

بررسی تأثیر پماد کالاندولا آفیشینالیس بر بهبودی زخم فشاری

روانبخش اسمعیلی*، محمدعلی ابراهیم زاده**، علیرضا خلیلیان***، ابراهیم نصیری****
هدایت جعفری*، امید دهقانی****، سعید علیپور****

چکیده

سابقه و هدف: زخم فشاری در بیمارانی که به مدت طولانی در بیمارستان یا منزل بستری می‌شوند به میزان زیادی رخ می‌دهند. درمان این زخم‌ها پرهزینه و برای درمان آن از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. این مطالعه با توجه به اثر مثبت پماد کالاندولا آفیشینالیس در درمان زخم‌ها و التهاب‌های پوستی و با هدف تعیین اثر این پماد بر زخم فشاری این مطالعه انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کارآزمایی بالینی از نوع مقایسه قبل و بعد، ۲۰ بیمار که مبتلا به زخم فشاری بوده‌اند و درمان‌های رایج را دریافت می‌نمودند وارد مطالعه شدند. وضعیت بیماران از نظر مدت بیماری، مدت داشتن زخم، وسعت زخم ثبت و به مدت ۴ هفته و هر روز ۳ بار پانسمان محل زخم با پماد کالاندولا (پس از شستشو با سرم نمکی و خشک کردن) انجام شد و هر هفته وسعت زخم و درصد بهبودی بررسی و ثبت گردید.

یافته‌ها: میزان بهبودی بیماران ۵۶/۶ درصد بود. اکثریت بیماران (۵۵٪) بهبودی نسبی پیدا کردند. زمان بهبودی هفته ۳/۵±۱/۲ بوده است ($P < 0/01$) و بهبودی زخم فشاری در هفته‌های سوم و چهارم اتفاق افتاده است.

استنتاج: پماد کالاندولا با توجه به ارزانی و در دسترس بودن می‌تواند در درمان زخم‌های فشاری مورد استفاده قرار گیرد و در بهبود زخم مؤثر می‌باشد و به عنوان یک روش درمانی در بیمارستان‌ها و منازل برای درمان زخم‌های فشاری بیماران تجویز و استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پماد کالاندولا آفیشینالیس، زخم فشاری، بهبودی زخم فشاری

مقدمه

زخم‌ها بسیار پرهزینه می‌باشند (۴). تخمین زده می‌شود سالانه بالغ بر یک بلیون دلار در آمریکا برای درمان این نوع زخم‌ها هزینه می‌شود و عامل مرگ مستقیم ۷ تا ۸ درصد تمامی افراد فلج گزارش شده است (۳). در آمریکا تقریباً ۱/۷ میلیون نفر از پدیده زخم فشاری رنج می‌برند (۵).

زخم پوستی ناشی از فشار و کشش با نام‌های مختلف معرفی شده است که به نظر می‌رسد زخم فشاری نام مناسب‌تری می‌باشد (۱،۲). این زخم‌ها به میزان ۷ تا ۲۳ درصد در بیمارانی که به مدت طولانی در بیمارستان بستری می‌شوند و در ۲۰ تا ۴۰ درصد بیمارانی که در منزل بستری می‌باشند، رخ می‌دهند (۲،۳). این

این تحقیق طی شماره ۸۵-۱۵۰ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.
* **مؤلف مسئول:** ساری - خیابان وصال شیرازی - دانشکده پرستاری و مامایی ساری.

Email: esmaeeli2003@yahoo.com

** متخصص شیمی دارویی، دانشیار مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** کارشناس ارشد، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ تصویب: ۸۷/۸/۸

* کارشناس ارشد پرستاری داخلی - جراحی، مربی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** متخصص آمار حیاتی، استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران

**** کارشناس پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۲۳ تاریخ اصلاح: ۸۷/۵/۳۰

حدود ۵۰ درصد از زخم‌های فشاری قابل پیشگیری می‌باشند، و علیرغم بکارگیری بهترین روش‌های پیشگیری زخم‌های فشاری بروز می‌نمایند (۶).

برای درمان زخم‌های فشاری روش‌های مختلفی بکار می‌روند (۸،۳،۷) و روش‌های جدیدتری نیز برای درمان این نوع زخم‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۹-۱۱، ۴).

پماد کالاندولا آفیشینالیس حاوی عصاره تمام گل‌های همیشه بهار است که واجد خواص ضد التهابی، ترمیمی و ضد میکروبی می‌باشند (۱۲). از این دارو در درمان التهاب‌های پوستی، آگزماها، اولسرها، ترک‌ها و انواع زخم‌ها استفاده می‌شود (۱۳، ۱۴). همچنین اثر مثبت این دارو در پیشگیری از التهاب پوستی بعد از انجام رادیوتراپی در بیماران مبتلا به کانسر پستان (۱۵) و به صورت موضعی در پیشرفت بهبودی زخم در مطالعات متعددی گزارش شده است (۱۶). کرم کالاندولا آفیشینالیس به عنوان یک ماده بهبود دهنده زخم و آنتی سبتیک مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷). لذا با توجه به تأثیر سودمند این پماد در درمان بیماری‌های التهابی پوست و پیشرفت زخم‌ها، تصمیم گرفته شد با انجام این مطالعه تأثیر پماد کالاندولا آفیشینالیس را در درمان زخم‌های فشاری مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت کارآزمایی بالینی از نوع مقایسه قبل و بعد انجام شد. جامعه مورد بررسی بیماران مبتلا به زخم فشاری مراجعه کننده به کلینیک‌های مختلف مراکز آموزشی و درمانی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران یا بستری شده در مراکز فوق در سال ۱۳۸۶ بوده‌اند. با توجه به مطالعات مشابه قبلی (۹، ۴) در این زمینه و درمان بیماری زخم فشاری با روش‌های مختلف، تعداد ۲۰

بیمار به صورت تصادفی انتخاب شدند. معیار ورود به مطالعه بیمارانی بوده‌اند که دارای زخم فشاری مرحله ۱ تا ۳ بوده و قبلاً تحت درمان رایج (شستشوی زخم با محلول نرمال سالین و پانسمان استریل محل زخم) قرار داشته‌اند (گروه شاهد).

پماد کالاندولا از مجتمع صنایع دینه ایران تهیه شد. این پماد حاوی عصاره گل‌های گیاه کالاندولا آفیشینالیس بوده که به شکل پماد ۲ درصد فرموله شده است. استاندارد سازی این پماد بر اساس میزان فلاونوئید (روتین) بوده که در کارخانه مربوطه صورت پذیرفته است. هر ۱۰۰ گرم پماد حاوی 35 ± 5 میلی گرم روتین می‌باشد.

پس از تأیید طرح تحقیقاتی در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه، کسب معرفی نامه از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ارائه توضیحات لازم به بیماران و خانواده آنها و کسب اجازه و موافقت آنها برای مشارکت در مطالعه، بیماران وارد مطالعه شدند.

در بیماران انتخاب شده بر روی ناحیه زخم فشاری (پس از تمیز نمودن با محلول نرمال سالین و خشک نمودن زخم) پماد کالاندولا آفیشینالیس به صورت یک لایه نازک سه بار در روز مالیده شد (گروه مورد). معیارهای بهبودی عبارت بودند از کاهش قرمزی، تورم، درد، ترشح و اندازه زخم که در شروع مطالعه و هر هفته بررسی و اندازه گیری شد. بهبودی زخم توسط متخصص جراحی یا فوق تخصص ترمیمی هر هفته پس از مشاهده زخم بررسی شد. طول مدت درمان ۴ هفته بود. جمع‌آوری اطلاعات با مشاهده، مصاحبه و چک لیست انجام شد.

داده‌ها وارد نرم افزار آماری SPSS شده و با استفاده از آزمون‌های آماری Repeated measures ANOVA و Dunnett's multiple comparison test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها

در مجموع ۲۰ بیمار مبتلا به زخم فشاری تحت درمان با پماد کالاندولا آفیشینالیس قرار گرفتند. ۵۰ درصد بیماران زن و ۵۰ درصد بیماران مرد بوده‌اند. خصوصیات دموگرافیک بیماران، مدت بیماری، مدت زمان زخم و مکان بستری بودن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. محل زخم فشاری اکثر بیماران ۴۵ درصد ناحیه ساکرال بوده است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: خصوصیات دموگرافیک، مدت بیماری و داشتن زخم فشاری، زمان و درصد بهبودی

متغیر	میانگین $\pm$ انحراف معیار	محدوده
سن (سال)	$62/6 \pm 16/6$	۲۹-۸۰
وزن (کیلوگرم)	$67/4 \pm 11/9$	۵۰-۸۶
مدت بیماری (روز)	$61 \pm 58/4$	۱۸-۱۸۰
مدت زمان داشتن زخم (روز)	$22/4 \pm 10/2$	۱۴-۶۰

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی بیماران برحسب محل زخم

محل زخم	تعداد	درصد
ساکرال	۹	۴۵
ایسکیال	۲	۱۰
پا	۵	۲۵
شانه	۴	۲۰
جمع	۲۰	۱۰۰

۷۰ درصد بیماران تحت مطالعه دارای زخم فشاری مرحله ۲ بوده‌اند، ۸۰ درصد بیماران تحت مطالعه در بیمارستان بستری بوده‌اند و ۴۰ درصد بیماران با تشخیص سکته مغزی بستری بوده‌اند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی بیماران برحسب تشخیص پزشکی

تشخیص	تعداد	درصد
A.L.S	۱	۵
C.V.A	۸	۴۰
Coma	۲	۱۰
Paraplegia	۲	۱۰
Convulsion	۳	۱۵
R.D.S	۲	۱۰
H.T	۲	۱۰
جمع	۲۰	۱۰۰

وسعت زخم فشاری در روز اول قبل از شروع درمان، پایان هفته اول، دوم، سوم و چهارم (در خلال درمان) و همچنین درصد بهبودی در ۲۰ بیمار تحت بررسی در جدول شماره ۴ آورده شده است.

نتایج مطالعه نشان داد میانگین درصد بهبودی بیماران ۵۶/۶ درصد با انحراف معیار ۳۶/۸ و میانگین زمان بهبودی زخم ۳/۵ هفته با انحراف معیار ۱/۲ بوده است.

از نظر نوع بهبودی نتایج مطالعه نشان داد ۵۵ درصد بیماران بهبودی نسبی، ۳۵ درصد بهبودی کامل و ۱۰ درصد عدم بهبودی داشته‌اند.

آزمون Repeated measures ANOVA نشان داد پماد کالاندولا آفیشینالیس در بهبودی زخم فشاری مؤثر است ($P < 0/001$).

همچنین آزمون Dunnett نشان داد پماد کالاندولا آفیشینالیس در هفته‌های اول و دوم تأثیری بر بهبودی زخم فشاری نداشته است و در هفته‌های سوم و چهارم بهبودی زخم را سبب شده است و بیشترین درصد بهبودی در هفته چهارم اتفاق افتاده است.

جدول شماره ۴. وسعت زخم فشاری در روز اول قبل از شروع درمان، پایان هفته اول، دوم، سوم و چهارم در خلال درمان و درصد بهبودی در ۲۰ بیمار تحت بررسی.

کد بیمار	وسعت زخم در روز اول	وسعت زخم در پایان هفته اول*	وسعت زخم در پایان هفته دوم*	وسعت زخم در پایان هفته سوم*	وسعت زخم در پایان هفته چهارم*	درصد بهبودی زخم**
۱	۸	۸	۸	۷	۶	۲۵
۲	۹/۴	۹/۴	۹/۴	۷/۹	۶/۳	۳۳
۳	۸	۸	۸	۸	۸	۰
۴	۱۲/۶	۱۲/۶	۱۲/۶	۹/۴	۹/۴	۲۵
۵	۶	۴	۴	۲/۳	۰	۱۰۰
۶	۶/۳	۶/۳	۶/۳	۴/۷	۳/۱	۵۰
۷	۵	۵	۵	۵	۴/۳	۱۵
۸	۹	۹	۶/۳	۴	۳/۱	۶۵
۹	۹/۴	۹/۴	۳/۱	۱/۶	۰	۱۰۰
۱۰	۴/۷	۴/۷	۱/۸	۰	۰	۱۰۰
۱۱	۲۰	۲۰	۲۰	۱۰/۵	۹	۵۵
۱۲	۶/۳	۶/۳	۶/۳	۴/۷	۳/۱	۵۰
۱۳	۹	۹	۹	۶/۶	۴	۳۱
۱۴	۶/۳	۶/۳	۴/۷	۳/۱	۰	۱۰۰
۱۵	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۰
۱۶	۹/۴	۶/۳	۴/۷	۰	۰	۱۰۰
۱۷	۱۵	۱۵	۱۵	۹	۰	۱۰۰
۱۸	۱۲/۶	۱۲/۶	۹/۴	۴/۷	۰	۱۰۰
۱۹	۷	۷	۷	۵/۵	۳	۵۷
۲۰	۱۸/۸	۱۸/۸	۱۸/۸	۱۷/۳	۱۴/۲	۲۵

بحث

است (۲۰). در تحقیق حاضر نشان داده شد که پماد کالاندولا آفیشینالیس در هفته‌های اول و دوم تأثیری بر بهبودی زخم فشاری نداشته است ولی در هفته‌های سوم و چهارم موجب بهبودی زخم فشاری شده است. بیشترین درصد بهبودی در هفته چهارم اتفاق افتاده است. مطالعات نشان دادند که کرم کالاندولا بطور قابل ملاحظه ای موجب کاهش شیوع واکنش‌های پوستی درجه ۲ و ۳ در زنان مبتلا به سرطان پوستی شده (۲۱) و بطور موثر از وقوع درماتیت حاد درجه ۲ و بالاتر در بیماران مبتلا به سرطان سینه که بعد از عمل در معرض

کالاندولا آفیشینالیس به طور گسترده در طب سنتی در درمان مشکلات پوستی بکار می رود (۱۸). مطالعات اخیر این مساله را تایید می نمایند (۱۹). تحقیق حاضر نیز نشان داد که پماد کالاندولا آفیشینالیس در بهبودی زخم فشاری مؤثر است ($P < 0/001$). تأثیر پماد کالاندولا ۱۰ درصد در ۱۸ بیمار مبتلا به زخم تروفاک با پماد نئومایسین موضعی و پارافین (پلاسبو) مورد بررسی قرار گرفته است. تحقیق فوق نشان داد که پماد کالاندولا ضمن جلوگیری از عفونت ثانویه، موجب کاهش ۴۰ درصدی در قطر و حجم زخم در طول ۴ هفته شده

درمان زخمهای ضخیم در زمان بسیار کوتاه تری موجب کامل شدن اپی تلیال شده است (۲۰). بنظر می رسد این اثر بواسطه تسریع متابولیسم گلیکو پروتئین ها، نوکلئو پروتئین ها و پروتئین های کلاژن در بافت ها باشد (۳۱،۳۰). تاثیر مثبت پماد عصاره این گیاه تولید اپیتلیال زخم وریدی به اثبات رسیده است (۳۲). این تحقیق بر روی ۳۴ بیمار مبتلا به زخم وریدی صورت پذیرفته است. ۲۱ بیمار به مدت سه هفته روزانه دو بار پماد کالاندولا مصرف نمودند. روی ۱۳ بیمار نیز سالیان به مدت ۳ هفته به عنوان کنترل بکار رفت. پس از پایان هفته سوم، ۴۱/۷ درصد کاهش در سطح زخم در گروه تحت درمان رخ داد در صورتیکه در گروه کنترل تنها ۱۴/۵ درصد کاهش در سطح زخم ها مشاهده شد. کالاندولا در آلمان به منظور استفاده در درمان زخم های سخت درمان شونده به رسمیت شناخته شده است (۳۳). نظر به بهبودی کامل ۳۵ درصدی بیماران و بهبودی نسبی اکثریت بیماران ۵۵ درصد این پماد می تواند بعنوان داروی موثری در درمان زخم های فشاری مطرح گردد. بی خطر بودن عصاره هیدروالکلی این گیاه نیز تا ۵ g/kg در موش به اثبات رسیده (۳۴) لذا پس از استفاده زیاد و طولانی مدت آن (حدود ۴ هفته) مشکلی ایجاد نخواهد شد.

رادیوتراپی قرار گرفته اند جلوگیری نموده است (۲۲). تحقیق اخیر، در خلال ۳ سال بر روی ۲۵۴ بیماری که به علت سرطان سینه مورد عمل جراحی قرار گرفته و پس از عمل پرتو درمانی شده بودند انجام پذیرفت. ۱۲۸ بیمار بطور تصادف با ترولامین و ۱۲۶ بیمار با کالاندولا مورد درمان قرار گرفتند. شیوع درماتیت حاد با مصرف کالاندولا کمتر از ترولامین گزارش شده است (۴۱) درصد در مقابل ۶۳٪/p کمتر از ۰/۰۰۱). کالاندولا درد ناشی از پرتو درمانی را نیز کاهش داد. گزارشات متعددی نیز از فعالیت ضد التهابی گیاه وجود دارد. به نظر می رسد که فعالیت آنتی اکسیدانی خوب عصاره هیدرو الکلی کالاندولا، این اثر را توجیه نماید (۲۳). اثر ضد التهابی در موش ویستار البینو نیز با تست التهاب ایجاد شده توسط کاراژینان به اثبات رسیده است (۲۴). تری ترین های موجود در گل های این گیاه مهمترین اجزای ضد التهابی آنرا تشکیل می دهند (۲۵). برخی از این ترکیبات جداسازی شده و اثر ضد التهابی و ضد توموری آنها به اثبات رسیده است (۲۶، ۲۷). گزارشات متعددی از تاثیر این گیاه بر رشد مجدد و تولید اپیتلیال (بعنوان مثال بهبودی زخم) در حیوانات (۲۸) و انسان (۲۰، ۲۹) وجود دارد. در مطالعه انسانی، عصاره ۱۰ درصد اتانلی از کالاندولا افیشینالیس بطور قابل ملاحظه ای نسبت به کنترل موجب بهبود شده و در

References

1. Yarkoni GM. Pressure ulcers: a review arch Phys Med Rehabili 1994; 75(8),908-917.
2. Murphy L. Insurrection: Medical Commentary, Original Air Data:10 october, 2002, Http // Greenspun.com.
3. Revis D.R. Decubitus Ulcers cf: <http://www.Emedicine.com> Accessed Sep 12, 2008.
4. Avijgan M. Aloe Vera gel as an effective and cheap option for treatment in chronic bed sores. J Guilan Univ Med Sci 2004;50(13): 51-45(persian).

5. Tilus S. Under pressure weighed down by a high number of pressure ulcers care givers get a boost from a new initiative, Nurs Management 2001; 32(10):43-45.
6. Phips W, Cassmeyer, V, Sands, J. , & Lehman, M., Medical-surgical nursing, concepts and clinical practice. 5th ed., St. louis, Mosby: 1999.
7. Department of health human services (DHHS), medicare coverage Issues Manual, 2003;169, 25.
8. Phenytoin in cutaneous medicine: Its uses, mechanisms and side effects, Scheinfeld N. Dermat Online Journal, DOJ 9(3): 6, 2003, ef: <http://dermatology.cdlib.org/>
9. Holli Saz M.T, Khedmat H, Naseri M.H. Treatment of pressure sores in paraplegic patients by Hydrocolloid dressings, Phenytoin and simple dressings Kowsar Med J 2002; 1(7): 64-59(persian).
10. Niitsuma J, Yano H, Togawa T. Experimental study of decubitus ulcer formation in the rabbit earlobe. J Rahab R&D, 2003; 40 (1):67-72.
11. Fetemi E. Comparison between three methods in treatment of pressure ulcers. Kowsar Med J 1999; 3(4): 36-33.
12. <http://www.mprn.ir/> Accessed Sep 12, 2008.
13. Bekhradnia R. Novel phytotherapy. Motarjem Co., 1383.
14. Boucaud-maitre Y, Algernon O, Raynaud J, Cytotoxic and antitumoral activity of calendula officinalis extracts. Pharmazie 1988; 43 (3):220-221.
15. <http://www.naturalstandard.com> Accessed Sep 12, 2008.
16. <http://content.nhiondemand.com> Accessed Sep 12, 2008.
17. <http://www.answers.com>. Accessed Sep 12, 2008.
18. Basch E, Bent S, Foppa I, Haskmi S, Kroll D, Mele M, et al. an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. J Herb Pharmacother 2006; 6 (3-4):135-159.
19. Brown DJ, Dattner AM. Phytotherapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions, Arch Dermatol 1998; 134 (11): 1401-1404.
20. Matthew J. A Critical Review of Natural Therapies in Wound Management Ostomy. Wound Manage 2004; 50(2): 36-51.
21. McQuestion M. Evidence-Based Skin Care Management in Radiation Therapy Seminars in Oncology. Nurs 2006; 22(3): 163-173.
22. 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 2004; 22 (8): 1447-1453.
23. Herold A, Cremer L, Calugăru A, Tamaş V, Ionescu F, Manea S, et al. Antioxidant properties of some hydroalcoholic plant extracts with antiinflammatory activity. Roum Arch Microbiol Immunol 2003; 62(3-4): 217-27.

24. Shipochliev T, Dimitrov A, Aleksandrova E. Anti-inflammatory action of a group of plant extracts. *Vet Med Nauki* 1981;18(6): 87-94.
25. Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar St, Isaac O. The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Med* 1994; 60: 516 -520.
26. 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): 1692-1696.
27. Pérez-Carreón JI, Cruz-Jiménez G, Licea-Vega JA, Arce Popoca E, Fattel Fazenda S, Villa-Treviño S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol In Vitro* 2002; 16(3): 253-258.
28. Klouchek-Popova E, Popov A, Pavlova N, Krūsteva S. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1982; 8(4): 63-67.
29. Lavagna SM, Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmacol* 2001; 56(5-7): 451-453.
30. Patrick K, Kumar S, Edwardson P, Hutchinson J. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L, the European marigold. *Phytomedicine* 1996; 3(1): 11-18.
31. Brown D, Dattner A. Phytotherapeutic approaches to common dermatological conditions. *Arch Dermatol* 1998; 134(11): 1401-1404.
32. Duran V, Matic M, Jovanović M, Mimica N, Gajinov Z, Poljacki M, et al. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *Int J Tissue React* 2005; 27(3): 101-106.
33. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, (eds). *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Boston: Integ Med Commun 1998, p 100.
34. 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): 332-336.