



Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar

E.J.R. Silva¹, F.J.S. Aguiar², E.S. Gonçalves¹, I.M.V. Sousa², G.S. Dimech², M.C.C.A. Fraga², M.C.O.C. Coelho³, Almir G. Wanderley^{1,2*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil,

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil,

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil

RESUMO: Os efeitos da administração oral subcrônica do extrato hidroalcoólico (EHA) preparado de flores de *Calendula officinalis* L. foram investigados sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratas Wistar adultas. Quarenta ratas (n=10/grupo) foram tratadas durante 30 dias consecutivos com EHA por via oral nas doses de 0,25, 0,5, e 1,0 g/kg de peso e, em seguida, determinados os perfis bioquímico e hematológico e a massa dos órgãos. 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 uréia 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. Dessa forma, a administração subcrônica do extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados em ratas Wistar adultas. Entretanto, o aumento dos níveis séricos de uréia e alanina aminotransferase (ALT) em doses elevadas sugere sobrecargas renal e hepática, respectivamente, as quais devem ser investigadas em maiores detalhes.

Unitermos: *Calendula officinalis*, Asteraceae, tratamento subcrônico, hematologia, bioquímica.

ABSTRACT: "Evaluation of the hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis* L. on biochemical and hematological parameters in female Wistar rats". The effects of the subchronic oral administration of the hydroalcoholic extract (HAE) prepared from flowers of *Calendula officinalis* L. were investigated on biochemical and hematological parameters in female adult Wistar rats. Forty female rats (n=10/group) were orally treated daily for 30 days with HAE at the doses of 0.25, 0.5, and 1.0 g/kg body weight and the biochemical and hematological parameters and organ weight evaluated. The treatment did not cause any deaths or toxicity in the animals. The administration of HAE failed to change biochemical and hematological parameters and organ weight, except for an increase of 24.2% in blood urea nitrogen and 62.3, 30.2, and 44.4%, respectively, in alanine transaminase (ALT) plasma level. For the hematological parameters, there were slight changes in which neutrophil, lymphocyte and monocyte counts were not different from the reference values. In conclusion, the subchronic administration of HAE of *Calendula officinalis* did not induce any hazardous effects on most of the biochemical and hematological parameters studied in female adult Wistar rats. However, the increase in the levels in blood urea nitrogen and ALT in high doses, suggests a possible renal and hepatic overload which should be investigated in more detail.

Keywords: *Calendula officinalis*, Asteraceae, subchronic treatment, hematology, biochemistry.

INTRODUÇÃO

Calendula officinalis (Asteraceae) é uma herbácea anual originária da região mediterrânea, amplamente cultivada em várias partes do mundo para fins ornamentais, cosméticos e medicinais (Ramos et al.,

1998). No Brasil, a espécie é popularmente conhecida como Calêndula, Calêndula-hortense, Maravilha-dos-jardins, Malmequer ou Verrucária.

Formas galênicas preparadas a partir dos extratos das flores de *C. officinalis* são amplamente utilizadas como antiinflamatórias e cicatrizantes em doses que variam entre

1,0 a 2,0 g de flor seca por 150 mL de água ou 8,8 a 17,6 mg de flavonóides (Scheffer, 1979; Blumenthal, 1998; Brasil, 2004). Estudo fitoquímico realizado com as flores e os receptáculos de calêndula confirmaram a presença de um amplo espectro de compostos químicos, sobretudo das classes dos flavonóides, terpenos e carotenóides (Valdéz; García, 1999). Os triterpenos, sobretudo os monoésteres de faradiol, têm sido relatados como os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória da planta (Della-Loggia et al., 1994; Akihisa et al., 1996).

Em nossa revisão, verificamos que a calêndula se encontra entre as plantas mais utilizadas para fins medicinais. Entretanto, detectamos poucos estudos (Manolov; Boyadzhiev; Ikolov, 1964; Morelli et al., 1983; Avramova et al., 1988) sobre a segurança do seu uso na forma de extrato hidroalcoólico (EHA). Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da administração subcrônica do seu EHA sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas, além de seu efeito sobre a massa de algumas vísceras.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, *Rattus norvegicus* var. *albinus* com 3 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal Pernambuco. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2 °C). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal Pernambuco (Processo n° 23076.0011236/2003-44).

Material botânico

O material botânico utilizado foi constituído por EHA das flores secas de *Calendula officinalis*, produzido e fornecido pelo Laboratório Simões - RJ, Brasil (lote n° 02.001). Em nosso laboratório, o EHA foi concentrado até secura em rotaevaporador sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico. Em seguida, o material foi ressuspenso em água destilada com concentração final variando entre 350 e 450 mg/mL. O material foi, então, dividido em alíquotas e conservado a -20 °C até sua utilização.

Tratamento dos animais

Quarenta ratas correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratadas durante 30 dias consecutivos, por via oral, com EHA nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 g/kg (grupos tratados) ou água destilada (grupo controle). Durante o tratamento, a massa corporal dos animais foi registrada semanalmente e os animais avaliados quanto

a sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e ração. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 12h e anestesiados com éter. Em seguida, procedeu-se à coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (Waynforth, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante HB (Laborlab®) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetros bioquímicos

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais, albumina e globulina. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Cobas Mira (Roche) com sistemas comerciais da Boehringer Ingelheim®.

Parâmetros hematológicos

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas.

Análise morfológica macroscópica

Após a coleta do sangue, procedeu-se a eutanásia por aprofundamento da anestesia etérea seguida de necrópsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. Cérebro, coração, fígado, rim, glândula adrenal, baço, útero e ovário foram cuidadosamente removidos, dissecados e tiveram sua massa úmida determinada em balança analítica de precisão Gehaka modelo BG 440, a qual foi expressa em termos de massa relativa g/100g (Vijayalakshmi; Muthulakshmi; Sachdanandam, 2000).

Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm). As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre \geq a 5 %.

RESULTADOS

O ganho de massa corporal das ratas dos grupos controle e tratados é mostrado na Figura 1. O EHA não alterou de forma significativa o ganho de massa dos animais. Durante o tratamento, não observou-se sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada. Não houve alteração no consumo de água e ração.

O tratamento subcrônico com EHA nas ratas, de forma geral, não induziu modificações no perfil bioquímico (Tabela 1). Todos os parâmetros mantiveram-se dentro da faixa de referência (Harkness; Wagner, 1993), exceto para o valor da uréia no grupo tratado com a maior dose, o qual aumentou significativamente, com aumento de $24,2 \pm 2,8$ % do valor basal, ($p < 0,05$, $n=10$), assim como a ALT que aumentou, respectivamente, em $62,3 \pm 3,8$, $30,2 \pm 4,0$ e $44,4 \pm 3,1$ % ($p < 0,05$, $n=10$), nos diferentes grupos tratados em relação ao grupo controle (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a administração oral por 30 dias do EHA preparado de flores de *Calendula officinalis*, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em ratas Wistar adultas, pois durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. Em adição, a atividade geral das fêmeas não foi alterada, assim como seu consumo de ração e água.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (Jahn; Günzel, 1997). O EHA não alterou o ganho de massa corporal das ratas, mesmo em doses diárias de cerca de 10, 20 e 40 vezes maiores do que a usual para o tratamento de processo inflamatório ou como cicatrizante. Os resultados estão de acordo com estudos realizados em camundongos com os extratos aquoso (Manolov; Boyadzhiev; Ikolov, 1964) e etilenoglicólico de flores de *Calendula officinalis*

Tabela 1. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de flores de *Calendula officinalis* (0,25, 0,5 e 1,0 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratas Wistar adultas, tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHA 0,25 g/kg	EHA 0,5 g/kg	EHA 1,0 g/kg
Glicose (mg/dL)	69,1 ± 1,1	69,2 ± 4,0	79,0 ± 3,6	73,8 ± 3,9
Uréia (mg/dL)	41,4 ± 2,3	47,3 ± 1,2	46,2 ± 1,7	51,2 ± 1,6*
Creatinina (mg/dL)	0,50 ± 0,06	0,64 ± 0,04	0,58 ± 0,03	0,62 ± 0,02
Aspartato aminotransferase (U/L)	177,8 ± 13,2	209,5 ± 16,3	153,4 ± 12,9	160,8 ± 4,6
Alanina-aminotransferase (U/L)	45,1 ± 3,0	72,8 ± 3,1*	58,6 ± 3,3*	64,8 ± 2,7*
Colesterol total (mg/dL)	68,6 ± 5,4	74,8 ± 6,7	78,6 ± 9,9	76,2 ± 5,1
Triglicerídeos (mg/dL)	81,8 ± 11,4	64,8 ± 7,4	84,6 ± 8,2	92,5 ± 4,5
Fosfatase alcalina (U/L)	57,6 ± 3,8	79,5 ± 14,0	56,6 ± 6,9	81,8 ± 6,4
Bilirrubina total (mg/dL)	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,02
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Proteínas totais (g/dL)	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2	8,1 ± 0,1
Albumina (g/dL)	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,04	1,8 ± 0,03
Globulina (g/dL)	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,1	6,2 ± 0,2	6,4 ± 0,2

Os valores representam a média ± e.p.m. de 10 dosagens obtidos em aparelho automático Cobas Mira (Roche) com kits da Boehringer Ingelheim®.

* Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

De maneira semelhante, observou-se que o tratamento oral dos animais com EHA não alterou significativamente o perfil hematológico (Tabela 2), embora flutuações na contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos foram registrados.

A análise macroscópica externa das vísceras não revelou nenhuma alteração, assim como para a massa relativa dos tecidos (Tabela 3).

(Russo, 1972) e em ratos com a saponina terpênica, calendulosídeo B (Iatsyno et al., 1978), os quais também não demonstraram sinais de toxicidade.

De fato, resultados do nosso laboratório (dados não apresentados) mostram que o EHA em doses de até 5,0 g/kg por via oral não produziram morte em ratos ou camundongos de ambos os sexos, por um período de observação de até 14 dias.

Embora de um modo geral o perfil bioquímico dos animais estivesse dentro dos valores de referência

Tabela 2. Efeito do extrato hidroalcoólico de flores de *Calendula officinalis* (0,25, 0,5 e 1,0 g/kg), administrados por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos, tratadas por 30 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	EHA 0,25g/kg	EHA 0,5g/kg	EHA 1,0g/kg
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,2	7,8 ± 0,2	7,8 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	14,8 ± 0,2	15,4 ± 0,1	15,3 ± 0,3	15,6 ± 0,3
Hematócrito (%)	41,2 ± 0,8	42,3 ± 0,4	42,3 ± 1,3	42,6 ± 0,9
VCM (fL)	54,0 ± 0,6	56,0 ± 0,7	53,9 ± 1,3	54,8 ± 0,6
HCM (pg)	19,4 ± 0,2	20,4 ± 0,3	19,6 ± 0,5	20,1 ± 0,2
CHCM (g/dL)	35,8 ± 0,3	36,3 ± 0,1	36,2 ± 0,5	36,7 ± 0,1
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	933,88 ± 27,60	938,60 ± 26,82	936,60 ± 32,55	954,50 ± 39,40
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,7 ± 0,2	7,2 ± 0,9	6,2 ± 0,6	8,4 ± 0,5
Bastonetes (%)	0	0	0	0
Neutrófilos (%)	22,3 ± 2,2	11,0 ± 1,3*	26,6 ± 1,8	16,8 ± 1,9*
Eosinófilos (%)	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0	1,5 ± 0,3
Basófilos (%)	0,22 ± 0,13	0,40 ± 0,22	0,20 ± 0,17	0,50 ± 0,3
Linfócitos (%)	69,3 ± 1,9	85,2 ± 1,6*	69,2 ± 2,2	79,3 ± 2,4*
Monócitos (%)	6,6 ± 0,6	2,6 ± 0,4*	2,8 ± 0,8*	2,0 ± 0,5*

Os valores representam a média ± e.p.m. de 10 animais obtidos em aparelho Coulter, modelo STKS. VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sobre extensões sanguíneas coradas com May-Grünwald-Giemsa, onde 100 células foram analisadas para cada experimento.

* Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

(Harkness; Wagner, 1993), houve exceções para a uréia e ALT. A alteração significativa verificada nos níveis plasmáticos de uréia apenas no grupo tratado com a maior dose pode ser inicialmente interpretada como uma alteração renal. A elevação nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (Vijayalakshmi; Muthulakshmi; Sachdanandam, 2000; Adebayo et al., 2003).

As análises das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (Martin; Mayes; Rodwell, 1981). Uma droga não provoca dano algum no fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas (Vijayalakshmi; Muthulakshmi; Sachdanandam, 2000). A fosfatase alcalina é um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático (Wright; Plummer, 1974) e muitas vezes é usada para avaliar a integridade da membrana (Akanji; Olagoke; Oloyede, 1993). O aumento nos níveis plasmáticos de ALT observado neste estudo, além de ser estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, ficou acima dos níveis de referência para a espécie, que se situam entre 21-52 UI/l, segundo Coimbra et al. (1995). Estes dados fornecem indícios

de alterações na função hepática, pois segundo Kaneko, Harvey, Bruss (1997) os níveis séricos de ALT aumentam quando ocorrem alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos. A AST tem uma isoenzima mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é essencialmente citoplasmática. Isto pode justificar o fato de ter-se registrado alterações significativas apenas nos níveis de ALT. Além disso, a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade aguda do que a AST, pois enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em concentrações elevadas em outros órgãos, como rins, pulmões e coração (Al-Habori et al., 2002).

Quanto ao estudo hematológico, nenhuma alteração dos parâmetros analisados foi observado. A contagem diferencial de neutrófilos, linfócitos e monócitos revelou, embora, dentro dos limites de referência (Harkness; Wagner, 1993), pequenas flutuações, porém sem indicativo de importância clínica.

Baseados nos resultados obtidos, conclui-se que a administração subcrônica do EHA preparado de flores de *Calendula officinalis* não produz efeitos tóxicos sobre a maioria dos parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados em ratos Wistar adultos. Entretanto, o aumento dos níveis séricos de uréia e ALT em concentrações

Tabela 3. Efeito do extrato hidroalcoólico de flores de *Calendula officinalis* (0,25, 0,5 e 1,0 g/kg), administrados por via oral a ratas Wistar adultas sobre a massa dos órgãos (g/100 g), tratadas por 30 dias consecutivos.

Órgãos	Controle	EHA 0,25g/kg	EHA 0,5g/kg	EHA 1,0g/kg
Coração	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Fígado	3,04 ± 0,08	3,48 ± 0,15	3,31 ± 0,64	3,46 ± 0,14
Baço	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Rim	0,30 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Cérebro	0,53 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,02
Pulmão	0,53 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,07
Adrenal	0,013 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,015 ± 0,001
Útero	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Ovário	0,026 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,024 ± 0,002	0,025 ± 0,002

Os valores estão expressos em termos de massa relativa g/100 g e representam a média ± e.p.m. de 10 animais.

As vísceras foram cuidadosamente removidas após a eutanásia por aprofundamento de anestesia etérea. Em seguida, dissecadas e determinada suas massas úmidas em balança analítica, Gehaka modelo BG 440.

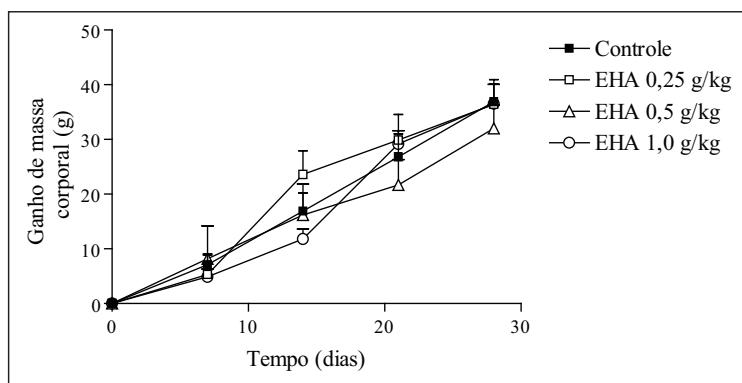


Figura 1. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) preparado das flores de *Calendula officinalis* (0,25 a 1,0 g/kg), sobre o ganho de massa corporal administrado por via oral a ratas Wistar adultas, por 30 dias consecutivos. Os valores representam a média ± e.p.m. (n=10/grupo).

elevadas apontam para uma possível sobrecarga renal e hepática, respectivamente, as quais devem ser investigadas mais detalhadamente.

AGRADECIMENTOS

A CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro; ao Laboratório Simões-RJ, por ceder gentilmente o extrato hidroalcoólico, e a Rejane Ferreira da Silva, pelo valioso apoio técnico.

REFERÊNCIAS

Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB Enaibe BU 2003. Effect of ethanolic extract of *Khaya*

senegalensis on some biochemical parameters of rat kidney. *J Ethnopharmacol* 88: 69-72.

Akanji MA, Olagoke OA, Oloyede, OB 1993. Effect of chronic consumption of metabisulphite the integrity of the kidney cellular system. *Toxicology* 81: 173-179.

Akihisa T, Yasukawa K, Uma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T 1996. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* 43: 1255-1260.

Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol* 83: 209-217.

Avramova S, Portarska F, Apostolova B, Petkova S, Konteva M, Tsekova M, Kapitanova T, Maneva K 1988. Marigold

- (*Calendula officinalis* L.) Source of new products for the cosmetic industry. *Medical Biological Information* 4: 28-32.
- Blumenthal M 1998. *The complete German commission E monographs*. Austin, Texas: American Botanical Council.
- Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 89, de 16/03/2004 – Dispõe sobre o registro de fitoterápicos simplificado. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, de 18 de março.
- Coimbra IKS, Kosemjakin DA, Diniz JMF, Círio SM, Leite LC 1995. Perfil bioquímico sérico de provas funcionais hepática e renal após intoxicação experimental com extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* L. em ratos albinos (*Rattus norvegicus*). *Rev Bras Toxicol* 8: 258.
- Della-Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar St, Isaac O 1994. The role of triterpenoids in the anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med* 60: 516-520.
- Harkness SE, Wagner JE 1993. *Biologia e clínica de coelhos roedores*. São Paulo: Livraria Roca.
- Iatsyno AI, Belova LF, Lipkina GS, Sokolov SYA, Trutneva EA 1978. Pharmacology of Calendulose B – A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. *Farmakologiya i toksikologiya* 41: 550-560.
- Jahn AI, Günzel PKH 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol* 11: 171-178.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*, San Diego: Academic Press.
- Manolov P, Boyadzhiev T, Ikolov P 1964. Antitumorigenic effect of *Calendula officinalis* on crocker sarcoma 180. *Eksperimentalna meditsina i morfologiya* 3: 41-45.
- Martin DW, Mayes PA, Rodwell YW 1981. In: *HARPER'S Review of Biochemistry*. California: Lange Medical.
- Morelli I, Bonari E, Pagni AM, Tomei PE 1983. *Selected Medicinal Plants*. Rome: FAO.
- Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M 1998. Genotoxicity of na extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 61: 49-55.
- Russo M 1972. Impiego dell' extrato di Calendula (*Callendula officinalis* L.) in cosmetologia. *Rivista Italiana Essenze Profumi Piante Officinale* 54: 740-743.
- Scheffer, JJC 1979. De goudsbloem (*calendula officinalis*, L.,) als geneeskruid in verleden en heden. *Pharmaceutisch weekblad* 114: 1149-1157.
- Valdéz HL, García RP 1999. *Calendula officinalis*. *Rev Cubana Farm* 33: 188-194.
- Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P 2000. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. *J Ethnopharmacol* 69: 9-15.
- Waynforth BH 1980. Injection techniques. In: *experimental and Surgical Techniques in the Rat*. London: Academic Press.
- Wright PJ, Plummer, DT 1974. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. *Biochem Pharmacol* 23: 65-73.