KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 51, No. 3, pp. 243~247 (2019)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2019.51.3.243

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

식품소재화를 위한 *Calendula officinalis* L. 꽃잎의 항피부노화 기능성 규명 및 비효소적 연화 기술 연구

임석원[1,†] · 최성빈[2,†] · 이범주[2,3,†] · 김형섭[1] · 이다영[1] · 변상균[2,*]
[1]호서대학교 식품제약공학부 식품공학전공, [2]인천대학교 생명나노바이오공학과, [3](주)라피끄

Non-enzymatic softening of *Calendula officinalis* L. petals and its anti-skin aging effect for food materialization

Seokwon Lim[1,†], Sungbin Choi[2,†], Pomjoo Lee[2,3,†], Hyung-sup Kim[1], Da-young Lee[1], and Sanguine Byun[2,*]
[1]*School of food and pharmaceutical engineering, food engineering track, Hoseo University*
[2]*Department of Bioengineering and Nano-Bioengineering, Incheon National University*
[3]*RAFIQ Cosmetics Co., Ltd.*

Abstract Calendula (*Calendula officinalis* L.) petals are edible flowers which have been used as a decorative ingredient in dishes or as a medicinal food. In this study, the anti-skin aging potential of calendula petals was investigated. Additionally, the texture was softened by non-enzymatic methods to broaden their application as a food or cosmetic agent. Treatment of calendula prevented ultraviolet-induced matrix metalloproteinase-1 expression in skin cells. We investigated whether heating-based processing could soften calendula petals. The results from the punctual test demonstrated significant changes in the hardness of calendula petals depending on the pH, heating temperature, and time. Although there were minor differences among various processing conditions, the largest alteration in hardness was observed when the petals were softened by incubation at 80°C and pH 2.3 for 120 min. Collectively, these results show that the application of proper processing conditions can soften calendula petals without using enzymes.

Keywords: *Calendula officinalis* L., softening; hardness, anti-skin aging

서 론

피부는 가장 많이 노출되어 있는 기관이며, 자외선(ultraviolet light, UV)이나 미세먼지(particulate matter)를 포함한 외부적 환경 자극에 직접적으로 접촉한다(Fisher 등, 2002). UV는 과색소침착(Gilchrest 등, 1996), 암(Soehnge 등, 1997), 면역억제(Beissert과 Schwarz, 1999), 표피염증(Nicolaou 등, 2011), 광노화(Fisher 등, 1996)를 포함한 피부에 해로운 생리학적 변화를 일으킬 수 있다. UV는 파장에 따라서 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (200-280 nm) 세가지로 나눌 수 있다. UVC는 파장이 가장 짧기 때문에 가장 에너지를 많이 포함하고 있지만, 오존층에 의해 거의 흡수가 되기 때문에 지구의 표면에 도달하지 않는다고 할 수 있다. 이에 반해 UVA와 UVB는 UVC와 달리 오존층을 뚫고 지구 표면에 도달할 수 있다. 이 중에서 파장이 짧고 에너지가 높은 UVB가 UVA에 비해 피부에 더 많이 영향을 미치게 되고 그에 의해 광노화나 피부암이 유발되게 된다(Goihman-Yahr, 1996). 그렇기 때문에 UV에 의한 피부광노화 연구를 위해서는 UVB를 사용한 광노화 모델을 이용하는 것이 적합하다.

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 구성성분을 분해할 수 있는 효소이다(Stamenkovic, 2003). 이 중 MMP-1은 피부 진피의 주요 구성성분인 1형 콜라겐(type-1 collagen)과 3형 콜라겐(type-3 collagen)을 분해하는 효소이며, 이 효소에 의해 피부의 1형 콜라겐이 분해되게 되면 피부의 ECM이 무너지게 되고, 이로 인해 주름이 형성되게 된다(Chung, 2003). 이 MMP-1은 UVB에 의해 과발현될 수 있고, 그에 따라 피부광노화가 일어날 수 있게 된다. 그렇기 때문에 UVB에 의한 MMP-1의 발현을 억제하는 것은 주름 형성, 광노화를 막을 수 있는 방법이 될 수 있다(Brennan 등, 2003).

Calendula officinalis L. (카렌듈라)는 식품 및 전통 약초로 사용이 되어온 식용 꽃이다. 카렌듈라는 국화과의 한해살이풀로 햇빛이 잘드는 지역에서 자라는 꽃이며, 식용, 약용, 장식용으로 사용하기 위해서 재배한다. 카렌듈라는 메리골드(마리골드), 금송화, 금잔화, 마라빌라와 같은 다양한 이름으로 알려져 있고, 꽃 부분은 민간요법에서 많이 사용되어 왔다(Reuter 등, 2009). 꽃의 즙을 내거나 추출물 용액을 만들어 화상, 멍, 타박상, 자상, 발진, 피부 상처 등에 치료제로 사용되었다(Brown과 Dattner, 1998). 카렌듈라에는 스테로이드(steroids), 테르페노이드(terpenoids), 유리 트리터페닉 알코올(free triterpenic alcohols), 에스테르화 트리터페닉 알코올(esterified triterpenic alcohols), 페놀릭산(phenolic acids), 플라보노이드(flavonoids) 등의 화학 물질이 존재한다. 카렌듈라에

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Sanguine Byun, Department of Bioengineering and Nano-Bioengineering, Incheon National University, Incheon 22012, Korea
Tel: +82-32-835-8033
Fax: +82-32-835-0804
E-mail: sbyun@inu.ac.kr
Received May 30, 2019; revised June 7, 2019;
accepted June 7, 2019

존재하는 플라보노이드에는 퀘르세틴(quercetin), 루틴(rutin), 나르시신(narcissin), 이소람네틴(isorhamnetin), 캠퍼롤(kaempferol) 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Re 등, 2009). 연구를 통해 밝혀진 바에 따르면, 카렌듈라 추출물은 항염증(Alexandre 등, 2018), 상처 치료(Nicolaus 등, 2017), 항종양(Jimenez-Medina 등, 2006), 항산화(Katalinic 등, 2006) 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이렇게 다양한 효능을 가지고 있기 때문에 카렌듈라 꽃잎은 오래전부터 약용으로 사용되어 왔지만, 현대에는 독특한 향을 가지고 있는 카렌듈라 꽃잎을 이용해 차를 만들어 섭취하거나 비빔밥에 식용 및 장식용으로 사용되기도 하며, 건강기능성 영양제나 분말을 만들어 섭취하기도 한다.

본 연구에서는 현재 식용으로 사용되고 있는 카렌듈라 꽃잎을 연화시켜 꽃의 식품 적용범위를 넓히기 위한 실험을 진행하였다. 꽃을 연화시키게 되면 질감이 부드러워져 꽃 자체 섭취에 있어 거부감을 줄일 수 있고, 섭취하였을 때도 영양분의 흡수를 도와 기능성 발휘에 도움을 줄 수 있다(Eom 등, 2016). 또한 꽃잎의 질감 자체가 변하기 때문에 일반 꽃잎 자체로 사용하는 것보다 다양한 제형으로 만들어낼 수 있고, 그렇기 때문에 음료나 젤리와 같은 다양한 식품에 첨가할 수 있게 되며 다양한 방식으로 섭취할 수 있게 된다. 추가적으로 연화시킨 카렌듈라 꽃잎은 식품 외에도 화장품이나 연고 같은 곳에도 사용될 수 있다. 연화시켰기 때문에 일반 카렌듈라 꽃잎을 사용했을 때보다 흡수와 분해가 우수할 것이기 때문에 상처 치료나 항염증을 위한 연고나 항노화을 위한 화장품 등에 사용하면 기존의 카렌듈라 꽃잎보다 더 좋은 효과를 보일 수 있을 것이다. 본 연구에서는 카렌듈라 꽃잎의 피부 노화 억제 기능성을 평가하고 카렌듈라 꽃잎을 연화시키는 기술을 규명하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast, Hs68)는 ATCC (American Type Culture Collection, PCS-201-010, Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. 카렌듈라꽃은 프랑스산으로, Lessonia (Saint-Thonan, France)에서 구매하였다. 세포 독성 측정은 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega corporation, G8743, Madison, WI, USA)를 사용하였으며, MMP-1 단백질 발현 측정은 Human Total MMP-1 DuoSet ELISA kit (R&D systems, DY901, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

세포 배양

진피 섬유아세포는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1× P/S (penicillin/streptomycin)에 포함된 DMEM (dulbecco modified eagle medium) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 단층으로 배양되었다. 세포 배양은 10 cm culture dish에서 진행되었고, 세포 독성을 측정하기 위한 세포는 96 well plate에, MMP-1 단백질 발현을 측정하기 위한 세포는 6 well plate에 넣고 배양하였다.

카렌듈라 추출물

플라스크에 카렌듈라 10 g을 10배수의 증류수와 담고 70°C에서 열수 추출하였다. Whatman paper를 이용하여 여과 후 감압농축기(EYELA N1300, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C에서 농축하였다.

카렌듈라꽃 연화

여과수 제조 여과 장치를 이용하여 원수 안에 존재하는 부유물, 염소, 유기물, 무기질이온, 중금속이온을 제거하여 정제수를 만든다. 정제수에 유기산을 넣어 여러 조건으로 pH를 맞춘(pH 6.0, 2.5, 2.3, 2.1) 수용액을 만든다. 제조한 수용액에 카렌듈라 꽃잎을 넣어주고, 수용액에 교반시킨다. 교반시킨 수용액을 여러 온도(50, 70, 80, 90°C)와 처리시간(0, 30, 60, 90, 120 min)에 따른 다양한 열처리 조건에서 연화를 진행한다. 이렇게 연화가 완료된 꽃잎은 여과망을 이용해 정제수로 세척하여 실험에 사용하였다.

세포 독성 측정

96 well plate에서 배양한 세포가 90% 이상 차게 되면, FBS가 없는 serum-free한 DMEM으로 배지를 바꾸어 준다. 24시간 배양 후 카렌듈라 추출물을 100, 200, 400, 600, 800, 1,600, 2,400, 3,200, 4,000, 4,800, 5,600 μg/mL의 농도로 처리하고 48시간 배양한 후, 해당 well에 lysis solution을 처리하여 준다. 이후 30분 동안 추가로 배양하고 Celltox 용액(Celltox green dye+buffer)를 각 well 당 100 μL씩 처리하고 잘 섞어준 뒤에 빛이 없는 공간에서 상온 20분 배양시킨다. 이후 Varioskan LUX multimode microplate reader (Varioskan LUX, Thermo SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA)을 이용하여 형광을 측정한다.

MMP-1 단백질 측정

6 well plate에서 배양한 세포가 90% 이상 차게 되면, FBS가 없는 serum-free한 DMEM으로 바꾸어 준다. 24시간 배양 후 카렌듈라 추출물을 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 2400 μg/mL의 농도로 처리하고 1시간 동안 배양한다. 배양 후에 자외선 조사장치(Bio-Link BLX-312, Vilber Lourmat GmbH, France)를 이용하여 0.03 J/cm^{2}의 자외선을 조사하여 준다. 이후 48시간 동안 배양하고 상층액을 채취하여 10,000×*g*에서 2분간 원심분리 시킨 후 상층액만 다시 모아 −80°C에서 보관하여 시료로 사용하였다. 이후 명시된 protocol을 따라 Human Total MMP-1 DuoSet ELISA을 진행한다.

카렌듈라 꽃잎의 연화도 분석

우선 가공 처리되거나 처리되지 않은 카렌듈라 꽃잎들을 사각 쟁반 위에 한 개씩 피고 plastic film으로 쟁반을 둘러 매우 짧게 건조시켜 평가 분석할 시료들을 준비하였다. 준비된 시료는 texture analyzer (TA.XT Express, Stable micro systems, Surrey, UK)를 이용한 puncture test로 hardness를 측정함으로써 연화 수준을 비교분석 하였다. Probe (No. P/2, ϕ 2 mm)를 이용하였고, 검사 방법은 test speed 1.0 mm/sec로 설정하여 시험을 진행하였다. 꽃잎이 겹치는 부분없이 최대한 펼친 다음 꽃잎의 가운데 부분 측정하였다. 크기와 모양이 유사한 시료들을 가공처리 방법 당 10개씩 선발하여 그 질감 특성을 시험 평가하였으며, 이와 같은 시료 선발 및 평가를 3회 반복 실시하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 결과분석은 GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Softwater, CA, USA)를 이용하여 통계 처리하였다. 통계적 유의성은 일원배치분산분석(one way ANOVA)로 유의성 검정을 시행하였으며($p<0.05$), 사후검증으로 Duncan's multiple range test를 수행하였다.

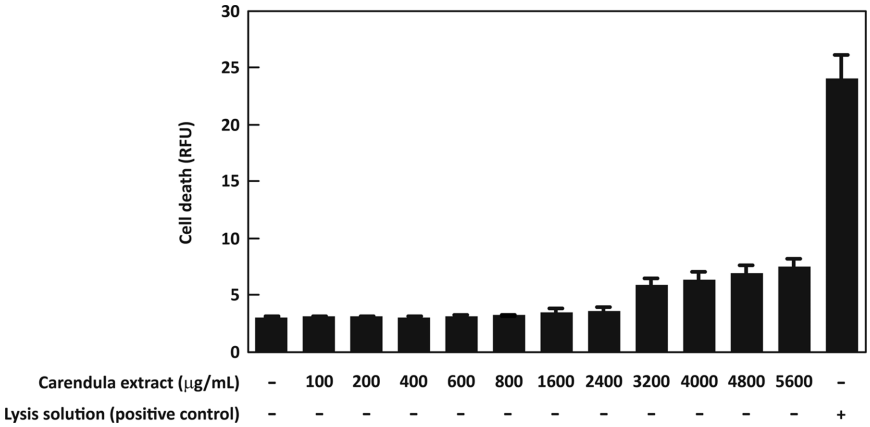

Fig. 1. Effect of calendula extract on cell viability of Hs68 human dermal fibroblasts. Cells were treated with the extract at the indicated concentrations and analyzed for cell death. Lysis solution provided by the manufacturer was used as a positive control for cell death.

결과 및 고찰

카렌듈라 추출물의 Hs68 세포 독성 측정

본 연구에서는 카렌듈라 추출물의 피부광노화 효과를 측정하기 위해서 다양한 종류의 세포 중에서 인간 피부 섬유아세포 Hs68을 선정하였고, 우선적으로 세포 독성을 측정하였다. 카렌듈라 추출물이 Hs68 세포에 있어서 어느 농도에서부터 세포 독성을 보이는지 측정하기 위해서 Hs68 세포를 96 well plate에 넣고 배양하였다. 이후 5,600 μg/mL을 최고 농도로 하여 순차 희석한 후 해당 well에 직접 처리하고 배양하였다. Hs68 세포에서 카렌듈라 추출물의 세포 독성은 CellTox™ Green Cytotoxicity Assay를 통해 측정하였다. 2,400 μg/mL의 농도까지는 독성이 없고, 3200 μg/mL의 농도에서부터 독성이 있었다. 대조군 그룹이 3.033의 형광값을 보였고, 카렌듈라 추출물을 100, 200, 400, 600, 800, 1,600, 2,400, 3,200, 4,000, 4,800, 5,600 μg/mL의 농도로 처리하였을 때에는 3.076, 3.075, 3.054, 3.104, 3.206, 6.535, 3.586, 6.689, 6.932, 7.127, 7.324의 형광값을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 독성이 없는 2,400 μg/mL의 농도까지 이후의 실험에서 사용하였다.

카렌듈라 추출물의 MMP-1 단백질 발현 억제 효과 측정

선행된 실험에서 카렌듈라 추출물은 2,400 μg/mL의 농도까지 독성이 없다는 것을 확인하였다. 이후에 실제로 카렌듈라 추출물이 MMP-1 단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해서 Hs68 세포를 6 well plate에 넣고 배양하였다. 이후 2,400 μg/mL을 최고 농도로 하여 1/2씩 순차 희석한 후 배양 중인 세포에 직접 처리하고 UVB를 조사하였다. 48시간 배양하고 상층액을 따서 human total MMP-1 ELISA 실험을 진행하여 준 결과, 대조군 그룹에서 7,246 pg/mL의 농도였던 MMP-1 단백질이 UVB를 처리하여 주면 42,147 pg/mL로 증가한 것을 확인할 수 있었다. UVB가 조사된 상태에서 카렌듈라 추출물을 처리할 경우, 카렌듈라 추출물의 농도 비례적으로 MMP-1 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 카렌듈라 추출물을 50, 100, 200, 400, 800, 1,600, 2,400 μg/mL의 농도로 처리하여 주면 MMP-1 단백질의 농도가 38,540, 35,593, 32,687, 21,020, 18,404, 13,953, 11,586 pg/mL로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이를 통해 카렌듈라 추출물은 피부 세포에서 UVB에 의해 유도되는 MMP-1 단백질의 과발현을 억제할 수 있고, 그렇기 때문에 UVB에 의한 피부광노화를 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

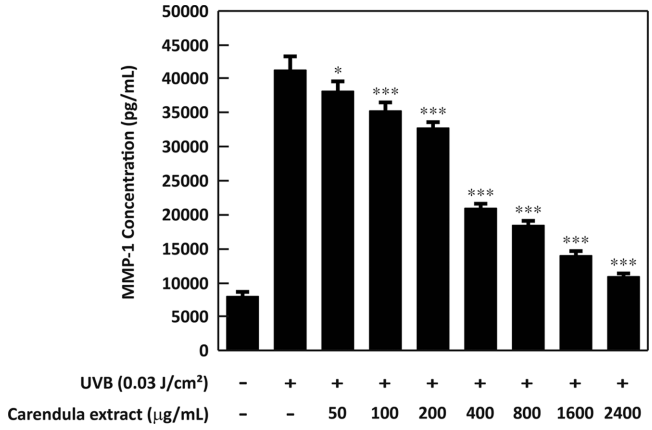

Fig. 2. Effect of calendula extract on MMP-1 production. Media was collected 48 h after UVB irradiation. Samples were treated 1 h prior to UVB irradiation. *p<0.05; ***p<0.001, significant differences between UVB only and UVB and sample treated groups.

가열 산처리 복합 연화 가공에 따른 카렌듈라 꽃잎 연화 수준 비교 분석

가열공정과 산처리공정을 동시에 진행하는 복합공정에 의해 카렌듈라 꽃잎의 연화가 어느정도 진행되었는지 비교분석하기 위해 texture analyzer를 이용하여 punctual test를 진행하였다. 직경 2 mm 원통형 probe를 이용하여 연화가공 처리된 카렌듈라 꽃잎 중앙을 관통하면서 발생하는 texture profile을 비교 분석하였다(Fig. 3). 연화 정도를 비교하기 위한 실험 조건을 얻고자 연화된 꽃잎 시료들의 hardness 차이를 가장 크게 나타내는 시험 조건을 예비실험들을 통해 탐색하여 puncture test의 실험 조건으로 결정하였다.

연화처리 공정으로 연화된 꽃잎의 texture profile을 처리하지 않은 시료와 비교분석한 결과, 연화처리한 모든 시료들이 연화처리하지 않은 시료(2.37±0.27 N)에 비해 hardness가 70% 이상 감소되었다. 연화처리 하지않은 시료의 경우 누르는 힘에 대한 높은 저항력으로 뾰족한 형태의 peak를 나타났으며 상대적으로 높은 hardness 값을 나타내었다(Fig. 3A). 반면 50, 70, 90°C의 온도, pH 2.5, 2.3, 2.1에서 30, 60, 90, 120분 동안 연화처리한 모든 시료에서는 비교적 완만한 형태의 peak를 보였고, 약 0.9 N 이하의 낮은 hardness 값을 확인할 수 있었다(Fig 3B). 단단한 물질일수

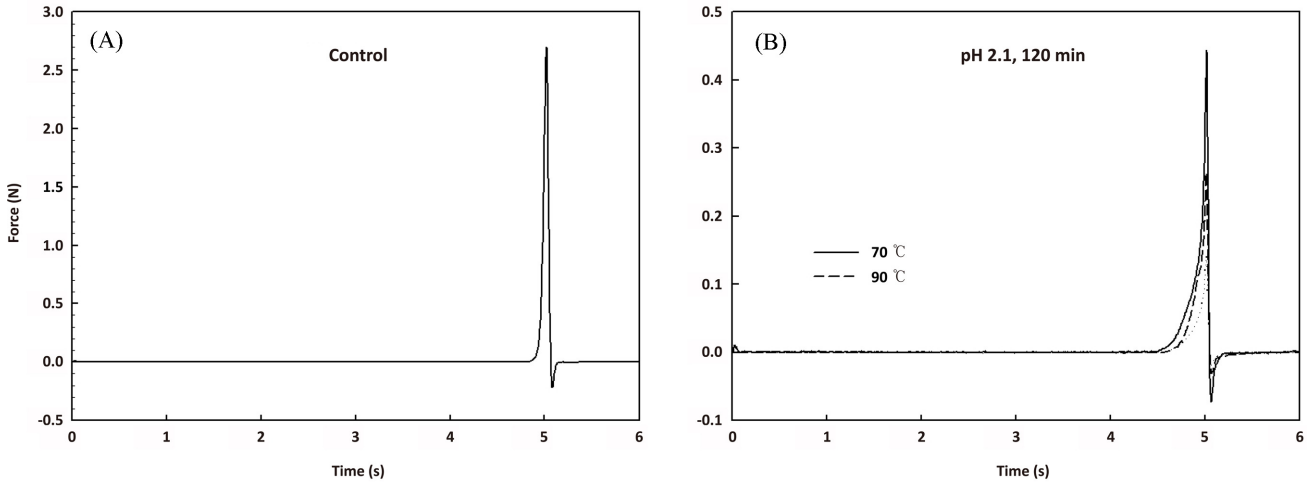

Fig. 3. Profiles of punctual test. Texture profile of untreated petals (A) and that of a soften petals via processed at 70 and 90°C, and pH 2.1 for 120 min (B)

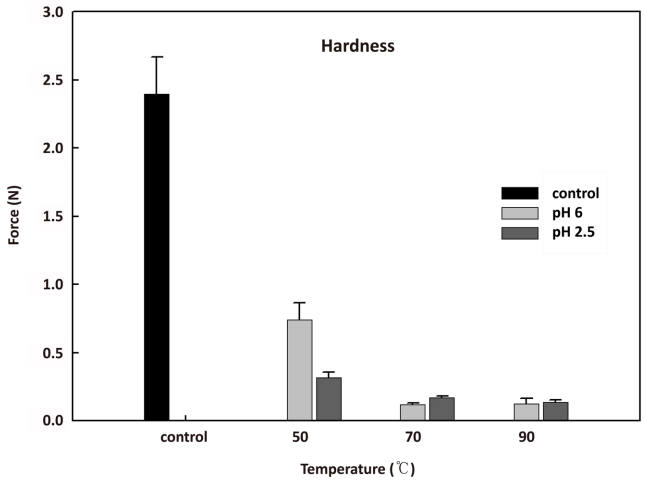

Fig. 4. Comparison of hardness upon softening conditions. Petals were subjected under various conditions as indicated for 30 min of process time with same letters are not significantly different at $p<0.001$.

록 texture profile에서 peak이 매우 가파르게 상승하고 급격히 떨어지는 모양을 나타나는 것을 고려할 때, 연화 전리 전후에서 관찰할 수 있는 peak 모양의 변화는 연화로 인한 결과로 판단되었다.

관찰된 연화처리 결과는 연화처리 공정 조건에 따라 달라지는 것이 관찰되었다. 우선 연화도에 따라 hardness 값의 차이가 나타났으며, peak의 아래부분이 넓어지며 완만히 상승하는 모습을 나타냈다. 이에 공정 온도, 처리시간, pH로 선정된 연화 공정 변수들의 연화도에 대한 영향력을 hardness 값의 비교함으로써 분석하였다(Fig. 4). 열처리와 산처리 모두 연화도에 대한 영향이 큰 것으로 나타났으나, 공정시간은 주요변수로 작용하지 않았다. 온도와 pH의 영향 정도를 30분의 공정 처리 시간의 기준으로 비교 분석하였을 때, 50°C의 상대적으로 낮은 온도에서 산처리 하지 않은 시료의 경우(0.73±0.13 N)에도 70% 정도의 hardness의 감소가 나타났으며, pH 2.5에서 0.32±0.04 N, pH 2.3에서 0.20±0.02 N, 그리고 pH 2.1에서 0.15±0.39 N로 조사되어 낮은 pH에서 더 큰 hardness의 감소가 관찰되었다. 하지만 50°C의 온도에서도 처리시간이 60분을 넘어가면 산처리 여부에 따른 hardness 차이만 나타날 뿐 pH의 차이에 따른 영향은 나타나지 않았으며, 약 0.1 N 정도로 hardness가 감소되었다. 연화 처리온도 70°C 이상의 일 경우에는 산처리 여부나 pH에 의한 영향 없이 모두 0.1 N 정도로 hardness가 감소되는 것으로 조사되었다. 따라서 70°C 이상의 온도에서 연화처리를 할 경우에는 산처리여부와 상관없이 충분한 연화도를 얻을 수 있는 반면, 50°C 이하의 낮은 온도에서 처리할 경우에는 pH 2.5 이하의 산성조건에서도 60분 이상 처리를 필요로 함을 알 수 있었다. 즉 높은 온도의 연화공정은 빠른 공정처리가 가능한 반면, 열처리 없이 또는 낮은 열처리 조건에서의 산처리의 경우 pH에 매우 민감하여, 60분 이상의 공정시간이 요구됨을 알 수 있었다.

요 약

UVB에 의한 MMP-1의 과발현이 카렌듈라 꽃잎을 처리하여 주면 농도의존적으로 감소하였다. 이를 통해 연화시킨 카렌듈라 꽃잎이 UVB에 의한 피부의 광노화를 억제시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 가열과 산처리의 복합처리를 통한 카렌듈라 꽃잎의 연화에서 처리시간, 온도, pH에 따른 연화 수준을 punctual test를 통해 비교 분석하였다. Hardness 값의 비료 분석을 통해 연화특성 및 효과가 처리 조건들에 의해 다름을 확인할 수 있었으며, 70°C 이상의 높은 온도에 의한 연화효과가 산처리에 의한 효과보다 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 하지만 열처리에 의한 연화의 경우 에너지 소비가 큰 것을 고려할 때, pH 2.1에서는 50°C, 30분의 열처리만으로도 70°C 이상의 열처리 효과가 나타나므로, 이 연화처리 조건이 경제적으로 가장 효율적이라 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 신진연구사업(NRF-2017R1C1B1006072)과 농업기술평가원 고부가가치식품 개발사업(118059-02)의 지원에 의하여 수행되었음.

References

Alexandre JTM, Sousa LHT, Lisboa MRP, Furlaneto FAC, do Val DR, Marques M, Vasconcelos HC, de Melo IM, Leitão R, Castro

Brito GA, Goes P. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of Calendula officinalis on inflammatory bone loss in rats. Clin. Oral Investig. 22: 2175-2185 (2018)

Beissert S, Schwarz T. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 4: 61-64 (1999)

Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. Photochem. Photobiol. 78: 43-48 (2003)

Brown DJ, Dattner AM. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. Arch. Dermatol. 134: 1401-1404 (1998)

Chung JH. Photoaging in Asians. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 19: 109-121 (2003)

Eom SH, Chun YG, Park CE, Kim BK, Lee SH, Park DJ. Application of freeze-thaw enzyme impregnation to produce softened root vegetable foods for elderly consumers. J. Texture Stud. 49: 404-414 (2016)

Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. Nature. 379: 335-339 (1996)

Fisher GJ, Kang S, Varani J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch. Derm. 138: 1462-1470 (2002)

Gilchrest BA, Park HY, Eller MS. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. Photochem. Photobiol. 63: 1-10 (1996)

Goihman-Yahr M. Skin aging and photoaging: an outlook. Clin. Dermatol. 14: 153-160 (1996)

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 6: 119 (2006)

Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94: 550-557 (2006)

Nicolaou A, Pilkington SM, Rhodes LE. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. Chem. Phys. Lipids 164:535-543 (2011)

Nicolaus C, Junghanns S, Hartmann A, Murillo R, Ganzera M, Merfort I. *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of Calendula officinalis extracts. J. Ethnopharmacol. 196: 94-103 (2017)

Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy HN. Mechanisms of induction of skin cancer by uv radiation. Front. Biosci. 2: 538-551 (1997)

Re TA, Mooney D, Antignac E, Dufour E, Bark I, Srinivasan V, Nohynek G. Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (Calendula officinalis) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. Food Chem. Toxicol. 47: 1246-1254 (2009)

Reuter J, Merfort I, Seelinger G, Wölfle U, Schempp CM. Botanicals in dermatology and skin health. Botanical Medicine 3: 33-65 (2009)

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. J. Pathol. 200: 448-464 (2003)