assignee.	Bioactive botanical cosmetic composition useful for, e.g. inhibiting antiinflammatory activity in skin tissue of mammal, comprises membrane fraction derived from cell juice extracted from fresh plant biomass, and stabilizing agent patent	US2003175235-A1; US7442391-B2	(174)
22	Lane EM, inventor; FAIRFIELD CLINICAL TRIALS LLC (FAIR-Non-standard), assignee.	Topical composition useful for treating dermatoses, swelling, redness, darkness, rosacea or skin inflammation, comprises antihistamine compound, antiinflammatory drug and optionally botanical medicinal agent patent	WO2009158144-A1	(175)
23	Leal Parente LM, inventor; LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee	Ethanol extract for producing phytotherapeutic formulation, is obtained from flowers of specific plant, where quality control of botanical material was carried out by pharmacognostic assessment of flowers of plant patent	BR200706242-A2	(176)
24	Leal Parente LM, inventor; LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee	Preparing dichloromethane fraction of ethanol extract of pulverized fiber of <i>Calendula officinalis</i> flower for producing herbal formulation, involves adding <i>Calendula officinalis</i> flowers in mixture of methanol and water patent	BR200801621-A2	(177)
25	Leal Parente LM, inventor; LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee	Producing hexane fraction of ethanol extract of pulverized fiber of <i>Calendula officinalis</i> for producing herbal formula for stimulating wound healing, involves dissolving ethanol extract in mixture of methanol and water patent.	BR200802020-A2	(178)
26	Leclere J, inventor; LAB NUXE SA (NUXE-Non-standard) NUXE LAB (NUXE-Non-standard), assignee.	Use of marigold extract for the preparation of a cosmetic and/or dermatological composition for topical application, to fight against signs of skin aging patent	FR2902334-A1; FR2902334-B1	(179)
27	Patrick K, Jacques EJ, inventors; Bristol-Myers Squibb Co (Brim-C) Bristol-Myers Squibb Co (Brim-C), assignee.	Compsn. for treatment of skin lesions - contg. a flavonoid glycoside or its free sugar and a gelling agent patent	EP648496-A; EP648496-A1; CA2118200-A; JP7188031-A	(180)
28	Pitt E, inventor; PITT E (PITT-Individual), assignee.	Topical skin care composition useful for treatment of eczema comprises antiinflammatory component; component which stimulates regeneration of skin cells; component that reduces itch/irritation; and component that softens or moisturizes skin patent	GB2485483-A	(181)
29	Popescu EM, inventor; NATURALIA IMPEX SRL (NATU-Non-standard), assignee.	PHYTOTHERAPEUTIC REMEDY FOR THE TREATMENT OF PEPTIC ULCER patent	RO123423-B1	(182)
30	Prisacaru AI, Andritoiu CV, inventors; PRISACARU A I (PRIS-Individual) ANDRITOIU C V (ANDR-Individual), assignee.	PHYTOTHERAPY WOUND-HEALING OINTMENTS composition made of hydroalcoholic and oily total extracts of plant patent	RO128599-A2.	(183)
31	Prisacaru AI, Andritoiu CV, inventors; PRISACARU A I (PRIS-Individual) ANDRITOIU C V (ANDR-Individual), assignee	WOUND-HEALING PHYTOTHERAPY AND APIPHYTOTHERAPY OILS AND TINCTURES having healing effectsRO128601A2 patent	RO128601-A2	(184)
32	Rai MK, Wankhade S, inventors; WANKHADE S (WANK-Individual), assignee	Preparation or extraction of oil composition used for treating e.g. dermatophytes <i>Microsporum canis</i> , by hydro distilling Asteraceae plant material with solvent to obtain essential oils/extracts, and extracting essential oils/extracts patent	IN201003395-I3	(185)

continua



conclusão

Nº	Inventores	Título	Código da patente	Referência
33	Rios Prieto A, inventor; RIOS PRIETO A (PRIE-Individual), assignee	Pharmaceutical spray formulation used for anti-inflammatory and analgesic action, and treating tendinitis, blunt trauma, muscle aches, sprains, rheumatic pain and joint pain, comprises <i>Calendula officinalis</i> , vitamin A and vitamin E patent	ES2387109-A1; ES2387109-B1	(186)
34	Shaul Hasson Nisis A, Nisis ASH, Shaul HNA, inventors; GYNOPHARM SA (GYNO-Non-standard) IGLOO ZONE CHILE SA (IGLO-Non-standard) NISIS A S H (NISI-Individual) GYNOPHARM SA (GYNO-Non-standard) IGLOO ZONE CHILE SA (IGLO-Non-standard) IGLOO ZONE CHILE SA (IGLO-Non-standard) GYNOPHARM SA (GYNO-Non-standard) IGLOO ZONE CHILE SA (IGLO-Non-standard), assignee	New stable hydrophilic gel, based on a polymer for topical application, comprises chitosan dissolved by the addition of a solvent, useful for treating of skin burns, in dermabrasions in postpeeling and postlaser, and treating eroded skin patent	ES2361459-A1; WO2009090624A2; WO2009090624A3; US2010316739-A1; MX2010007902A1; CA2712527-A1; CN101977589-A; VN25479-A; ES2361459-A8; EP2452673-A2; JP2012515710-W; ES2361459-B1	(187)
35	Shoji F, Ito K, Tabata S, Sugimoto M, Ishii T, inventors; Nissin Shokuhin Kaisha Ltd (Nisp-C), assignee.	New agent for curing atopic dermatitis - contains plant extracts patent	JP11199500-A	(188)
36	Silva PEB, Botelho Silva PE, inventors; PROVETS SIMOES LAB LTDA (PROV-Non-standard), assignee	Pharmaceutical composition for treating superficial injuries as wound and dermic ulcerations of e.g. canines comprises a vegetal extract of one of the plants selected among <i>Calendula</i> , hemostatic agent, an optional ingredient and a vehicle patent	WO2010022485-A1; BR200804102-A2	(189)
37	Suprun AE, inventor; SUPRUN A E (SUPR-Individual), assignee.	Agent for vaginal douche in phase of vaginal microflora recovery following treatment of bacterial vaginosis and vaginal thrush (vaginal yeast) patent	RU2486911-C1	(190)
38	Tacconi E, Trivio R, Rovati LA, inventors; Rottapharm Spa (Rott-C) Rottapharm Spa (Rott-C), assignee	Composition, useful as e.g. medicament for intimate hygiene, comprises active substance e.g. lenitive agent, antimicrobial agent and/or vegetable extracts, together with xanthan gum for bio-adhesion of the substance to skin and mucosae patent	EP2236127-A1; IT1393777-B	(191)
39	Telyatev VV, inventor; TELYATEV V V (TELY-Individual), assignee	Method of treatment patients with chronic nonspecific disease of lung and respiratory ways patent	RU2121355-C1	(192)
40	Timbus IV, Botar A, Turdean L, Schenker M, Irimie FD, inventors; FARMEC SA (FARM-Non-standard),	Hydration cream based on hydrated ointment incorporates e.g. clay, <i>Calendula officinalis</i> extract and oil, vitamin E, jujube oil and glycine derivatives patent	RO120885-B1	(193)
41	Uehara S, Onoue S, Inomata A, Takemoto H, Sasaki I, inventors; Kose Kk (Kosj-C), assignee	External preparation for treating skin diseases such as atopic dermatitis, dry skin, inflammation and itching, comprises barrier functional normalization agent and antiinflammatory agent patent.	JP2003063942-A	(194)
42	Urschel MJ, Urschel TL, Moore KD, inventors; URSCHEL M J (URSC-Individual) URSCHEL T L (URSC-Individual) MOORE K D (MOOR-Individual), assignee.	Herbal ointment, useful e.g. to relief symptoms related to musculoskeletal and joint-related conditions, comprises e.g. an herb-infused oil, water, alcohol, emulsifier wax, menthol, dimethyl isosorbide and glycerin	US2011212193-A1	(195)
43	Zabolotnyi VA, Emelyanov VI, Suprun OV, inventors; ZDOROVE PHARM FIRM (ZDOR-Soviet Institute), assignee	Preparation of anti-inflammatory extract `Kaleflon` - with dichloroethane washing of the aqueous extract and n-butanol extraction of the product patent	RU2090204-C1	(196)

Fonte: Autoria própria.





REFERÊNCIAS

1. The International Plant Names Index [database on the Internet]2012 [cited 21 october 2015]. Available from: <http://www.ipni.org>.
2. The Plant List. Version 1.1 [database on the Internet]2013 [cited 21 october 2015]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>.
3. *Calendula officinalis* L [database on the Internet]2015 [cited 29-06-2015]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/2709695>.
4. Flor JBdS. Levantamento bibliográfico de *Calendula officinalis* (Asteraceae): espécie de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de licenciado em Química pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul ed. Dourados/MS2010. p. 17.
5. Nunes KM. Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L [Mestrado]. Belém-PA: Universidade Federal do Pará; 2008.
6. WHO. WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.
7. Silva F, Park KJ, Magalhaes PM. *Calendula officinalis* L. desorption isotherms: Experimental determination and mathematical modeling. Rev bras plantas med 2007;9(1):21-8.
8. BRASIL. Farmacopéia brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 2. 5 ed. Brasília. 2010.
9. Phrutivorapongkul A, Kiattisin K, Jantrawut P, Chansakaow S, Vejabhikul S, Leelapornpisid P. Appraisal of biological activities and identification of phenolic compound of African marigold (*Tagetes erecta*) flower extract. Pak J Pharm Sci. 2013;26(6):1071-6.
10. Bashir S, Gilani AH. Studies on the antioxidant and analgesic activities of Aztec marigold (*Tagetes erecta*) flowers. Phytother Res 2008;22(12):1692-4.
11. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Spallino A, Falchi M, Bertelli A, et al. Antioxidant activity of *Calendula officinalis* extract: Inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy. Pharmacology. 2009;83(6):348-55.

12. Četković GS, Djilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Tumbas VT. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Res Int.* 2004;37(7):643-50.
13. Chivde BV, Biradar KV, Shiramane RS, Manoj KV. In-Vitro antioxidant activity studies on the flowers of *Tagetes erecta* L. (Compositae). *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 2011;2(3):223-9.
14. Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers in vitro and in vivo. *Pharm Biol.* 2006;44(9):691-7.
15. New England Wild Flower Society. [site] 2011-2014 [cited 2014 30-01]; Go Botany Discover Thousands of New England Plants]. Available from: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/tagetes/erecta/>.
16. BRASIL. Farmacopéia brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 1. 5 ed. Brasília. 2010.
17. WHO. Quality control methods for herbal materials. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
18. Zitterl-Eglseer K, Reznicek G, Jurenitsch J, Novak J, Zitterl W, Franz C. Morphogenetic variability faradiol monoesters in marigold *Calendula officinalis* L. *Phytochem Analysis.* 2001;12(3):199-201.
19. Bilia AR, Bergonzi MC, Gallori S, Mazzi G, Vincieri FF. Stability of the constituents of Calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J Pharm Biomed Anal.* England: Elsevier Science B.V.; 2002. p. 613-24.
20. Borella JC, De Carvalho DMA, Teixeira JCL, Ribeiro NS. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (asteraceae). *Revista Eletrônica de Farmácia.* 2012;IX(2):25-36.
21. Júlio César Borella JC, de Carvalho DMA. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. *Revista Brasileira de Farmácia.* 2011;92(1):11-6.
22. Borella JC, Teixeira JCL. Avaliação comparativa de certificados de análises de empresas que comercializam tintura de *Calendula officinalis* L. (asteraceae). *Visão Acadêmica.* 2013;14(3):26-35.

23. Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, de Carvalho DMA. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2010;31(2):1-5.
24. Bako E, Deli J, Toth G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. J Biochem Bioph Meth. 2002;53(1-3):241-50.
25. Baumann D, Adler S, Griiner S, Otto F, Weinreich B, Hamburger M. Supercritical carbon dioxide extraction of marigold at high pressures: comparison of analytical and pilot-scale extraction. Phytochem Anal. 2004;15(4):226-30.
26. Kültür S, Sami SN. Medicinal plants used in Isparih (Razgrad-Bulgaria) district. Isparih ilçesinde (razgrad-Bulgaristan) kullamlan tibbi bitkiler. 2009;6(2):107-24.
27. Pieroni A, Gray C. Herbal and food folk medicines of the Russlanddeutschen living in Kunzelsau/Talacker, South-Western Germany. Phytother Res. 2008;22(7):889-901.
28. Pieroni A, Quave CL, Villanelli ML, Mangino P, Sabbatini G, Santini L, et al. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. J Ethnopharmacol. 2004;91(2-3):331-44.
29. Oliveira MJR, Simoes MJS, Sassi CRR. Phytotherapy in the public health system (SUS) in the Sao Paulo State, Brazil. Rev bras plantas med 2006;8(2):39-41.
30. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines. 3 ed: Pharmaceutical Press; 2008.
31. BRASIL. RDC nº 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. In: Sanitária ANdV, editor. Diário Oficial da União ed. 2010.
32. BRASIL. Instrução Normativa 02, de 13 de Maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2014.

33. Roopashree TS, Raman D, Shobha Rani RH, Narendra C. Acute oral toxicity studies of antipsoriatic herbal mixture comprising of aqueous extracts of *Calendula officinalis*, *Momordica charantia*, *Cassia tora* and *Azadirachta indica* seed oil. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;33(2-3):74-83.
34. ESCOP-European Scientific Cooperative on Phytotherapy Exeter, Reino Unido: University of Exeter; 2003.
35. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdes O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. Exp Toxicol Pathol. 2011;63(4):387-91.
36. Parente LML, Costa EA, Matos LG, De Paula JR, Cunha LC, Junior GV, et al. *Calendula officinalis*: Central depressive effect and subacute toxicity. Lat Am J Pharm. 2009;28(6):907-13.
37. Silva EJ, Aguiar FJS, Gonçalves ES, Sousa IMV, Dimech GS, Fraga MCCA, et al. Evaluation of the hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* L. on biochemical and hematological parameters in female Wistar rats. Rev bras farmacogn. 2005;15(2):88-93.
38. Silva EJ, Goncalves ES, Aguiar F, Evencio LB, Lyra MM, Coelho MC, et al. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. Phytother Res. 2007;21(4):332-6.
39. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdés O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2011 //;63(4):387-91.
40. Silva EJ, Gonçalves ES, Aguiar F, Evêncio LB, Lyra MMA, Coelho MCO, et al. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. Phytotherapy Research. 2007 //;21(4):332-6.
41. Parente LML, Costa EA, Matos LG, Paula JR, Cunha LC, Júnior GV, et al. *Calendula officinalis*: Efeito depressor central e toxicidade subaguda. Latin American Journal of Pharmacy. 2009;28(06):907-13.
42. Silva EJ, Costa-Silva JH, Evêncio LB, Fraga MC, Coelho MC, Wanderley AG. Reproductive assessment of hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. in Wistar rats. Phytother Res. 2009;23(10):1392-8.

43. Silva EJ, Gonçalves ES, Aguiar F, Evêncio LB, Lyra MM, Coelho MC, et al. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. *Phytother Res.* 2007;21(4):332-6.
44. Silva EJ, Costa-Silva JH, Evencio LB, Fraga Mdo C, Coelho MC, Wanderley AG. Reproductive assessment of hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. in Wistar rats. *Phytother Res.* 2009;23(10):1392-8.
45. Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, Lopez M, Decalo M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol.* 1998;61(1):49-55.
46. Perez-Carreón JI, Cruz-Jimenez G, Licea-Vega JA, Arce Popoca E, Fattel Fazenda S, Villa-Trevino S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol in Vitro.* 2002;16(3):253-8.
47. Frankic T, Salobir K, Salobir J. The comparison of in vivo antigenotoxic and antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (marigold) and vitamin E in young growing pigs. *J Anim Physiol An N.* 2009;93(6):688-94.
48. Elias R, De Meo M, Vidal-Ollivier E, Laget M, Balansard G, Dumenil G. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis.* 1990;5(4):327-31.
49. Leffa DD, Rosa Rd, Munhoz BP, Mello AdAM, Mandelli FD, Amaral PdA, et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in mice treated with methyl methanesulfonate. *Adv Lif Sci* 2012;2(2):21-8.
50. Reider N, Komericki P, Hausen BM, Fritsch P, Aberer W. The seamy side of natural medicines: Contact sensitization to arnica (*Arnica montana* L.) and marigold (*Calendula officinalis* L.). *Contact Dermatitis.* 2001;45(5):269-72.
51. Bruynzeel DP, Ketel WGv, E. Young, Th van Jousi G. Smeenk and on behalf of the dutch contact dermatoses group. *Contact Dermatitis* 1992;27(4):278-9.
52. Fiume MZ. Cosmetic ingredient review expert pannel. Final report on the safety assessment of *Calendula officinalis* extract and *Calendula officinalis*. *Int J Toxicol.* 2001;20:13-21.
53. Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol.* 2009;126(3):463-7.

54. Madrid Ahumada MA, Mahecha Donato LC, Oviedo Peñaloza VA, Chaves Clavijo M, Roa Molina NS, García Robayo DA, et al. Effect of *Calendula officinalis* on the proliferation of human gingival fibroblast. *Univ odontol*. 2010;29(63):107-12.
55. Patrick KFM, Kumar S, Edwardson PAD, Hutchinson JJ. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the European marigold. *Phytomedicine*. 1996;3(1):11-8.
56. Parente LM, Lino Junior Rde S, Tresvenzol LM, Vinaud MC, de Paula JR, Paulo NM. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012.
57. Erratum to Ref. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats *Acta Cir Bras*. 2011;26(2):152.
58. Parente LML, Silva MSB, Brito LAB, Lino Jr RS, Paula JR, Trevenzol LMF, et al. Healing effect and antibacterial activity of *Calendula officinalis* L. cultivated in Brazil. *Rev bras plantas med* 2009;11(4):383-91.
59. Parente LM, Andrade MA, Brito LA, Moura VM, Miguel MP, Lino-Junior Rde S, et al. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cir Bras*. 2011;26(1):19-24.
60. Parente LML, Lino Júnior RDS, Tresvenzol LMF, Vinaud MC, De Paula JR, Paulo NM. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evid-based Compl Alt*. 2012.
61. Gurumadhva Rao S, Laxminarayana Udupa A, Udupa SL, Rao PGM, Rao G, Kulkarni DR. *Calendula* and *Hypericum*: Two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia*. 1991;62(6):508-10.
62. Nitz AC, Ely JB, D'Acampora AJ, Tames DR, Corrêa BP. Estudo morfológico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *ACM arq catarin med*. 2006;35(4):74-9.
63. Chandran PK, Kuttan R. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43(2):58-64.

64. Naeini AT, Miri R, Shafiei N, Tabandeh MR, Oryan A, Nazifi S. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comp Clin Patho.* 2012;21(3):253-7.
65. Borodina TN, Rumsh LD, Kunizhev SM, Sukhorukov GB, Vorozhtsov GN, Feldman BM, et al. Entrapment of herbal extracts into biodegradable microcapsules. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2008;2(2):176-82.
66. Tanideh N, Tavakoli P, Saghiri MA, Garcia-Godoy F, Amanat D, Tadbir AA, et al. Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012.
67. Pagnano LdO, Baraldi-Artoni SM, Pacheco MR, Santos Ed, Oliveira D, Lui JF. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. *Ciênc rural.* 2008;38(6):1662-6.
68. Wendt SBT. Comparação da eficácia da Calendula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
69. Menezes FFd. Avaliação *Calendula officinalis* L. na cicatrização cutânea de cães. Aspectos clínicos, histopatológicos e histoquímicos. [Doutorado]. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2006.
70. Saini P, Al-Shibani N, Sun J, Zhang W, Song F, Gregson KS, et al. Effects of *Calendula officinalis* on human gingival fibroblasts. *Homeopathy.* 2012;101(2):92-8.
71. Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian j exp biol.* 2009;47(2):113-20.
72. Sartori LR, Ferreira MS, Perazzo FF, Lima LM, Carvalho JCT. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. *Rev bras farmacogn.* 2003;13:17-9.
73. da Silva Ricoldy D, de Albuquerque Botura AC, Oda JY, Takemura OS. Effect of ultrasound associated with calendula gel on restorative activity in experimental muscular injuries. *Acta Sci Health Sci.* 2010;32(2):135-40.

74. Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavec M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). J Ethnopharmacol. 1997;57(2):139-44.
75. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. J Nat Prod. 2006;69(12):1692-6.
76. Del Valle Pérez LO, Leyva IT, Segura MS, Socarrás Ferrer BB, Veranes MS, Suárez VM, et al. Efecto in vitro de un extracto de *Calendula officinalis* L. sobre linfocitos humanos. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2002;18(3).
77. Iordache F, Carmen I, Aneta P, Lupu M, Andrei E, Buzila C, et al. Effects of plant lectin and extracts on adhesion molecules of endothelial progenitors. Cent Eur J Biol 2011;6(3):330-41.
78. Gorchakova TV, Suprun IV, Sobenin IA, Orekhov AN. Use of natural products in anticytokine therapy. Bull Exp Biol Med. 2007;143(3):316-9.
79. Máriássyová M. Antioxidant activity of some herbal extracts in rapeseed and sunflower oils. J Food Nutr Res J FOOD NUTR RES. 2006;45(3):104-9.
80. Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2012;18(3):173-6.
81. Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Młynarczyk A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. Indian J Microbiol 2012:1-6.
82. Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LDd, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. Ciênc odontol bras. 2008;11(2):86-93.
83. Glehn EAV, Rodrigues GPS. Etest to confirm the action potential of plant hydroglycol extracts on *Candida sp.* (Berkhout). Rev bras plantas med 2012;14(3):435-8.

84. Cwikla C, Schmidt K, Matthias A, Bone KM, Lehmann R, Tiralongo E. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother Res.* 2010;24(5): 649-56.
85. Nand P, Drabu S, Gupta RK. In vitro antibacterial and antioxidant potential of medicinal plants used in the treatment of acne. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(1):185-90.
86. Pratibha N, Sushma D, Gupta Rajinder K. Screening for antioxidant and antibacterial potential of common medicinal plants in the treatment of acne. *Int J Drug Dev Res.* 2012;4(1):65-71.
87. Fit IN, Rapuntean G, Rapuntean S, Chirila F, Nadas GC. Antibacterial effect of essential vegetal extracts on *Staphylococcus aureus* compared to antibiotics. *Not Bot Horti Agrobo.* 2009;37(2):117-23.
88. Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Braz J Microbiol* 2008;39(1):61-3.
89. Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 2002;40(11):1669-75.
90. Ducat G, Torres YR, Dalla Santa HS, Caetano IK, Kleinubing SA, Stock D, et al. Correlation among metallic ions, phenolic compounds and antimicrobial action in medicinal plants extracts. *J Food Quality* 2011;34(5):306-14.
91. Martini KC. Atividade bactericida de *Azadiractha indica* e *Calendula officinalis* frente a *Staphylococcus sp.* isolados de mastite bovina [Dissertação]. Umuarama: Universidade Paranaense; 2010.
92. Rodriguez-Garcia A, Galan-Wong LJ, Arevalo-Nino K. Development and in vitro evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms. *Acta Odontol Latinoam.* 2010;23(2):158-63.
93. Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res* 2003;17(6):599-604.

94. Sterer N, Rubinstein Y. Effect of various natural medicinals on salivary protein putrefaction and malodor production. *Quintessence Int* 2006;37(8):653-8.
95. Kamel EG, El-Emam MA, Mahmoud SSM, Fouda FM, Bayaoumy FE. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercarial infectivity to albino mice by methanol extract of some plant species. *Pestic Biochem Phys*. 2010;98(3):342-8.
96. Helaly FM, Soliman HSM, Soheir AD, Ahmed AA. Controlled release of migration of molluscicidal saponin from different types of polymers containing *Calendula officinalis*. *Adv in Polym Tech* 2001;20(4):305-11.
97. Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed Pharmacother*. 1997;51(4):176-80.
98. Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FTMC, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJV. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(3):596-601.
99. Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Cardoso JC, Cavalcanti De Albuquerque Junior RL, Vieira Fonseca MJ. Efficacy of marigold extract-loaded formulations against UV-induced oxidative stress. *J Pharm Sci*. 2011;100(6):2182-93.
100. Cordova CA, Siqueira IR, Netto CA, Yunes RA, Volpato AM, Cechinel Filho V, et al. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep*. 2002;7(2):95-102.
101. Bernatoniene J, Masteikova R, Davalgiene J, Peciura R, Gauryliene R, Bernatoniene R, et al. Topical application of *Calendula officinalis* (L.): formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *J Med Plants Res*. 2011;5(6):868-77.
102. Ercetin T, Senol FS, Erdogan Orhan I, Toker G. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Ind Crop Prod*. 2012;36(1):203-8.

103. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*. 2006;6.
104. Wegiera M, Smolarz HD, Jedruch M, Korczak M, Kopron K. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line--pilot study. *Acta Pol Pharm*. 2012;69(2):263-8.
105. Matic IZ, Juranic Z, Savikin K, Zdunic G, Nadvinski N, Godevac D. Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytother Res*. 2012.
106. Preethi KC, Siveen KS, Kuttan R, Kuttan G. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L flowers. *Asian Pac J Cancer P*. 2010;11(6):1773-9.
107. Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJ. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol*. Ireland: Elsevier Ireland; 2010. p. 596-601.
108. Matsyik G, Wojciak-Kosior M, Paduch R. The influence of *Calendulae officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. *J Pharm Biomed Anal*. England 2005. p. 285-92.
109. Agarwal M, Sharma P, Kushwaha S. Antifertility efficacy of 50% ethanolic extract of *Calendula officinalis* in male rats. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(SUPPL. 5):192-6.
110. Shivasharan BD, Nagakannan P, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Protective effect of *Calendula officinalis* L. flowers against monosodium glutamate induced oxidative stress and excitotoxic brain damage in rats. *Ind J Clin Biochem*. 2012:1-7.
111. Montasser SA, Abd El-Wahab AE, Abd-Elgawad MMM, Abd-El-Khair H, Faika FHK, Hammam MMA. Role of some plant extracts and organic manure in controlling tylenchulus semipenetrans cobb in vitro and in vivo in citrus. *J Appl Sci Res*. 2012;8(11):5415-24.

112. Rusu MA, Tamas M, Puica C, Roman I, Sabadas M. The hepatoprotective action of ten herbal extracts in CCl₄ intoxicated liver. *Phytother Res.* 2005;19(9):744-9.
113. Bertges LC, Felga ÂMG, Teixeira JBP, Pimentel CF, Neves PO. Effect of *Calendula officinalis* infusion on indomethacin-induced gastric lesions in Wistar rats. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2006;11(2).
114. Bucciarelli A, Skliar MI. Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. *Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora.* 2007;48(4):361-9.
115. Mehrabani D, Ziaei M, Hosseini SV, Ghahramani L, Bananzadeh AM, Ashraf MJ, et al. The effect of *Calendula officinalis* in therapy of acetic acid induced ulcerative colitis in dog as an animal model. *Iran Red Crescent Med J.* 2011;13(12):884-90.
116. Chakraborty GS, Arora R, Majee C. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis*. *Int Res J Pharm.* 2011;2(1):61-5.
117. Kiage-Mokua BN, Roos N, Schrezenmeir J. Lapacho tea (*Tabebuia impetiginosa*) extract inhibits pancreatic lipase and delays postprandial triglyceride increase in rats. *Phytother Res.* 2012;26(12):1878-83.
118. Behtash N, Shafaroudi H, Nazari Khorasgani Z. Analgesic effect of *Calendula officinalis* flowers extract in mice. *Toxicol Lett* 2010;196:S251.
119. Shahidi S, Mahmoodi M, Farahmandlou N. Antinociceptive properties of hydro-alcoholic extract of *Calendula officinalis* in rat. *Basic and Clinical Neuroscience.* 2012;3(5):45-8.
120. Parente LML, Costa EA, Matos LG, De Paula JR, Cunha LC, Júnior GV, et al. *Calendula officinalis*: central depressive effect and subacute toxicity. *Lat Am J Pharm.* 2009;28(6):907-13.
121. Mishra AK, Mishra A, Verma A, Chattopadhyay P. Effects of *Calendula* essential oil-based cream on biochemical parameters of skin of albino rats against ultraviolet B radiation. *Sci Pharm. Austria* 2012. p. 669-83.
122. Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull* 2001;49(7):863-70.

123. Vargas S R, Zavala S MA, Perez G C, Perez G RM, Perez G S. Preliminary study of antidiarrhoeic activity in five Mexican plant species. *Phytother Res.* 1998;12(SUPPL. 1):S47-S8.
124. Ozkol H, Tuluce Y, Koyuncu I. Subacute effect of cigarette smoke exposure in rats: Protection by pot marigold (*Calendula officinalis* L.) extract. *Toxicol Ind Health* 2012;28(1):3-9.
125. Melo MM, Habermehl GG, Oliveira NJF, Nascimento EF, Santos MMB, Lúcia M. Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinalis* extracts and ar-turmerone. *Arq bras med vet zootec.* 2005;57(1):7-17.
126. Ray D, Mukherjee S, Falchi M, Bertelli A, Braga PC, Das DK. Amelioration of myocardial ischemic reperfusion injury with *Calendula officinalis*. *Curr Pharm Biotechno* 2010;11(8):849-54.
127. Perez-Gutierrez S, Vargas-Solis R, Zavala S M, Perez-G C, Perez-G RM. Inhibitory effect of five plant extracts on heart rates of rats. *Phytother Res.* 1998;12(SUPPL. 1):S49-S50.
128. Bashir S, Janbaz KH, Jabeen Q, Gilani AH. Studies on spasmogenic and spasmolytic activities of *Calendula officinalis* flowers. *Phytother Res.* 2006;20(10):906-10.
129. Schmidgall J, Schnetz E, Hensel A. Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide- containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes. *Planta Med.* 2000;66(1):48-53.
130. Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, Lillie D, Gullion C, Madden TE. A clinical study: Melaleuca, Manuka, Calendula and green tea mouth rinse. *Phytother Res.* 2005;19(11):951-7.
131. Fuchs SM, Schliemann-Willers S, Fischer TW, Elsner P. Protective effects of different marigold (*Calendula officinalis* L.) and rosemary cream preparations against sodium-lauryl-sulfate-induced irritant contact dermatitis. *Skin Pharmacol Phys* 2005;18(4):195-200.
132. Panahi Y, Sharif MR, Sharif A, Beiraghdar F, Zahiri Z, Amirchoopani G, et al. A randomized comparative trial on the therapeutic efficacy of topical *Aloe vera* and *Calendula officinalis* on diaper dermatitis in children. *TheScientificWorldJournal.* 2012:810234.

133. Faria RL, Cardoso LML, Akisue G, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AOC, et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(5):476-82.
134. Cruz F, Leite F, Cruz G, Cruz S, Reis J, Pierce M, et al. Sutures coated with antiseptic pomade to prevent bacterial colonization: a randomized clinical trial. *Oral Surg Oral Med O*. 2012.
135. Amoian B, Moghadamnia AA, Mazandarani M, Amoian MM, Mehrmanesh S. The effect of calendula extract toothpaste on the plaque index and bleeding in gingivitis. *Res J Med Plant*. 2010;4(3):132-40.
136. Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, Lillie D, Gullion C, Madden TE. A clinical study: Melaleuca, Manuka, Calendula and green tea mouth rinse. *Phytother res*. [Clinical Trial, Phase I; Clinical Trial, Phase II; Randomized Controlled Trial; Research Support, N.I.H., Extramural; Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005;19(11):951-7.
137. Milián Vázquez PM, Seife Rodríguez JM, Morales Ojeda R, Vázquez Montero L, Martín Álvarez C, Quiros Enríquez M. *Calendula officinalis* L. en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. *Bol latinoam Caribe plantas med aromát*. 2010;9(5).
138. Jorge Neto J, Fracasso JF, Camargo Neves MdCL, Santos LE, Banuth VL. Tratamento de úlceras varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbaderriman* (Vellozo) Martius. *Rev ciênc farm*. 1996;17:181-6.
139. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J clin oncol J* [Clinical Trial; Comparative Study; Randomized Controlled Trial]. 2004;22(8):1447-53.
140. Subha R, Saratha R. Naturally occurring substance (*Calendula officinalis* flower) as a corrosion inhibitor of mild steel in 1M HCL solution. *Journal of Corrosion Science and Engineering*. 2006;10.
141. Vanaclocha B, Cañigüeral S. *Fitoterapia - Vademecum de Prescripcion*. 4 ed: Elsevier España; 2003.

142. Agency EM. Community Herbal Monograph on *Calendula officinalis* L., Flos. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). 2008 08-May-2008.
143. Shipochliev T. Uterotonic action of extracts from a group of medicinal plants. Veterinarno-meditsinski nauki. 1981;18(4):94-8.
144. Suárez JP, Duque DC, Gómez AA, Arango V, Cadavid A, Maya WC. Effect of extracts from *Anethum graveolens*, *Melissa officinalis* y *Calendula officinalis* on the human spermatozoa. 2012;17(4):420-30.
145. Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, Carvalho DMA. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Rev ciênc farm básica apl. 2010;31(2).
146. Fonseca YM, Vicentini FTMC, Catini CD, Fonseca MJV. Determination of rutin and narcissin in marigold extract and topical formulations by liquid chromatography: Applicability in skin penetration studies. Quim Nova. 2010;33(6):1320-4.
147. Mishra A, Chattopadhyay P. Assessment of in vitro sun protection factor of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) essential oil formulation. J Young Pharm 2012;4(1):17-21.
148. Bernatoniene J, Masteikova R, Davalgiene J, Peciura R, Gauryliene R, Bernatoniene R, et al. Topical application of *Calendula officinalis* (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. J Med Plants Res 2011;5(6):868-77.
149. Mishra P, Agrawal S, Soni N, Gupta D. Compritol solid lipid microparticles loaded with herbal extracts for acne treatment. Int J Res Pharm Sci. 2012;3(3):414-21.
150. Borella JC, Ribeiro NS, Teixeira JCL, Carvalho DMA. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2010;31(2):193-7.
151. European pharmacopoeia. 4 ed. University of Michigan: Council of Europe; 2002.

152. Blumenthal M. The complete german commission E monographs - therapeutic guide to herbal medicines Boston, MA, EUA: American Botanical Council; 1998. p. 685.
153. ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. 2 ed: Thieme Medical; 2003.
154. CUTAN KOSMETIK VERT (CUTA-Non-standard) CUTAN KOSMETIK VERTRIEBS GMBH & CO KG (CUTA-Non-standard), assignee. Herbal medicaments for treating skin diseases - prepd. from *Calendula flowers* and ointment base patent DE3836519-A1; DE3836519-A; DE3836519-C2.
155. FARMEC SA (FARM-Non-standard), assignee. Infection prevention and therapy composition comprises a clay, *Calendula officinalis* oil extract, vitamins and elastin mixture patent RO121404-B1.
156. Nissin Shokuhin Kaisha Ltd (Nisp-C), assignee. New cell adhesion inhibitor patent JP11236334-A.
157. KALYTA W G (KALY-Individual), assignee. Topical formulation useful for relieving pain, itching or tissue damage, or treating inflammation, comprises natural sources including tinctures and/or natural extracts, e.g. *Hamamelis virginiana*, topical anesthetic and base patent CA2627021-A1.
158. Baratto G, Riva E, inventors; UNIFARCO SPA (UNIF-Non-standard), assignee. Extracting flowering tops of *Calendula officinalis*, comprises subjecting flowering tops of *Calendula officinalis* to extraction with carbon dioxide in supercritical phase at specified temperature and pressure, and decreasing the pressure patent EP2520306-A1.
159. Bi Y, inventor WEIHAI TIANHONG AGRIC TECHNOLOGY CO LTD (WEIH-Non-standard), assignee. Preparation of lutein by extracting *Calendula officinalis* extract by using backflow extract method, filtering eluting filter fluid, collecting eluent, depressurizing and concentrating eluent, recycling ethanol, and drying patent CN102408368-A.
160. Bidamant F, Imfeld D, Joller P, Moser H, Imfeld D, inventors; DSM IP ASSETS BV (STAM-C) BIDAMANT F (BIDA-Individual) IMFELD D (IMFE-Individual) JOLLER P (JOLL-Individual) MOSER H (MOSE-Individual), assignee. Composition comprises panthenol, an antiinflammatory plant extract and a collagen synthesis stimulating peptide patent WO2009124971-A2; WO2009124971-A3; US2011086060-A1; JP2011516524-W.

161. Biryuk VA, Bozhko NG, Fateeva ZM, inventors; MEDICINAL AGENTS CHEM TECHN RES INST (MEDI-Soviet Institute), assignee. Herbal anti-inflammatory preparation synthesis method - by extracting *Calendula officinalis* flower heads with 80-85% ethanol, evaporating, purifying, drying, and treating with n-butanol patent SU1181171-A1.
162. Cha YL, inventor CHA Y L (CHAY-Individual) LEE C Y (LEEC-Individual), assignee. Toothpaste composition useful for preventing gingivitis and tooth decay, comprises *Calendula officinalis*, abrasive agent, wetting agent, fungicide and sweetener patent KR2011067358-A; KR1216427-B1.
163. Chae BG, Kang BY, Kim HK, Park MJ, inventors; Amorepacific Corp (Amor-C), assignee. Composition for treating or alleviating diaper rash, comprises zinc oxide, polyglyceryl-two-dipolyhydroxystearate, allantoin and *Calendula officinalis* extract patent KR2009056299-A; KR1326679-B1.
164. Chen L, inventor SHANGHAI YANZI CHEM TECHNOLOGY CO LTD (SHAN-Non-standard), assignee. Moisturizing cream comprises *Calendula officinalis* seed oil, sorbitan stearate, cetanol, DL-proline, humectant and water patent CN103520038-A.
165. Domb AJ, Wolnerman JS, inventors; AXIOMEDIC LTD (AXIO-Non-standard), assignee. Solid, self-bioadhesive and topical composition useful for preventing and/or treating oral mucosal disorder e.g. oral mucositis, contains homeopathic agent or combination of anti-inflammatory and solid bioadhesive carrier patent EP2324821-A1.
166. Duggan A, Baratoux J, inventors; PASSION LIFE HEALTHCARE LTD (PASS-Non-standard) PASSION FOR LIFE HEALTHCARE LTD (PASS-Non-standard), assignee. Soluble composition, useful in alleviation of throat disorders, oral care conditions, snoring/sleep apnoea or wound/skin repair comprising an active ingredient patent WO2005120455-A1; EP1758554-A1; US2007218114-A1.
167. Enomoto Y, Akiko E, Enomoto A, inventors; FANCL CORP (FANC-Non-standard) FANCL CORP (FANC-Non-standard), assignee. Macrophage migration inhibitory factor secretion inhibitory agent useful as skin external preparation for treating inflammatory diseases e.g. atopic dermatitis and rheumatoid arthritis, comprises *Calendula officinalis* extract patent JP2012254955-A; KR2012137226-A; TW201249452-A; CN102813691-A; HK1177685-A0; JP5552461-B2.

168. Erdman CL, inventor ERDMAN C L (ERDM-Individual), assignee. Absorbent article, e.g. absorbent garment including diapers for absorbing and containing body exudates, includes adhesive comprising skin wellness ingredient patent US2004043049-A1.
169. Erdman CL, inventor ERDMAN C L (ERDM-Individual) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard), assignee. Absorbent article, e.g. diaper for absorbing extrudates, includes selectively-permeable topsheet having treated hydrophilic zones and non-treated hydrophobic zones patent WO2003041626-A; US2003093045-A1; WO2003041626-A1; AU2002340457-A1; MX2004004511-A1.
170. Erdman CL, inventor ERDMAN C L (ERDM-Individual) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard) PARAGON TRADE BRANDS INC (PARA-Non-standard), assignee. Absorbent article, e.g. diapers, comprises top sheet material, back sheet material, absorbent core and adhesive containing skin care ingredient patent WO2003045142-A; US2003100877-A1; WO2003045142-A1; AU2002346453-A1; MX2004005007-A1.
171. Gupta SK, inventor GUPTA S K (GUPT-Individual), assignee. Mask composition, useful to e.g. treat acne and rosacea, comprises biopolymer, polymer or polyvalent metal complexing composition; divalent/trivalent metal cation; and skin, hair or body beneficial cosmetic/pharmaceutical composition patent US2004219124-A1.
172. Hatinguais P, Belle R, Negol P, Delhon A, inventors; Pf Medicament Sa (Fabr-C), assignee. New saponin extracted from *Calendula officinalis* - having hypocholesterolaemic and hypoglycaemic activity patent FR2574799-A1; FR2574799-A.
173. Koganov M, inventor INTEGRATED BOTANICAL TECHNOLOGIES LLC (INTE-Non-standard) AKZO NOBEL SURFACE CHEM LLC (ALKU-C), assignee. Bioactive botanical cosmetic composition for preparing cosmetic formulation for inhibiting antiinflammatory activity in skin tissue of mammal, comprises membrane fraction derived from cell juice from fresh plant biomass, and stabilizer patent US2009017144-A1; US8101212-B2.

174. Koganov M, inventor KOGANOV M (KOGA-Individual) INTEGRATED BOTANICAL TECHNOLOGIES LLC (INTE-Non-standard), assignee. Bioactive botanical cosmetic composition useful for, e.g. inhibiting antiinflammatory activity in skin tissue of mammal, comprises membrane fraction derived from cell juice extracted from fresh plant biomass, and stabilizing agent patent US2003175235-A1; US7442391-B2.
175. Lane EM, inventor FAIRFIELD CLINICAL TRIALS LLC (FAIR-Non-standard), assignee. Topical composition useful for treating dermatoses, swelling, redness, darkness, rosacea or skin inflammation, comprises antihistamine compound, antiinflammatory drug and optionally botanical medicinal agent patent WO2009158144-A1.
176. Leal Parente LM, inventor LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee. Ethanolic extract for producing phytotherapeutic formulation, is obtained from flowers of specific plant, where quality control of botanical material was carried out by pharmacognostic assessment of flowers of plant patent BR200706242-A2.
177. Leal Parente LM, inventor LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee. Preparing dichloromethane fraction of ethanol extract of pulverized fiber of *Calendula officinalis* flower for producing herbal formulation, involves adding *Calendula officinalis* flowers in mixture of methanol and water patent BR200801621-A2.
178. Leal Parente LM, inventor LEAL PARENTE L M (PARE-Individual), assignee. Producing hexane fraction of ethanol extract of pulverized fiber of *Calendula officinalis* for producing herbal formula for stimulating wound healing, involves dissolving ethanol extract in mixture of methanol and water patent BR200802020-A2.
179. Leclere J, inventor LAB NUXE SA (NUXE-Non-standard) NUXE LAB (NUXE-Non-standard), assignee. Use of marigold extract for the preparation of a cosmetic and/or dermatological composition for topical application, to fight against signs of skin aging patent FR2902334-A1; FR2902334-B1.
180. Patrick K, Jacques EJ, inventors; Bristol-Myers Squibb Co (Brim-C) Bristol-Myers Squibb Co (Brim-C), assignee. Compsn. for treatment of skin lesions - contg. a flavonoid glycoside or its free sugar and a gelling agent patent EP648496-A; EP648496-A1; CA2118200-A; JP7188031-A.

181. Pitt E, inventor PITT E (PITT-Individual), assignee. Topical skin care composition useful for treatment of eczema comprises antiinflammatory component; component which stimulates regeneration of skin cells; component that reduces itch/irritation; and component that softens or moisturizes skin patent GB2485483-A.
182. Popescu EM, inventor NATURALIA IMPEX SRL (NATU-Non-standard), assignee. Phytotherapeutic remedy for the treatment of peptic ulcer patent RO123423-B1.
183. Prisacaru AI, Andritoiu CV, inventors; PRISACARU A I (PRIS-Individual) ANDRITOIU C V (ANDR-Individual), assignee. Phytotherapy wound-healing ointments composition made of hydroalcoholic and oily total extracts of plant patent RO128599-A2.
184. Prisacaru AI, Andritoiu CV, inventors; PRISACARU A I (PRIS-Individual) ANDRITOIU C V (ANDR-Individual), assignee. Wound-healing phytotherapy and apiphytotherapy oils and tinctures having healing effects RO128601A2 patent RO128601-A2.
185. Rai MK, Wankhade S, inventors; WANKHADE S (WANK-Individual), assignee. Preparation or extraction of oil composition used for treating e.g. dermatophytes *Microsporum canis*, by hydro distilling Asteraceae plant material with solvent to obtain essential oils/extracts, and extracting essential oils/extracts patent IN201003395-I3.
186. Rios Prieto A, inventor RIOS PRIETO A (PRIE-Individual), assignee. Pharmaceutical spray formulation used for anti-inflammatory and analgesic action, and treating tendinitis, blunt trauma, muscle aches, sprains, rheumatic pain and joint pain, comprises *Calendula officinalis*, vitamin A and vitamin E patent ES2387109-A1; ES2387109-B1.
187. Shaul Hasson Nisis A, Nisis ASH, Shaul HNA, inventors; GYNOPHARM SA (GYNO-Non-standard) IGLOO ZONE CHILE SA (IGLO-Non-standard) NISIS A S H (NISI-Individual) assignee. New stable hydrophilic gel, based on a polymer for topical application, comprises chitosan dissolved by the addition of a solvent, useful for treating of skin burns, in dermabrasions in postpeeling and postlaser, and treating eroded skin patent ES2361459-A1; WO2009090624-A2; WO2009090624-A3; US2010316739-A1; MX2010007902-A1; CA2712527-A1; CN101977589-A; VN25479-A; ES2361459-A8; EP2452673-A2; JP2012515710-W; ES2361459-B1.

188. Shoji F, Ito K, Tabata S, Sugimoto M, Ishii T, inventors; Nissin Shokuhin Kaisha Ltd (Nisp-C), assignee. New agent for curing atopic dermatitis - contains plant extracts patent JP11199500-A.
189. Silva PEB, Botelho Silva PE, inventors; PROVETS SIMOES LAB LTDA (PROV-Non-standard), assignee. Pharmaceutical composition for treating superficial injuries as wound and dermic ulcerations of e.g. canines comprises a vegetal extract of one of the plants selected among *Calendula*, hemostatic agent, an optional ingredient and a vehicle patent WO2010022485-A1; BR200804102-A2.
190. Suprun AE, inventor SUPRUN A E (SUPR-Individual), assignee. Agent for vaginal douche in phase of vaginal microflora recovery following treatment of bacterial vaginosis and vaginal thrush (vaginal yeast) patent RU2486911-C1.
191. Tacconi E, Trivio R, Rovati LA, inventors; Rottapharm Spa (Rott-C) Rottapharm Spa (Rott-C), assignee. Composition, useful as e.g. medicament for intimate hygiene, comprises active substance e.g. lenitive agent, antimicrobial agent and/or vegetable extracts, together with xanthan gum for bio-adhesion of the substance to skin and mucosae patent EP2236127-A1; IT1393777-B.
192. Telyatev VV, inventor TELYATEV VV (TELY-Individual), assignee. Method of treatment patients with chronic nonspecific disease of lung and respiratory ways patent RU2121355-C1.
193. Timbus IV, Botar A, Turdean L, Schenker M, Irimie FD, inventors; FARMEC SA (FARM-Non-standard), assignee. Hydration cream based on hydrated ointment incorporates e.g. clay, *Calendula officinalis* extract and oil, vitamin E, jujube oil and glycine derivatives patent RO120885-B1.
194. Uehara S, Onoue S, Inomata A, Takemoto H, Sasaki I, inventors; Kose Kk (Kosj-C), assignee. External preparation for treating skin diseases such as atopic dermatitis, dry skin, inflammation and itching, comprises barrier functional normalization agent and antiinflammatory agent patent JP2003063942-A.

195. Urschel MJ, Urschel TL, Moore KD, inventors; URSCHEL M J (URSC-Individual) URSCHEL T L (URSC-Individual) MOORE K D (MOOR-Individual), assignee. Herbal ointment, useful e.g. to relief symptoms related to musculoskeletal and joint-related conditions, comprises e.g. an herb-infused oil, water, alcohol, emulsifier wax, menthol, dimethyl isosorbide and glycerin patent US2011212193-A1.
196. Zabolotnyi VA, Emelyanov VI, Suprun OV, inventors; ZDOROVE PHARM FIRM (ZDOR-Soviet Institute), assignee. Preparation of anti-inflammatory extract `Kaleflon` - with dichloroethane washing of the aqueous extract and n-butanol extraction of the product patent RU2090204-C1.



DISQUE SAÚDE **136**

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
bvsms.saude.gov.br



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

Governo
Federal