



Influência do gel de calêndula na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Aspectos macroscópico e histológico.

Influence of marigold's jelly on the cutaneous wounds healing in rats. Macroscopic and histological aspects.

João Marcelo Arantes Braga Barberis Nabas

Mestre em Ciências Farmacêuticas Araraquara – UNESP e professor das Disciplinas de Química Farmacêutica e Farmacognosia na FAI

Larissa Pernomian

Farmacêutica

Gabriela Castanho Gimenes

Farmacêutica

Marcos César Ferreira da Costa

Farmacêutico

Resumo

Procurou-se determinar os aspectos macroscópico e microscópico da cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratos (**Rattus norvegicus, albinus**, Wistar), induzidas pelo gel de calêndula a 10%, para comprovar sua eficácia terapêutica *in vivo*. Foram utilizados 40 ratos machos, separados em dois grupos com 20 animais cada, nos quais foi induzida uma ferida cirúrgica na região dorso-lombar. Os animais tratados receberam, a cada 24 horas, uma aplicação tópica do gel medicamentoso sobre as suas feridas cirúrgicas. Aos 3^o., 6^o., 9^o., 12^o. e 15^o. dia pós-cirúrgico, os animais foram submetidos à remoção das feridas cirúrgicas e posteriormente sacrificados. As peças removidas foram processadas por técnicas de rotina, sendo os cortes corados pela H.E. e tricrômico de Masson. Macroscopicamente constatou-se que a cicatrização das feridas dos animais tratados foi superior à dos animais controles, o que foi evidenciado, microscopicamente, pela colagenização e reepitelização mais avançadas nas feridas cutâneas, comprovando a ação terapêutica do gel de calêndula a 10% na cicatrização *in vivo*.

Palavras-chave

Calendula officinalis L. – cicatrização por segunda intenção – gel medicamentoso – colagenização – reepitelização.

Abstract

It was looked to determine the aspects macroscopic and microscopically of the wounds healing for second intention of cutaneous wounds in rats (**Rattus norvegicus, albinus**, Wistar), induced for the marigold's jelly at 10%, to prove its alive therapeutical effectiveness *in vivo*. 40 male, separate rats had been used in two groups with 20 animals each, in which a surgical wound in the back-lumbar region was induced. The treat animals had received, to each 24 hours, a topic application of the gel on its surgical wounds. To 3^o., 6^o., 9^o., 12^o. and 15^o. day of the after-surgical one, the animals had been submitted to the removal of the surgical wounds and later sacrificed. The removed parts had been processed for routine techniques, being the cuts colored by H.E. and Masson's trichromic. Macroscopic evidenced that the wounds healing of the wounds of the treat animals was superior to the one of the



animal controls, what it was evidenced, microscopic, for the more advanced collagenization and reepithelization in the cutaneous wounds, proving the therapeutic action of the marigold's jelly 10% *in vivo* wounds healing.

Key-words

***Calendula officinalis* L.** – wounds healing by second intention – medicinal jelly – collagenization – reepithelization.

Introdução

O vegetal ***Calendula officinalis* L.**, uma angiosperma dicotiledônea pertencente à família **Compositae (Asteraceae)** segundo o sistema de classificação filogenético de Bold; Alexopoulos; Delevoryas (1980) e originária da Europa Meridional e do Leste do Mediterrâneo segundo Fetrow e Avila (2000), vulgarmente conhecida como calêndula, tem sido utilizado desde a guerra civil norte-americana como antiinflamatório e cicatrizante no tratamento de feridas abertas de missionários que acompanhavam os soldados (TESKE & TRENTINI, 2001).

A planta apresenta uma composição química bastante variada, incluindo flavonóides (VIDAL-OLLIVIER et al., 1989), triterpenos, cumarinas e polissacarídeos (ISSAC, 1995), taninos, ácidos fenólicos, tocoferóis, vitaminas, mucilagens e saponinas (SCHEMIGALL; SCHNETZ; HENSEL, 2000) e carotenóides (BAKO; DELI; TOTH, 2002). Dentre os principais componentes químicos da calêndula estão os flavonóides quercetina, quercetinoglicosídeos e narcisina, e as saponinas mono e bidesmosídicas do ácido oleanólico (VIDAL-OLLIVIER et al., 1989). Em função da diversificada gama de princípios vegetais encontrados na planta, as atividades farmacológicas e os empregos terapêuticos da calêndula também variam muito, sendo experimentalmente evidentes as ações antiviral (DE TOMMASI et al., 1991, KALVATCHEV;

VALDER; GAZARO, 1997), imunoestimulante (ISSAC, 1995), antibacteriana e antiinflamatória (DELLA LOGGIA et al., 1994; ZITTERL-EGELSEER et al., 1997), antimutagênica (RAMOS et al., 1998, ELIAS et al., 1990), antineoplásica (CHEW; WONG; WONG, 1996) e cicatrizante (KLOUCHEK-POPOVA et al., 1982, CARVALHO; TAGLIAVINO; TAGLIAVINI, 1991, BALDUCCI-ROSLINDO; SILVERIO; MALAGOLI, 1999).

A atividade cicatrizante do vegetal ***C. officinalis* L.**, demonstrada há muito na medicina popular, têm sido atribuída, por alguns autores, aos carotenóides, e por outros, às saponinas e aos flavonóides integrantes do vegetal, que parecem estar relacionados com um aumento da atividade fagocitária de macrófagos presentes no campo inflamatório, acelerando a limpeza da área inflamada e, conseqüentemente, o reparo cicatricial (TESKE & TRENTINI, 2001). A atividade antiinflamatória do vegetal, demonstrada em camundongos por Akihisa et al. (1996) e por Zittlerl—Eglseer et al. (1997), foi atribuída possivelmente aos triterpenóides, primariamente ao monoéster de faradiol, que parece contribuir com a atividade cicatrizante do vegetal. A calêndula apresenta ação tópica e sistêmica sobre feridas traumáticas, induzindo à rápida cicatrização e impedindo a supuração devido às suas atividades antiinflamatória e anti-séptica (POZETTI, 1988).

Klouchek-Popova et al. (1982) e Carvalho et al. (1991) comprovaram cientificamente a atividade cicatrizante da calêndula, empregando a planta em modelos experimentais sob a forma de pomada e creme, respectivamente. Os primeiros utilizaram um modelo de rato, no qual feridas cirurgicamente induzidas e tratadas com uma pomada de calêndula a 5% demonstraram acentuada regeneração fisiopatológica e reepitelização, constatando o efeito cicatrizante do semi-sólido (KLOUCHEK-POPOVA et al., 1982). Já Carvalho, Tagliavini e Tagliavini (1991)



concluíram, num modelo de rato, que o creme de calêndula demonstrou atividade cicatrizante superior à associação de confrei, própolis e mel, promovendo reparo tecidual mais eficiente. Neste estudo, a análise microscópica dos cortes histológicos revelou que as feridas tratadas pelo creme de calêndula apresentaram, dentro de 17 dias no período pós-cirúrgico imediato, um epitélio bem definido, recobrando toda a extensão da ferida, e tecido conjuntivo subjacente, profundo, bem organizados, com fibras colágenas em disposição bem definidas, caracterizando ótima cicatrização (CARVALHO; TAGLIAVINI; TAGLIAVINI, 1991).

Balducci-Roslindo, Silverio e Malagoli (1999) demonstraram a ação cicatrizante da calêndula, em associação com confrei, num modelo experimental utilizando animais de laboratório submetidos à extração dentária do incisivo superior. O vegetal, administrado sob a forma de solução tópica em doses homeopáticas (3CH) sobre as feridas decorrentes da extração dentária dos animais, demonstrou atividade cicatrizante e ossificante, evidentes na análise histopatológica dos cortes preparados a partir das peças bucais removidas. Os resultados microscópicos evidenciaram uma maturidade cicatricial e óssea mais avançada nos animais tratados em relação aos animais controle. A proliferação fibroblástica e a neovascularização do tecido de granulação dos animais tratados foram mais intensos que no grupo controle, assim como a capacidade de diferenciação dos fibroblastos em osteoblastos.

A eficácia terapêutica na cicatrização de feridas das preparações semi-sólidas graxas contendo o vegetal *C. officinalis* L. como droga ativa, bem como de extratos do vegetal, é, portanto, conhecida na literatura científica. Entretanto, a eficácia de preparações plásticas aquosas do vegetal, na cicatrização cutânea, como o gel de calêndula, cuja manipulação e aplicação mostram extrema facilidade e simplicidade, ainda não foram demonstrados cientificamente. Este fato, aliado à crescente valorização dos

fitoterápicos na clínica médica, justifica a realização de um estudo pré-clínico que busque comprovar a eficácia terapêutica do gel de calêndula em modelos experimentais vivos, contribuindo para a futura realização de estudos clínicos com a preparação vegetal, onde só então poderá ser comprovada cientificamente a eficácia do fitoterápico como cicatrizante em humanos, e, a partir daí, proceder com o registro do medicamento em compêndios nacionais de Farmácia como preparação oficial.

Material e Métodos

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com peso médio de 138 gramas, 50 dias de idade, separados em grupos controle e tratado, com 20 animais cada. Para a realização da ferida cirúrgica, os animais foram previamente submetidos à anestesia geral com 1 ml de tribromoetanol a 2,5% para cada quilo de peso corporal, por via intraperitoneal, seguida pela tricotomia da região dorso-lombar do animal. Procedeu-se com a realização de uma ferida cirúrgica circular, com diâmetro padrão de 10 mm, e remoção de todo o tegumento, com auxílio de pinça anatômica e tesoura de ponta reta. Os animais tratados receberam, a cada 24 horas durante o período pós-cirúrgico até a data de seu sacrifício, uma aplicação do gel de calêndula, preparado com resina de carbopol 940 a 1% e tintura de calêndula a 10%, conforme técnica descrita por Ferreira (2002). Nos animais do grupo controle, procedeu-se apenas a manipulação da ferida cirúrgica. No 3º, 6º, 9º, 12º. e 15º. dia do pós-cirúrgico, quatro animais de cada grupo, previamente anestesiados com tribromoetanol a 2,5%, foram submetidos à remoção da ferida cirúrgica e subsequentemente sacrificados por inalação excessiva de clorofórmio em câmara de vidro fechada.

As peças removidas foram processadas pela técnica de rotina histopatológica para o preparo dos cortes, conforme metodologia descrita por



Junqueira e Carneiro (2004) e Behmer et al. (2003). Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Masson (MICHALANY, 1980). As cirurgias, a obtenção e o processamento das peças, assim como a leitura dos resultados foram realizados no Laboratório de Histopatologia e Diagnóstico das Faculdades Adamantinenses Integradas - FAI.

Os resultados macroscópicos foram obtidos através da análise e mensuração do diâmetro das feridas dos animais na data de sua remoção, por meio de régua milimetrada. Os valores do diâmetro das feridas dos animais de cada grupo, apresentados em tabela, obedeceram ao cálculo da média aritmética simples dos valores encontrados em cada ferida cirúrgica, conforme metodologia utilizada por Carvalho, Tagliavini e Tagliavini (1991).

Resultado

A análise dos resultados macroscópicos, no decorrer do pós-operatório, permitiu constatar que a cicatrização induzida pelo gel de calêndula foi ligeiramente mais avançada do que a cicatrização dos animais controles, em função do diâmetro médio das feridas dos animais tratados ao final do 15º dia do pós-operatório (menor que o diâmetro médio das feridas dos animais controle, na mesma época do pós-operatório), conforme os valores apresentados na tabela abaixo.

Tabela. 1. Diâmetro das feridas dos animais-controle e tratados.

| Período Pós-Cirúrgico | Diâmetro das Feridas | |
|-----------------------|----------------------|-----------|
| | Controle | Calêndula |
| 3 dias | 9,75 mm | 9,75 mm |
| 6 dias | 8 mm | 7 mm |
| 9 dias | 5,5 mm | 4,5 mm |
| 12 dias | 4,65 mm | 3,5 mm |
| 15 dias | 3,75 mm | 2 mm |

Nos animais-controle, aos três dias pós-cirúrgicos, a crosta é abundante, intensamente eosinofílica e, a rede de fibrina exuberante,

preenche grande parte da ferida cirúrgica. O tecido de granulação mostra-se pouco celularizado, constituído principalmente por fibroblastos jovens e intenso edema que se propaga, inclusive, para os tecidos subjacentes remanescentes. A proliferação vascular é acentuada enquanto que a substância intercelular, pouco condensada, apresenta-se com ligeira basofilia, sendo que o infiltrado inflamatório crônico é de moderada intensidade (Fig. 1). O epitélio localizado nas bordas da incisão cirúrgica começa a sofrer espessamento. Ao tricrômico de Masson, a substância fundamental amorfa, está constituída por fina rede de fibras com afinidade pela anilina (Fig.2).

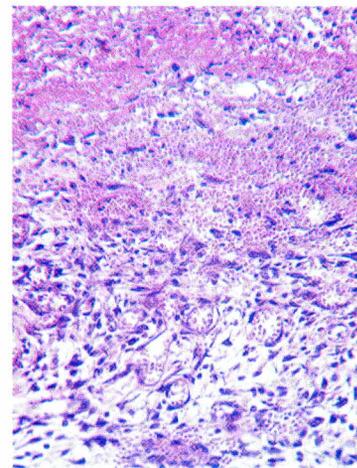


Fig. 1. Animal controle. 3 dias pós-cirúrgicos. Rede de fibrina, tecido de granulação e infiltrado inflamatório crônico. H.E. 100X.

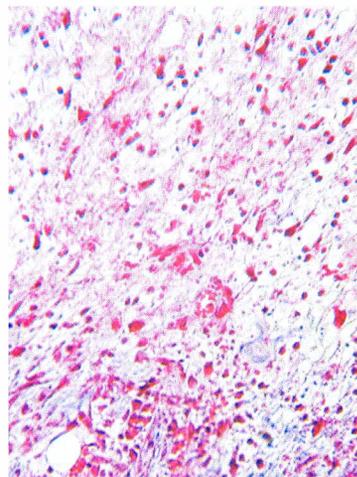


Fig. 2. Animal controle. 3 dias pós-cirúrgicos. Substância fundamental amorfa e fina rede de fibras com afinidade à anilina. Tricrômico de Masson. 100X.

Aos 6 dias pós-cirúrgicos tanto a crosta quanto a rede de fibrina mostram-se diminuídas em relação ao período anterior. O tecido de granulação, ricamente vascularizado, está constituído por fibroblastos jovens e fibroblastos bem diferenciados. O infiltrado inflamatório crônico moderado está representado, predominantemente, por linfócitos. A substância intercelular já apresenta fibras entrelaçadas, originando pequenos feixes. Persiste moderada área de edema. O epitélio de revestimento começa a proliferar nas bordas da ferida cirúrgica. Ao tricrômico de Masson, a afinidade pela anilina é ainda discreta.

Aos 9 dias pós-cirúrgicos, tanto ao HE quanto ao tricrômico de Masson, as características morfológicas e tintoriais do tecido de granulação apresentam-se semelhantes ao descrito para os animais do grupo anterior, porém ligeiramente mais maturo.

Aos 12 dias pós-cirúrgicos a crosta da ferida está muito diminuída enquanto que a rede de fibrina foi substituída por fibroblastos bem diferenciados e por fibrócitos. A neoformação vascular persiste apenas na porção superficial do tecido de granulação. A substância intercelular está representada por longos e sinuosos feixes de fibras que se dispõem paralelamente à superfície da ferida cirúrgica; o infiltrado inflamatório crônico é discreto (Fig.3) e o epitélio de revestimento recobre grande parte da ferida. Ao tricrômico de Masson, o tecido de granulação na sua porção mais superficial e intermediária mostra moderada positividade à anilina (Fig.4).

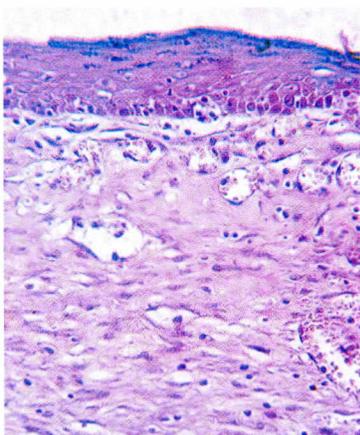


Fig. 3. Animal controle. 12 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação com fibroblastos bem diferenciados, fibrócitos, feixes de fibras colágenas, neoformação vascular e infiltrado inflamatório crônico. H.E. 100X.

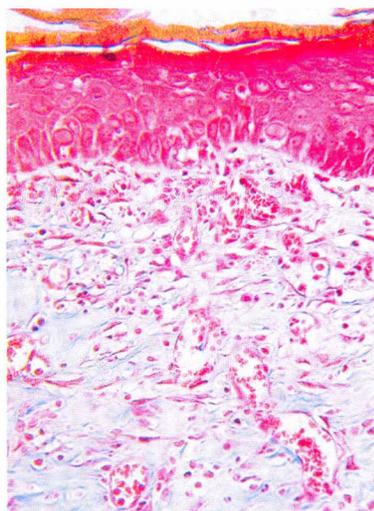


Fig. 4. Animal controle. 12 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação bem vascularizado e feixes de fibras colágenas com moderada positividade à anilina. Tricrômico de Masson. 100X.

Aos 15 dias pós-cirúrgicos tanto a crosta quanto a rede de fibrina desapareceram. O tecido de granulação está representado por fibrócitos e fibroblastos bem diferenciados. A substância intercelular mostra forte acidofilia com predominância de feixes de fibras sobre o número de células. A reepitelização da ferida cirúrgica está completa na maioria dos animais. Ao tricrômico de Masson, o tecido de granulação exibe forte positividade à anilina (Fig.5).

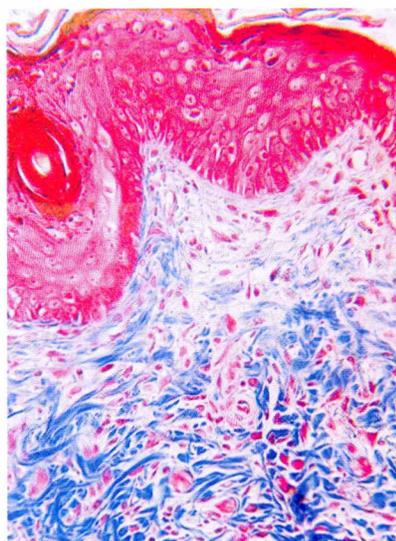


Fig. 5. Animal controle. 15 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação com espessos feixes de fibras colágenas fortemente coradas pela anilina. Tricrômico de Masson. 100X..



Nos animais tratados, aos 3 dias pós-cirúrgicos, em relação a seus controles correspondentes, a crosta da ferida mostra-se reduzida assim como a rede de fibrina na qual nota-se maior proliferação fibroblástica e neoformação vascular. A substância fundamental amorfa é menos abundante, com acidofilia mais intensa e exibe aspecto discretamente fibrilar. O edema é menos abundante e o infiltrado histiolinfoplasmocitário não apresenta diferenças significativas (Fig.6). Ao tricrômico de Masson, a substância intercelular começa a apresentar organização fibrilar com moderada positividade à anilina (Fig.6).

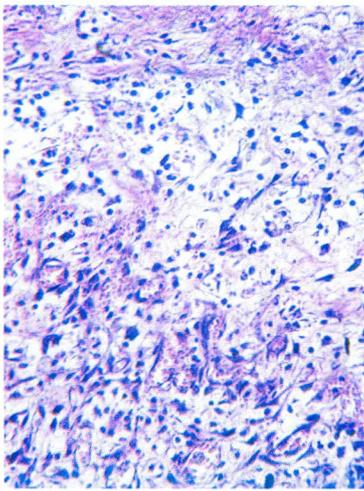


Fig.6. Animal tratado. 3 dias pós-cirúrgicos. Observar diminuição da rede de fibrina, infiltrado inflamatório crônico e aumento da proliferação fibroblástica em relação à Fig. 1. H.E. 100X.

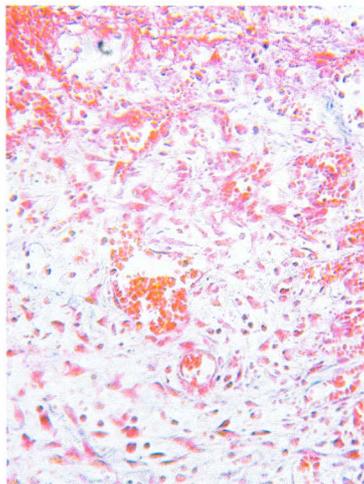


Fig. 7. Animal tratado. 3 dias pós-cirúrgicos. Substância intercelular representada por delgadas fibras colágenas com maior afinidade a anilina, em relação ao observado na Fig. 2. Tricrômico de Masson. 100X.

Aos 6 dias pós-cirúrgicos observa-se que, em relação aos animais controle não houve modificação morfológica ou tintorial em relação à crosta. No que se refere à rede de fibrina, embora abundante, verifica-se maior celularização. O tecido de granulação está constituído, predominantemente, por fibroblastos bem diferenciados. O infiltrado inflamatório crônico é discreto e está representado por linfócitos, raros plasmócitos e histiócitos. A área de edema está nitidamente diminuída enquanto que o epitélio de revestimento está mais desenvolvido. Ao tricrômico de Masson, o tecido de granulação exibe feixes de fibras colágenas com maior positividade à anilina.

Aos 9 dias pós-cirúrgicos, tanto ao HE quanto ao tricrômico de Masson, as características morfológicas e tintoriais de todas as estruturas da ferida cirúrgica mostram características semelhantes às descritas para o grupo anterior mantendo, inclusive, maior grau de maturação em relação ao observado nos animais controle para o mesmo período.

Aos 12 dias pós-cirúrgicos nota-se que, em relação ao observado nos animais controle, tanto a crosta da ferida quanto a rede de fibrina estão diminuídas ou até ausentes em alguns animais. O tecido de granulação está constituído principalmente por fibrócitos, sendo evidente a diminuição da vascularização e do infiltrado inflamatório crônico. A substância intercelular altamente fibrosada mostra colagenização acentuada (Fig.8). O epitélio de revestimento está mais desenvolvido. Ao tricrômico de Masson, o tecido de granulação exibe colagenização mais intensa representada por feixes de fibras fortemente positivas à anilina do corante (Fig.9).

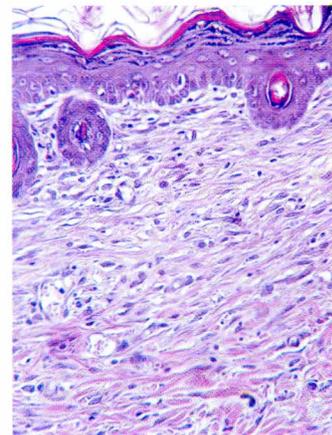


Fig. 8. Animal tratado. 12 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação com fibrócitos, espessos feixes de fibras colágenas com acidofilia mais intensa do que o observado na fig. 7. H.E. 100X.

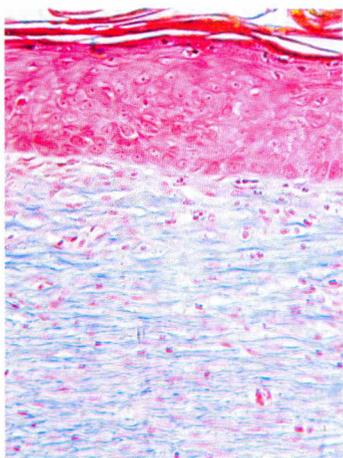


Fig. 9. Animal tratado. 12 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação exibindo feixes de fibras colágenas com forte positividade à anilina. Tricrômico de Masson. 100X..

Aos 15 dias pós-cirúrgicos observa-se que, em relação aos animais controle, houve maturação mais precoce do processo de cicatrização que pode ser comprovada pela ausência da crosta da ferida cirúrgica, maior colagenização do tecido de granulação, diminuição da vascularização, diminuição do infiltrado inflamatório crônico e maior desenvolvimento do epitélio de revestimento. Ao tricrômico de Masson pode ser comprovada a maior colagenização do tecido de granulação que, neste período, está representado por elevada quantidade de fibras colágenas que formam compactos feixes que exibem intensa positividade à anilina (Fig. 10) sendo tal diferença melhor evidenciada nas porções intermediária e profunda da ferida cirúrgica.

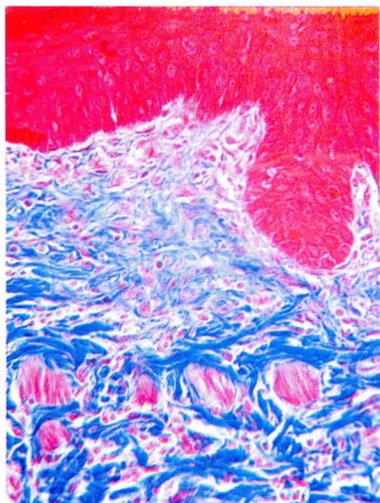


Fig. 10. Animal tratado. 15 dias pós-cirúrgicos. Tecido de granulação com grossos feixes de fibras colágenas intensamente corados pela anilina. Tricrômico de Masson. 100X

Discussão

Nos animais controle os resultados histológicos do processo de reparo de feridas cutâneas dorso lombares são semelhantes aos observados por Moraes & Matheus (1980).

Os resultados macroscópicos observados apontaram uma cicatrização precoce nas feridas dos animais tratados, que apresentaram um diâmetro gradativamente menor do que os animais controle.

No aspecto histológico, pode-se evidenciar a ação antiinflamatória (mais especificamente, antiedematogênica) do vegetal *C. officinalis* L. logo ao 3º dia do pós-cirúrgico, uma vez que o tecido de granulação dos animais tratados apresentou um menor edema do que o observado nos animais controle. Esta ação antiinflamatória, como previsto por Akihisa et al. (1996) e Zitterl-Eglseer et al. (1997), é de fundamental importância para o efeito cicatrizante do vegetal, uma vez que a cicatrização é o último evento do processo inflamatório e só ocorre depois de cessados os fenômenos inflamatórios destrutivos e realizada a limpeza do campo inflamatório, a qual inclui a reabsorção do exsudato inflamatório, que determina o edema. A proliferação fibroblástica e vascular, mais intensas no tecido de granulação dos animais tratados, já era evidenciada logo de início, assim como o demonstrado por Balducci-Roslindo e Silvério & Malagoli (1999). Tal fenômeno biológico está relacionado com ação cicatrizante do vegetal, uma vez que a formação do tecido de granulação, caracterizado pela proliferação fibroblástica ativa e pela neovascularização, é uma das etapas cruciais do reparo cicatricial, da qual depende a reepitelização. Ao longo do período pós-cirúrgico pôde-se observar, como no estudo de Carvalho, Tagliavini e Tagliavini (1991), que a colagenização do tecido de granulação dos animais tratados sempre foi mais avançada do que nos animais controle, uma consequência da proliferação fibroblástica mais intensa no tecido de granulação destes



animais. Acompanhando o ritmo da maturação do tecido de granulação, a reepitelização das feridas dos animais tratados também se mostrou mais avançada em todos os períodos pós-cirúrgicos, como consequência da colagenização mais avançada do tecido de granulação destes animais, que sustentou a proliferação epitelial.

Conclusão

A partir da análise dos resultados pôde-se concluir que o gel de calêndula a 10% favoreceu a cicatrização de feridas cutâneas de ratos; provavelmente por estimular a proliferação fibroblástica do tecido de granulação e por consequência sua colagenização e a reepitelização das feridas, tornando o processo de reparo mais avançado do que os padrões observados nos animais controle, confirmando assim, o efeito cicatrizante do gel.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gildo Matheus, responsável pelo Serviço de Histopatologia e Diagnóstico da FAI, pela orientação no planejamento e realização da parte prática do presente trabalho assim como pela interpretação dos resultados histopatológicos. À Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Giroto Matheus pelo auxílio na realização das cirurgias e a confecção das fotomicrografias. À Prof^a Mestre Soraya Stefani Butarelo, pelo auxílio durante a pesquisa bibliográfica. À Maria Luciana Pereira Manzoli Capaldi, bióloga e técnica do Laboratório de Histopatologia da FAI, pela colaboração durante o processamento das peças, microtomia e colorações efetuadas. À Marilene M. Michelutti, farmacêutica e técnica do Laboratório de Fitoterapia da FAI, pela orientação durante o preparo do gel de calêndula.

Referências

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCI, S.;

TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of *Compositae* and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, 43: 1255-60, 1996.

BALDUCCI-ROSLINDO, E.; SILVÉRIO, K. G.; MALAGOLI, D. M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. **Rev. Odont. Univ. São Paulo**, 13(2): 181-87, 1999.

BAKO, E., DELI, J.; TOTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of calendula products. **J. Biochem. Biophys. Met.**, 53: 241-50, 2002.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G.; RODRIGUES, C. J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2^a. ed. Barueri: Manole, 2003.

BOLD, H. C.; ALEXOPOULOS, C. J.; DELEVORYAS, T. **Morphology of plants and fungi**. 4. ed. New York: Harper & Row, p. 819, 1980.

CARVALHO, P. S. P. de; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Ciênc. Bioméd.**, 12: 39-50, 1991.

CHEW, B. P.; WONG, M. W.; WONG, T. S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Res**, 16: 3689-94, 1996.

DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.; ISSAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Med**, 60: 516-20, 1994.

DE TOMMASI, N.; CONTI, C.; STEIN, M. L.; PIZZA, C. Structure and *in vitro* antiviral activity of triterpenoid saponins from



- Calendula arvensis*. **Planta Med**, 57: 250-53, 1991.
- 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**, 5: 327-31, 1990.
- FERREIRA, A.O. de. **Guia prático da farmácia magistral**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 352 – 55, 2002.
- FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 154-56, 2000.
- ISSAC, O. *Calendula officinalis* L. Die Ringelblume, **Z. Phytother.**, 16: 357-70, 1995.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica. Texto e Atlas**. 10^a. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1-18, 2004.
- KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GAZARO, D. Different effects of phorbol ester derivatives on human immunodeficiency virus 1 replication in lymphocytic and monocytic human cells. **Acta Virol**, 41: 289-92, 1997.
- KLOUCHEK-POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N.; KRUSTEVA, S. Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. **Acta Physiol Pharmacol Bulg**, 8: 63-7, 1982.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para os cirurgião, enfermeiro e citotécnico**. São Paulo: EPU, 1980.
- MORAES, N.P.; MATHEUS, G. Estudo histológico do tecido de granulação de feridas cutâneas de ratos hipotireoideos e parotidectomizados (I). **Rev. Bras. Pesquisas Méd. e Biol.**, 13:173-182, 1980.
- POZETTI, G. L. **Medicamentos homeopáticos: algumas monografias**. Ribeirão Preto: Inst. François Lamasson, 100 p., 1988.
- RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LOPEZ, M.; DECALO, M. Genotoxicity of na extract of *Calendula officinalis* L. **J Ethnopharmacol**, 61: 49-55, 1998.
- SCHEMIGALL, J.; SCHNETZ, E.; HENSEL, A. Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbals in an *in vivo* bioadhesive assay on buccal membranes. **Planta Med**, 66: 48-53, 2000.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: compêndio de fitoterapia**. 4a. ed. Rev. Curitiba: Herbarium Lab. Bot., p.66-8, 2001.
- VIDAL-OLLIVIER, E.; BABADJAMIAN, A.; MAILLARD, C.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Identification et dosage par chromatographie liquide haute performance de six saponosides dans les fleurs de *Calendula officinalis* L. **Pharm Acta Helv**, 64: 156-58, 1989.
- ZITTERL- EGLSEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT-ZSILAVEEZ, M.; DELLA-LOGGIA, B.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C. Anti-edematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **J. Ethnopharmacol**, 57: 139-44, 1997.