

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

GLEIDE GATTI FONTES

EFEITO DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO *Calendula officinalis* NO METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F863e
2015

Fontes, Gleide Gatti, 1983-
Efeito de formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* no metabolismo lipídico em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria / Gleide Gatti Fontes. – Viçosa, MG, 2015.
xvii, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.63-77.

1. Plantas medicinais. 2. *Calendula officinalis*.
3. Flavonoides. 4. Dislipidemia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

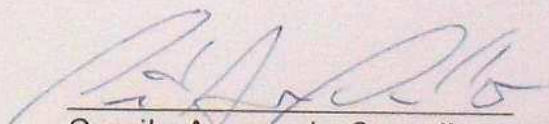
CDD 22. ed. 633.88355

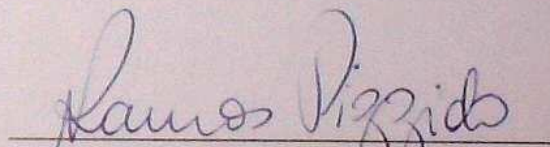
GLEIDE GATTI FONTES

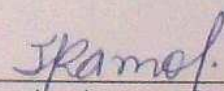
EFEITO DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO *Calendula officinalis* NO METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

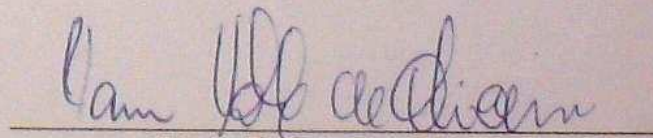
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de Magister *Scientiae*.

Aprovada: 26 de março de 2015.


Camilo Amaro de Carvalho
(Coorientador)


Virginia Ramos Pizziolo
(Coorientador)


Juliana Rocha Lopes Soares Ramos


Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

GLEIDE GATTI FONTES

EFEITO DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA CONTENDO *Calendula officinalis* NO METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Tânia Toledo de Oliveira

Coorientadores:

Prof^a Dr^a. Virgínia Pizziolo

Prof^o Dr. Camilo Amaro de Carvalho

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015**

BIOGRAFIA

Gleide Gatti Fontes, filha de Godofredo Mamede Fontes e Maria das Graças Gatti Fontes, nasceu no Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, em 10 de março de 1983.

Em dezembro de 2008, graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora, MG.

Em abril de 2013, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos nas áreas de produtos naturais e Bioquímica Animal, submetendo-se à defesa de dissertação, requisito indispensável para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em março de 2015.

*Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Godofredo e Graça
e ao meu lindo esposo Leandro.*

*"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."
(Clarice Lispector)*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela paciência e persistência, paz e refúgio, fé e força para superar todos os obstáculos e etapas neste tempo do mestrado.

Aos meus queridos pais, Godofredo e Graça e ao meu amor Leandro pelo amor, incentivo, cumplicidade, ensinamentos, sacrifícios, por entenderem todas as minhas dificuldades e por me receberem sempre de braços abertos, ajudando-me em todos os momentos a realizar mais este sonho.

À minha madrinha, tias e tios, primas por sempre me darem força e entenderem a minha ausência.

À Universidade Federal de Viçosa pela excelência em ensino, pesquisa e extensão. Um agradecimento especial ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Universidade Federal de Juiz de Fora por me apoiar na conclusão desta etapa.

Ao meus orientadores Profs. Tânia Toledo de Oliveira, Camilo Amaro de Carvalho e Virgínia Ramos Pizziolo, pelos ensinamentos, por toda a confiança, carinho, amizade, paciência, atenção, apoio e estímulo, por não medirem esforços para enriquecermos nossa pesquisa.

A todos os meus amigos, obrigada pelo companheirismo. Em especial aos meus queridos parceiros de todas as horas, Rodrigo e Dalila, por me fazerem acreditar que podemos fazer coisas grandiosas com o nosso esforço, apesar de tantas dificuldades.. obrigada por toda a paciência, alegria, trabalho, aprendizado, amizade e parceria formada. Sem vocês eu não estaria aqui! Um agradecimento muito especial à Maira (Epamig- UFV), Letícia e Alisson (Biopesb- UFV), Mayara (Lab. Produtos Naturais- UFV), Márcia Saraiva (Farmácia Humanus), Eliene e João Paulo (Univiçosa), Cida (DSA- UFV), Adriano, Adriana 1 e 2 (DEM- UFV), Thiago Onofre (Lab. Infectologia Molecular Animal- UFV), Aline, Helena, Luana, Tamiris e Ana (Lab. Farmacognosia- UFJF).

A todos os meus queridos estagiários: Ana Carolina, Marisa, Samara, Thaís, Ramon, Vanessa, Sarah e Celso, por tanto apoio e por dividirem cada momento do experimento animal e preparação de dietas junto a mim e Dalila, sem medirem esforços para trabalharem ao nosso lado em tantos finais de semana e feriados, por tratarem os animais com tanto carinho. Um agradecimento especial e entristecido ao Celso, que infelizmente precisou nos deixar um adeus na parte final da pesquisa..

Aos professores Luciana Moreira Lima, João Paulo Leite, Hércia Stampini, Fabíola Dutra Rocha por disponibilizarem seus recursos/ laboratórios para enriquecimento da minha pesquisa, conselhos e orientação em meus trabalhos.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde, Laboratório de Bioquímica (Departamento de Medicina e Enfermagem) pela paciência, por me apoiarem sempre e por entenderem minhas eventuais ausências, permitindo a conciliação do trabalho x pesquisa, cobrindo-me sempre com competência e comprometimento.

Ao grupo do Laboratório Biofármacos: Sr. José Geraldo, Fábio, Geisla, Davilson, Carlos, Luana, por toda a ajuda nesta pesquisa.

À todos os colegas de disciplinas, muito obrigada pelo companheirismo.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

A todos, que de alguma forma contribuíram para este trabalho, muito obrigada!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Dislipidemias e aterosclerose	4
2.2 Estratégias atuais de tratamento.....	5
2.3 Compostos alvo	6
2.4 Estudos dos flavonoides na prevenção da aterosclerose	7
2.5 <i>Calendula officinalis</i>	9
2.6 Cultivo de plantas medicinais	11
2.7 Importância da análise fitoquímica de extratos vegetais.....	12
2.8 Modelo animal escolhido para o estudo.....	14
2.9 Importância do estudo.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 Colheita e identificação do material vegetal.....	18
4.2 Secagem	18
4.3 Preparação do extrato etanólico (<i>Calendula officinalis</i>)	19
4.4 Liofilização do extrato	19
4.5 Quantificação dos flavonoides totais	20
4.6 Obtenção do perfil cromatográfico qualitativo do extrato liofilizado por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE).....	21
4.7 Atividade antioxidante do extrato: Método colorimétrico <i>in vitro</i> de redução do ABTS ⁺ (capacidade antioxidante equivalente ao trolox- TEAC)	22
4.8 Obtenção da formulação fitoterápica (<i>Calendula officinalis</i>) e padronização de doses.....	25

4.9 Ensaio <i>in vivo</i>	25
4.9.1 Animais.....	25
4.9.2 Dieta hiperlipídica	26
4.9.3 Divisão dos grupos.....	26
4.9.4 Delineamento experimental	26
4.9.5 Controle da massa corporal e do consumo alimentar	28
4.9.6 Eutanásia e coleta dos tecidos.....	28
4.10 Análise bioquímica dos parâmetros sanguíneos.....	29
4.11 Análise histopatológica qualitativa do fígado	29
4.12 Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Análise química do solo	31
5.2 Rendimento da planta	32
5.3 Quantificação dos flavonoides totais	32
5.4 Perfil cromatográfico qualitativo do extrato liofilizado obtido por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)	33
5.5 Método colorimétrico de redução do ABTS ⁺ (determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox - TEAC)	39
5.6 Avaliação da atividade hipolipemiante da formulação contendo <i>Calendula officinalis</i> .	43
5.6.1 Controle da massa corporal e consumo alimentar.....	43
5.6.2 Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos dos animais	47
5.6.3 Análise histopatológica qualitativa do fígado	58
6. CONCLUSÃO	61
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS:	78
ANEXO A: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	78
ANEXO B: CARTA DE RETIFICAÇÕES ENVIADA AO COMITÊ DE ÉTICA.....	79
ANEXO C: RESULTADO DAS ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS .	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural: Núcleo fundamental característico dos flavonoides (C ₆ C ₃ C ₆).....	9
Figura 2. Flores de <i>Calendula officinalis</i> provenientes de colheita em fazenda experimental.....	18
Figura 3. Oxidação do ABTS com K ₂ S ₂ O ₈ e a formação do ABTS ⁺	22
Figura 4. Estruturas químicas do Trolox e do α-tocoferol.....	23
Figura 5. Curva analítica de quercetina, obtida para a quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível em λ 415 nm.....	32
Figura 6. Perfil cromatográfico qualitativo do extrato etanólico liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> obtido por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE).....	34
Figura 7. Espectros UV-Vis do extrato liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> relativos a seus tempos de retenção.....	34
Figura 8. Tempos de retenção das substâncias de referência e seus respectivos espectros em UV-Vis obtidos por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE).....	36
Figura 9. Cinética de reação de regeneração do radical ABTS ⁺ pelo Trolox nas concentrações de 0,75 a 6 µg/mL.....	39
Figura 10. Cinética de reação de regeneração do radical ABTS ⁺ do extrato etanólico liofilizado de <i>Calendula officinalis</i> (triplicata).....	40
Figura 11. Comparação da % inibição obtida das três determinações no ensaio de redução do radical ABTS ⁺	42
Figura 12. Evolução do peso corporal dos ratos Wistar durante o período total do experimento.....	43
Figura 13. Evolução do peso corporal dos ratos Wistar durante o período de indução.....	45
Figura 14. Efeito da administração de formulação fitoterápica de <i>Calendula officinalis</i> (50 a 150 mg/kg), por via oral, sobre peso corporal de ratos Wistar por 20 dias consecutivos.....	45
Figura 15. Consumo alimentar dos ratos Wistar durante o período de indução e tratamento.....	46

Figura 16. Consumo alimentar dos ratos Wistar somente durante o período de tratamento.....	47
Figura 17. Efeito do tratamento com a formulação fitoterápica contendo extrato de <i>Calendula officinalis</i> nos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria.....	48
Figura 18. Fotomicrografias de cortes transversais do tecido hepático de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria e tratados com formulação fitoterápica contendo extrato de <i>Calendula officinalis</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Composição da dieta de cafeteria (g/1000g de dieta).....	26
Tabela 2– Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos.....	27
Tabela 3– Análise química do solo utilizado para o cultivo de <i>Calendula officinalis</i> (Argissolo Vermelho Amarelo).....	31
Tabela 4– Valor de TEAC obtido da média das 3 determinações do extrato testado frente ao cátion radical ABTS ⁺	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIFISA: Associação brasileira de empresas do setor fitoterápico
- ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
- ACAT: Enzima acilcolesterol aciltransferase
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AUC: Área sob a curva
- CEUA/UFV: Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT: Colesterol total
- DAC: Doença arterial coronariana
- DAD: Detector de arranjo de diodo
- DATASUS: Departamento de informática do SUS/MS
- DCV: Doenças cardiovasculares
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- EPAMIG: Empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais
- HDL: Lipoproteína de alta densidade
- HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
- LDL: Lipoproteína de baixa densidade
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PON-1: Enzima paraoxonase-1

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RENISUS: Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

SUS: Sistema Único de Saúde

TEAC: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox

TRI: Triacilgliceróis

TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

UFV: Universidade Federal de Viçosa

UV: Ultravioleta

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

FONTES, Gleide Gatti, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março, 2015. **Efeito de formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* no metabolismo lipídico em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Camilo Amaro de Carvalho e Virgínia Ramos Pizziolo.

Calendula officinalis (Asteraceae) é uma planta medicinal popularmente conhecida como malmequer. O extrato de suas flores é fonte de flavonoides, compostos que apresentam propriedades principalmente antioxidantes. Há indícios da atividade hipolipidêmica desta planta na literatura, mas sem estudos de comprovação. Fármacos utilizados atualmente nas dislipidemias apresentam muitos efeitos adversos e alto custo de aquisição, justificando a busca de novos medicamentos dentro deste contexto. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito hipolipidêmico de uma formulação fitoterápica contendo extrato de *Calendula officinalis*, na forma de ensaio biológico, utilizando *Rattus norvegicus* linhagem Wistar albina alimentados com dieta de cafeteria. O extrato liofilizado da planta foi obtido por processo de maceração com etanol. A partir deste extrato foi realizada a quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria (415nm), atividade antioxidante pelo método colorimétrico de redução do ABTS⁺ (734nm) e o perfil cromatográfico qualitativo através da CLAE. Ratos Wistar com aproximadamente quarenta dias de idade foram divididos em sete grupos de acordo com o tratamento recebido: G1 (Controle basal): Ração comercial; G2: Dieta cafeteria (CAF), sem tratamento; G3: CAF+ Atorvastatina (10 mg/Kg); G4: CAF+ veículo formulação; G5, G6 e G7: CAF+ tratamento com formulação fitoterápica contendo o extrato liofilizado nas doses 50, 100 e 150 mg/Kg respectivamente. O tempo total do experimento foi de setenta e sete dias, sendo doze dias de adaptação, quarenta e cinco dias de indução e vinte dias de tratamento. Foi realizado controle da massa corporal dos animais, assim como do consumo alimentar e os parâmetros bioquímicos séricos foram dosados utilizando-se kits comerciais. Foi realizada também a avaliação histopatológica qualitativa do fígado dos animais, através da coloração com hematoxilina/eosina. Para as análises estatísticas utilizou-se ANOVA com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações (p<0.05). O extrato das flores de *C. officinalis* apresentou

teor de flavonoides de 0,42% e no ensaio do ABTS, o extrato apresentou um valor de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) de 0,011. O perfil cromatográfico qualitativo, através da comparação com padrões, sugeriu a presença dos flavonoides rutina, quercetina e morina. No ensaio biológico, os tratamentos com a formulação contendo o extrato não afetaram estatisticamente os níveis sanguíneos de glicose, colesterol total, triacilgliceróis e VLDL, no entanto impactou positivamente nos níveis de LDL e HDL, bem como na relação LDL/HDL, sendo este um índice de risco cardiovascular mensurado. O tratamento, aparentemente, promoveu a redução da quantidade das gotículas de lipídios no tecido hepático. Concluiu-se que o tratamento com a formulação contendo extrato de *C. officinalis*, na presente condição experimental, foi eficaz na modulação do perfil lipídico e a planta medicinal estudada apresenta possibilidade de utilização no controle e prevenção das dislipidemias e doenças associadas, podendo atuar positivamente na redução do risco cardiovascular, sendo os resultados obtidos bastante vantajosos. Esta planta medicinal está contida no RENISUS (Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS), havendo grande valorização de seu potencial no Brasil.

ABSTRACT

FONTES, Gleide Gatti, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Herbal formulation containing *Calendula officinalis* effect on lipid metabolism in Wistar rats fed with cafeteria diet.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Camilo Amaro de Carvalho and Virgínia Ramos Pizziolo.

Calendula officinalis (Asteraceae) is a medicinal plant popularly known as marigold. The extract of its flowers is a source of flavonoids, compounds which have mainly antioxidant properties. There is evidence of hypolipidemic activity of this plant in the literature, but unproven studies. Drugs currently used in dyslipidemia have many adverse effects and high cost, justifying the search for new drugs within this context. The study aimed to evaluate the hypolipidemic effect of a herbal formulation containing *Calendula officinalis* extract in the form of biological assay using *Rattus norvegicus* Wistar albino strain fed with cafeteria diet. The lyophilized plant extract is obtained by maceration with ethanol process. From this extract was carried out quantification of total flavonoids by spectrophotometry (415 nm), antioxidant activity by the colorimetric method of reducing the ABTS⁺ (734nm) and the qualitative chromatographic profile by HPLC. Wistar rats with about forty days of age were divided into seven groups according to the treatment received: G1 (Basal Control): Commercial diet; G2: cafeteria diet (CAF) without treatment; G3: CAF + Atorvastatin (10 mg / kg); G4: CAF + vehicle formulation; G5, G6 and G7: + CAF treatment with the lyophilized formulation containing herbal extract in doses 50, 100 and 150 mg / kg respectively. The total experiment time was seventy-seven days, twelve days of adaptation, forty five days of induction and twenty days of treatment. It was held control of animal body weight, and food consumption and serum biochemical parameters were measured using commercial kits. It also performed a qualitative histopathological evaluation of the liver of animals, by staining with hematoxylin / eosin. For statistical analysis we used ANOVA with Tukey's post-test for multiple comparisons ($p < 0.05$). The extract of *C. officinalis* flowers presented flavonoid content of 0.42%, and ABTS assay, the extract showed a value of antioxidant activity equivalent to Trolox (TEAC) of 0.011. The qualitative chromatographic profile by comparison with standards, has suggested the presence of flavonoids rutin, quercetin and morin. In biological assay, treatment with the formulation containing

the extract does not statistically affect the blood levels of glucose, total cholesterol, triglycerides and VLDL, however positively impacted in LDL and HDL, as well as the LDL / HDL ratio, which is a cardiovascular risk measured. The treatment apparently promoted to reduce the amount of lipid droplets in liver tissue. It was concluded that treatment with the formulation containing *C. officinalis* extract, in this experimental condition, was effective in modulating the lipid profile and the medicinal plant study presents can be used in the control and prevention of dyslipidemia and related diseases, it can act positively in the reduction of cardiovascular risk and the results obtained very advantageous. This medicinal plant is contained in RENISUS (National List of medicinal plants of interest to SUS), with great appreciation potential in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais na prevenção e tratamento de diversas patologias vem sendo largamente praticada pela humanidade, sendo oficialmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978. As plantas medicinais, segundo a OMS, são as que possuem metabólitos secundários que podem ser empregados com propósito terapêutico e como precursores para a química farmacêutica. Ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico (CARVALHO, et al., 2007). A terapêutica moderna não teria atingido o nível de desenvolvimento atual se não fosse a colaboração desse recurso como fonte de substâncias ativas (CALIXTO E YUNES, 2001; LIMA, 2006).

A ascensão do interesse da população pela medicina tradicional, dentre outros fatores, é resultante do elevado custo dos medicamentos procedentes da indústria farmacêutica, da dificuldade em obter-se assistência médica e farmacêutica, também a preferência dos consumidores por terapias naturais, destacando-se que, de acordo com dados da OMS, cerca de 65 a 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e explora os tratamentos naturais, especialmente as plantas medicinais¹ (CALIXTO E YUNES, 2001; TOLEDO, et al., 2003; DAVID, NASCIMENTO E DAVID, 2004; LIMA, 2006; CARVALHO et al., 2007; KLEIN et al., 2009; PEREIRA, et al., 2009; SANTOS, 2010; PLETZ, SPANIOL E PETROVICK, 2010, PINHEIRO, MOREIRA E ROSSATO, 2010 apud CORRÊA, BATISTA E QUINTAS, 2002).

A utilização das substâncias ativas é de grande relevância, especialmente as provenientes de extratos vegetais que são investigadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que são responsáveis, de maneira direta ou indireta, por cerca de 40% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna e, se considerarmos os usados como antibióticos e antitumorais, esta porcentagem cresce para aproximadamente 70% (CALIXTO E YUNES, 2001; SIMÕES E

¹ A fitoterapia é extensivamente praticada, proveniente do uso etnomedicinal. Um pequeno número de plantas medicinais, empregadas em diversas doenças pela população, tem ação comprovada. Entretanto, o uso popular tradicional tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas, derivando do "relato de efeitos" e levando à identificação de produtos com mecanismos de ação sequer conhecidos (BABU, et al., 1997; SIMÕES, 2004; MICHELIN, 2005 apud ELISABETSKY, 1987).

SCHENKEL, 2002; DAVID, NASCIMENTO E DAVID, 2004; LIMA, 2006). Segundo a ABIFISA (Associação brasileira de empresas do setor fitoterápico), é provável que cerca de 82% da população brasileira utilize produtos a base de plantas medicinais (LIMA, 2006). Além disto, no mercado brasileiro de medicamentos e cosméticos, 25% dos produtos contêm princípios ativos naturais (JÚNIOR E PEREIRA, 2009).

Historicamente, a medicina popular emprega plantas e seus extratos no tratamento de diversas patologias, também no caso das dislipidemias, que trata-se das desordens do metabolismo lipídico, podendo ser associadas a doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão e esteatose hepática (MUSCAT, et al., 2002).

A aterosclerose é a causa mais frequente de morbimortalidade no mundo (OMS, 2012). É uma doença multifatorial, com inúmeros fatores de risco. Há diversos quesitos a serem discutidos na aterosclerose, tais como hiperlipidemia, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a inflamação. Estes contribuem em conjunto para o surgimento da placa aterosclerótica, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Redução de lipídios e níveis de colesterol por terapia medicamentosa ou intervenções dietéticas podem diminuir o risco de doença arterial coronariana (DAC). Muitas plantas já listadas na medicina tradicional podem melhorar a saúde cardiovascular e prevenir a doença aterosclerótica em vários estágios. Estudos recentes têm mostrado que muitos compostos de origem vegetal são capazes de reduzir triacilgliceróis plasmáticos (TRI) e colesterol total (CT), elevando, ainda, os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo assim o risco de DCV (JOSHI, SHARMA E JAIN, 2005; HANSON, 2005; SOUZA, et al., 2007; MAHMOOD, et al., 2010; ASGARY, et al., 2013).

Apesar da ampla oferta de plantas medicinais, é escassa a literatura científica sobre os efeitos dos extratos naturais e sua validação, sob forma de ensaios pré-clínicos e clínicos, no tratamento das dislipidemias. Desta forma, a eficácia e segurança dos usuários destas plantas podem estar comprometidas, tornando-se de grande importância os ensaios referidos. Estudos com utilização de fitoterápicos em modelos animais e humanos têm sido realizados com resultados excelentes e bastante satisfatórios (JEON, et al., 2004; KONG, et al., 2004).

Uma das espécies medicinais relacionadas pelo Ministério da Saúde com grande potencial para uso, inclusive no SUS, é a *Calendula officinalis* (BRASIL, 2010). Apesar dos diversos estudos existentes relativos a esta planta, existem poucos direcionados e confirmatórios da sua atividade hipolipemiante, apesar de sua indicação de uso nas dislipidemias (PIZZIOLO, et al., 2011).

Trata-se de uma planta pertencente à família Asteraceae, sendo nativa da região do Mediterrâneo e cultivada para fins ornamentais e medicinais na Europa e na América (SVANIDZE, et al., 1975; SILVA, et al., 2007). Esta planta tem sido empregada por um longo tempo na terapia popular, havendo mais de trinta e cinco propriedades atribuídas à decocção e tintura de suas flores, sendo utilizada como anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, bactericida, diurética (DUKE, 1991). Através da farmacologia experimental, suas ações antibacterianas e anti-inflamatórias, entre outras, foram confirmadas (DUMENIL, et al., 1980; SHIPOCHLIEV E DIMITROV, 1981; RAMOS, et al., 1998).

A calêndula apresenta grande importância terapêutica devido aos flavonoides, um de seus principais componentes (RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004). Estes metabólitos secundários são poderosos antioxidantes, sendo possível o seu envolvimento na prevenção da aterosclerose por inibirem a oxidação das LDL, diminuindo sua aterogenicidade e, conseqüentemente, o risco de doença arterial coronariana (SBC, 2013).

Nessa perspectiva, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito hipolipidêmico de uma formulação fitoterápica baseada no extrato de *Calendula officinalis*, sob forma de ensaio pré-clínico, utilizando ratos Wistar (indução por dieta de cafeteria). Dessa forma, objetiva-se ainda, a valorização do cultivo de plantas medicinais para a padronização das concentrações de princípios ativos, o que torna-se necessário no desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos com qualidade, eficácia e segurança.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos sobre a farmacologia e mecanismos de ação dos produtos naturais têm crescido abruptamente desde a segunda metade do século XX. Muitos dos compostos derivados de fontes vegetais possuem atividades farmacológicas e podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo tradicionalmente usados por populações de todo o mundo no controle de diversas doenças (SIMÕES, et al., 2004), incluindo as hiperlipidemias. Vários compostos isolados de plantas, tais como compostos fenólicos e flavonoides têm sido avaliados quanto a seus efeitos acerca das dislipidemias e aterosclerose.

2.1 Dislipidemias e aterosclerose

O colesterol é um componente celular de substancial importância, uma vez que participa de inúmeros processos biológicos destacando-se a formação de membranas, a síntese hormonal e a produção de ácidos biliares. O colesterol celular é sintetizado a partir de acetilCoA e o recebem por meio da captação de LDLs e VLDLs pelos receptores de LDL (receptores B/E), que estão presentes na membrana plasmática. Os tecidos, de uma maneira geral, não são capazes de metabolizar e exportar colesterol em quantidade significativa, com exceção dos hepatócitos, intestino e gônadas. Por conseguinte, existe um mecanismo especial de regulação da concentração intracelular deste esteróide. O aumento do conteúdo de colesterol na célula leva à redução da atividade da enzima 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase (papel-chave na síntese de colesterol), além do aumento da atividade da enzima acilcolesterol aciltransferase (ACAT) e redução da expressão dos receptores de LDL, uma vez que o excesso de colesterol livre é lesivo para a célula (LEANÇA, et al., 2010).

A dislipidemia é uma patologia decorrente da alteração do metabolismo lipídico, podendo ocorrer elevação dos níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, como também a redução das concentrações plasmáticas da lipoproteína de alta densidade (HDL), sendo que essas alterações podem ou não estar associadas. A dislipidemia pode ser controlada através de cuidados dietéticos concomitantes a mudanças no estilo de

vida, sendo na maior parte dos casos também preciso o tratamento farmacológico (SCHWERTZ, et al., 2012).

As doenças cardiovasculares são as principais responsáveis por óbitos nos países ocidentais, sendo que a dislipidemia é uma das principais causas de desenvolvimento destas doenças (HAVSTEEN, 2002; RAIDÁ, et al., 2008; JAIN, et al., 2010). A principal delas é a aterosclerose, tratando-se de um processo inflamatório progressivo e multifatorial, que acomete as grandes e médias artérias, envolvendo uma sucessão de eventos celulares e moleculares, que podem levar a alterações clínicas coronarianas, como infarto agudo do miocárdio e angina instável (PORTAL, et al., 2003). A formação da placa aterosclerótica inicia-se com o acúmulo de colesterol em macrófagos da camada íntima arterial. Essas células apresentam os receptores *scavenger* que identificam partículas de LDL modificadas por oxidação e associação com imunocomplexos, principalmente. Quando o colesterol entra na célula por meio desses receptores, ela passa a acumulá-lo, dando origem às células espumosas, sendo o primeiro passo para a formação das lesões iniciais na gênese da aterosclerose (LEANÇA, et al., 2010). A relação causal entre a elevação nos níveis séricos do colesterol e lipoproteínas aterogênicas, especialmente o LDL colesterol, e a doença arterial coronariana (DAC) está bem estabelecida. Torna-se de grande valia o estudo desta patologia, visto que as doenças cardiovasculares representaram a terceira causa de internações no Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) com 1.156.136 hospitalizações em 2007 (BOOCHI, et al., 2009).

2.2 Estratégias atuais de tratamento

Existem vários tipos de medicamentos capazes de normalizar as dislipidemias, sendo largamente utilizados os inibidores da HMG CoA- Redutase (estatinas) e os fibratos. Há muitos produtos de origem natural, substâncias deles isoladas e metabólitos de fungos que agem especificamente inibindo a enzima HMG CoA- Redutase. O tratamento com estes medicamentos, principalmente se considerarmos os efeitos sinérgicos das diversas classes farmacológicas, muitas vezes é eficiente, no entanto, apresenta um custo elevado além de apresentar muitos efeitos adversos como miotoxicidade, hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais e cefaléia proporcionais à dose do medicamento utilizado e,

especialmente, quando associados a outras classes de hipolipemiantes ou outros medicamentos metabolizados no citocromo P450 (CORSINI, MAGGI E CATAPANO, 1995; LEFER, SCALIA E LEFER, 2001; JORGE, et al., 2005; SBC, 2013). Assim, torna-se de grande interesse a pesquisa de novos medicamentos capazes de interferir no metabolismo lipídico, com adequado efeito terapêutico e menor ocorrência de efeitos colaterais. Considerando estes fatos, os pacientes têm recorrido frequentemente a tratamentos alternativos para o controle das dislipidemias.

2.3 Compostos alvo

Diversas literaturas científicas fornecem evidências de que a superprodução de espécies reativas de oxigênio pode induzir danos celulares via oxidação de componentes essenciais, como DNA, proteínas e lipídios de membrana (AMORIM E TIRAPÉGUI, 2008; JAIN, et al., 2010). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados a etiologia de doenças, destacando-se a aterosclerose. Essa relação parte do pressuposto de que a alteração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a responsável pelo desencadeamento do processo inflamatório no desenvolvimento da aterosclerose. Dessa maneira, a LDL em seu estado nativo não apresenta características aterogênicas, sendo necessária a modificação oxidativa dessa lipoproteína, proveniente do desequilíbrio do processo de oxidação resultante do estresse oxidativo celular, para que ela se torne altamente lesiva ao endotélio vascular (WITZTUM E STEINBERG, 2001; NOVELLO, 2011). Radicais livres são capazes de remover átomos de hidrogênio a partir de cadeias periféricas de ácidos graxos saturados em membranas biológicas, o que resulta em peroxidação lipídica (KELLY E HUSBAND, 2003; NAZARI, et al., 2005). Quando o sistema de defesa antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) torna-se desequilibrado, a formação de radicais livres é aumentada, podendo causar estresse oxidativo celular. Peroxidação lipídica e estresse oxidativo normalmente estão presentes em pacientes hiperlipidêmicos (KELLY E HUSBAND, 2003; NAZARI, et al., 2005). Estudos recentes apontam para um mecanismo de inibição da oxidação de LDL que é conferida à enzima paraoxonase-1 (PON1). A PON1 é uma enzima associada ao HDL, responsável pela

função antioxidante desta lipoproteína, através da hidrólise dos produtos de oxidação do LDL-colesterol, protegendo a LDL dos danos oxidativos. A atividade dessa enzima é regulada por fatores como fatores genéticos, atividade física, dieta e drogas (TOMAS, et al., 2004; ZANELLA, SOUZA E GODOY, 2007).

Compostos de plantas podem inibir a peroxidação (SAIJA, et al., 1995; PEREIRA, et al., 2009), resultando em estabilização da membrana celular por evitar a oxidação de seus lipídios. Compostos fenólicos e flavonoides podem proteger as células contra a depleção de glutathione pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes (glutathione- redutase, glutathione peroxidase e catalase) (SANZ, et al., 1998; AL-QARAWI, et al., 2002; ZAREI, et al., 2013).

O estudo de compostos de origem natural é de grande interesse na medicina. Atualmente, uma grande atenção é dada ao consumo dos flavonoides (compostos antioxidantes), que previnem danos causados por radicais livres, por seus efeitos protetores contra doenças cardiovasculares (DORNAS, et al., 2007; ZAREI, et al., 2013). Compreender os mecanismos que levam às dislipidemias é fundamental para traçar estratégias terapêuticas coerentes direcionadas para os pacientes que desenvolvem a doença progressiva. Dessa maneira, a hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha um papel importante na patogênese da aterosclerose vem despertando um entusiasmo crescente sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Neste contexto, a *Calendula officinalis* tem um papel de destaque, na pesquisa de fontes de antioxidantes para o uso no tratamento das dislipidemias.

2.4 Estudos dos flavonoides na prevenção da aterosclerose

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas e têm grande aplicabilidade nos campos da farmacologia e medicina. Estes compostos têm sido extensivamente estudados em relação às atividades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas (FALEIRO, et al., 1999; DAFERERA, et al., 2000; OLIVEIRA, et al., 2002; KELLY E HUSBAND, 2003; OLIVEIRA, et al., 2007).

Os polifenóis apresentam uma estrutura química comum, ligada a um grupo hidrofílico, sendo derivados do benzeno. São classificados em quatro famílias com base em sua estrutura e o arranjo dos anéis polifenólicos: flavonoides, ácidos

fenólicos, lignanas e estilbenos. As principais classes de flavonoides incluem os flavonois, flavonas, flavanonas, flavanois (ou catequinas), antocianidinas e isoflavonas (MANACH, et al., 2004; SCHWERTZ, et al., 2012).

Os polifenóis vêm se destacando por seus numerosos efeitos biológicos, como a modulação do perfil lipídico e a sua função antiaterosclerótica, anti-inflamatória, anti-hepatóxica, antiviral, antitumoral e vasodilatadora (CETKOVIC, et al., 2004; SCHWERTZ, et al., 2012). Algumas destas propriedades têm sido relacionadas com a ação desses compostos como antioxidantes, eliminadores de radicais livres e inibidores da peroxidação, sendo que a atividade antioxidante é correlacionada com sua relação estrutura-atividade, como propriedades redox e número e arranjo dos grupos hidroxila (COTELLE, et al., 1996; CETKOVIC, et al., 2004).

Os flavonoides estão presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. O esqueleto de carbono dos flavonoides contém quinze carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados pela cadeia de três carbonos (TAIZ E ZEIGER, 2004; HONÓRIO, 2013). São compostos resultantes de duas rotas biossintéticas (ácido chiquímico e ácido malônico) (Figura 1), sendo de grande interesse por sua bioatividade, estando amplamente distribuídos no reino vegetal, com uma lista de mais de dez mil estruturas conhecidas. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. São potentes antioxidantes, inibidores da peroxidação de lipídios, “sequestradores” de radicais livres, assim como antiagregantes plaquetários. Suas propriedades estão relacionadas com a presença, em sua estrutura, de radicais hidroxila ligados aos seus anéis. A presença de grupos hidroxila na posição carbono três do anel C, de dupla ligação entre os carbonos dois e três do anel C e o número de radicais hidroxila ligados aos anéis A e B, aumentam sua atividade antioxidante (COOK E SAMMAN, 1996; ANGHILERI E THOUVENOT, 2000; RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004; SCHMITZ, et al., 2005; SOUSA, et al., 2007; MORAIS, et al., 2009).

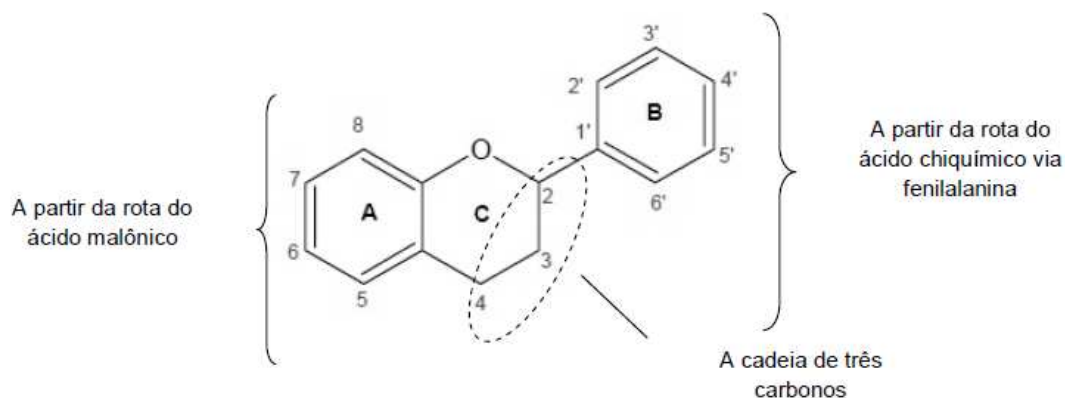


Figura 1. Fórmula estrutural: Núcleo fundamental característico dos flavonoides ($C_6C_3C_6$).

Fonte: Taiz e Zeiger, 2004; Honório, 2013.

Na busca de novos fármacos, muitos compostos químicos vêm sendo estudados, avaliando-se a capacidade de interferência no metabolismo lipídico dos animais (LIMA, et al., 2001). Os flavonoides apresentam propriedades farmacológicas que são benéficas na prevenção dos processos de aterosclerose e outras desordens do metabolismo lipídico.

2.5 *Calendula officinalis*

Calêndula é uma planta medicinal herbácea da família Asteraceae, originária da Europa meridional, cultivada em diversos países (SILVA, et al., 2007; BORELLA, et al., 2010). No Brasil é aclimatada, principalmente, às regiões sudeste e sul. É popularmente conhecida como calêndula, calêndula-hortense, maravilha-dos-jardins, malmequer ou verrucária (SILVA, et al., 2005; MANGANOTTI, 2011; CITADINI-ZANETTE, NEGRELLE E BORBA, 2012) havendo atenção significativa por parte dos pesquisadores especialmente em relação ao seu cultivo comercial para fins cosméticos e farmacêuticos. Esta planta medicinal tem sido destaque como constituinte de compostos fitoterápicos, tem grande potencial na produção de medicamentos principalmente por estar contida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), ou seja, espécies medicinais de interesse ao Ministério da Saúde para uso no SUS, cujo objetivo é “orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de fitoterápicos disponíveis

para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença” (Ministério da Saúde, 2010).

Os principais constituintes fitoquímicos bioativos (metabólitos secundários) descritos nas flores e receptáculos desta planta são responsáveis por muitas de suas atividades farmacológicas. São eles: óleos essenciais (0,1-0,4%), álcoois triterpênicos na forma livre ou esterificados com ácidos graxos (faradiol, arnidiol, eritrodiol e calenduladiol: 2-5%) e flavonoides em sua forma livre, heterosídeos isoramnetina e heterosídeos quercetina (0,2-0,9%), também carotenóides (flavoxantina e auroxantina, responsáveis pela coloração das flores), taninos, sesquiterpenos, saponinas, cumarinas, ácidos fenolcarboxílicos (0,1%), inclusive ácido salicílico, polissacarídeos (10% de pectina e 15% de polissacarídeos solúveis), alantoína (até 0,7%), mucilagens e resinas (SLIWOWSKI, et al., 1973; KALVATCHEV, et al., 1997; BAKÓ, et al., 2002; VANACLOCHA E CAÑIGUERAL, 2003; RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004; SILVA, et al., 2005; BORTOLO, MARQUES E PACHECO, 2009; KHALID E SILVA, 2010; LI E XINGMING, 2010; MUÑOZ, et al., 2011; CITADINI-ZANETTE, NEGRELLE E BORBA, 2012; AGATONOVIC-KUSTRIN E LOESCHER, 2013). Dentre todas as classes de flavonoides, a *Calendula officinalis* L. possui principalmente flavonois, representados em sua maioria pelos compostos quercetina e rutina (RODRIGUES, et al., 2004; PAIM, et al., 2010). BILIA e cols. (2001) relatam ainda a presença de isoquercetina, quercetina-3-O- rutinosilramnosídeo, isoramnetina-3-O- rutinosilramnosídeo, isoramnetina-3-O- glucosilglucosídeo e isoramnetina-3-O- glicosídeo nas flores de calêndula (BILIA, et al., 2002; CETKOVIC, et al., 2004).

A *Calendula officinalis* pode ser amplamente utilizada apresentando diversas atividades farmacológicas já comprovadas, já sendo usada como anti-inflamatória e cicatrizante (CORREIA JUNIOR, 1994; HAMBURGUER, et al., 2003; KHALID E SILVA, 2010), antitumoral (KALVATCHEV, et al., 1997; HAMBURGUER, et al., 2003; MUÑOZ, et al., 2011), antiviral (BOGDANOVA E FARMAKOL, 1970; KHALID E SILVA, 2010), em especial como anti-HIV (KALVATCHEV, et al., 1997), antibacteriana (CHIEJ, 1988, KHALID E SILVA, 2010), antimicótica (GIL, et al., 2000; CITADINI-ZANETTE, NEGRELLE E BORBA, 2012), moluscida (HELALY, et al.,

1999; CITADINI-ZANETTE, NEGRELLE E BORBA, 2012), anti-diabética (AHMAD, KHAN E WAHID, 2012) e em afecções bucais (OLIVEIRA, et al., 2007).

No Brasil, o uso do extrato de flores de calêndula já está regulamentado pela RE nº 89 de 16 de março de 2004 da ANVISA, sendo utilizado em numerosas preparações de uso externo como antiinflamatório e cicatrizante, notadamente em cosmetologia, 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 flavonoides (RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004; SILVA, et al., 2005; SILVA, et al., 2007). Os triterpenos, sobretudo os monoésteres de faradiol, têm sido discutidos como os principais responsáveis pela atividade antiinflamatória da planta (DELLA-LOGGIA, et al., 1994; AKIHISA, et al., 1996; KALVATCHEV, et al., 1997; SILVA, et al., 2005). No entanto, pouco se sabe sobre seus flavonoides. Diante disto, o estudo de uma formulação fitoterápica utilizada por via oral mostra-se de grande importância.

2.6 Cultivo de plantas medicinais

A produção de fitoterápicos requer investigações prévias relativas a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. Com isso, a transformação de plantas em medicamentos deve visar a preservação da integridade químico-farmacológica da planta, garantindo a sua ação biológica constante, além da segurança, utilização e a valorização de seu potencial terapêutico (TOLEDO, et al., 2003; LIMA, 2006; PLETZ, SPANIOL E PETROVICK, 2010). Dessa forma, o cultivo das plantas medicinais deve ser valorizado, em detrimento do extrativismo, que é predatório, destas plantas.

A produção controlada das plantas medicinais torna-se necessária já que a qualidade destas plantas está diretamente relacionada à quantidade de princípio ativo. A espécie *Calendula officinalis* apresenta grande potencialidade em atingir valores relevantes de princípios ativos, mínimo de 0,4% para a comercialização como droga vegetal, conforme preconiza a farmacopéia brasileira. Segundo Pacheco (2007), a grande maioria das matérias-primas vegetais provenientes de plantas de calêndula apresentam teores de flavonoides entre 0,05 e 0,1%. Deste modo, uma droga que apresente mais de 0,1% de flavonoides pode ser considerada

como sendo de qualidade. Estudos voltados à produção de calêndula ao nível comercial, ou seja, melhora do plantio visando maior teor e qualidade de princípios ativos é de grande importância para a adequação dos cultivos e produção de insumos fitoterápicos de interesse ao SUS (HEITOR, 2013).

Além do exposto acima, a calêndula é uma espécie promissora para as propriedades que utilizam mão de obra familiar, uma vez que a colheita e o beneficiamento são, na maioria das vezes, manuais por escassez de equipamentos para esta finalidade, o que se tornou um dos obstáculos à produção em grande escala. A avaliação dos sistemas de produção para a calêndula, em relação ao seu desempenho agrônomo e custos do cultivo, é de importância à agricultura nacional, podendo contribuir para uma maior produção de biomassa e metabólitos secundários, uma vez que boa parte da matéria-prima é utilizada na produção de fármacos (SILVEIRA, et al., 2002; ARAÚJO, et al., 2009; MANGANOTTI, 2011).

2.7 Importância da análise fitoquímica de extratos vegetais

Quando uma espécie vegetal é utilizada como matéria-prima para produção de um medicamento fitoterápico, há diferentes etapas no processo produtivo em que se pode haver não-conformidades, como o cultivo, colheita, secagem, moagem, extração e formulação. Se esses pontos não forem realizados de forma adequada, poderão ocorrer alterações no teor das substâncias ativas, vindo a refletir na qualidade do produto final (WIJESEKERA, 1984; BORELLA, et al., 2010)

No controle da qualidade dos extratos obtidos a partir das plantas medicinais, não é necessário que se isole todos os compostos presentes, o objetivo é a identificação dos componentes químicos responsáveis pela atividade farmacológica. O teor de um conjunto de substâncias (marcadores químicos) deve ser determinado e correlacionado com a finalidade de utilização.

A análise fitoquímica de extratos vegetais representa um método eficaz e de custo acessível, que já fornece dados para indicar presença de qualidade da matéria-prima. Para comprovação do teor de marcadores, deve-se referenciar um extrato padrão (BRASIL, 2010).

A RDC nº. 26 (BRASIL, 2014) recomenda a determinação qualitativa de substâncias relevantes presentes em plantas, identificando-as por comparações de cromatogramas levando-se em consideração que cada extrato vegetal possui seu

padrão de bandas exclusivo, chamado “*fingerprint*”. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta alta resolução e reprodutibilidade sendo uma alternativa bastante viável e rápida em comparação a métodos químicos. Trata-se do método mais utilizado em controle da qualidade de medicamentos, além de ser eleito como método oficial pela ANVISA, sendo esta a técnica adequada para a análise de matrizes complexas como as formas extrativas vegetais.

Com relação à utilização de ensaios antioxidantes, estes têm se tornado uma ferramenta útil e extremamente necessária na seleção de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos. Além disso, estes métodos são fundamentais na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos (ALVES, et al, 2010). Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais *in vitro* ou *in vivo*, sendo os mais utilizados aqueles baseados na neutralização de radicais livres como o ABTS⁺ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada tanto para substâncias purificadas quanto para extratos de plantas de natureza hidrofílica ou lipofílica. O ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) apresenta cor azul/verde claro, sendo muito solúvel em água e quimicamente estável. É o radical mais indicado para ensaios com substâncias coloridas, reduzindo a possibilidade de interferência de compostos que absorvem na região do visível. O ensaio desenvolvido por Re e colaboradores (1999) foi validado por sua estabilidade, reprodutibilidade e por ser uma alternativa economicamente viável (KUSKOSKI, et al., 2005).

Os polifenóis constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários com mais de oito mil estruturas conhecidas. Eles podem ser moléculas simples (flavonoides, ácidos fenólicos, fenilpropanoides) ou substâncias altamente polimerizadas (ligninas e taninos), com os flavonoides representando o mais comum e amplamente distribuído subgrupo (SOBRATTEE, et al., 2005). A determinação espectrofotométrica de flavonoides totais de um extrato é realizada por meio de diversas técnicas, todavia, a que utiliza o cloreto de alumínio (AlCl₃) está entre as mais utilizadas (RUSAK, et al., 1993; LEITE, 2002; LUENGAS-CAICEDO, 2005). Esta metodologia de quantificação é robusta, de custo relativamente baixo e baseia-se na propriedade do cátion alumínio em formar complexos estáveis com os

flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Com este método é possível quantificar flavonoides, evitando-se a interferência de ácidos fenólicos que, invariavelmente, acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais (FUNARI E FERRO, 2006). Estes compostos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda inferiores (355 nm), não interferindo nas medidas de absorvância (ZAPOROZHETS, et al., 2003; ZAPOROZHETS, et al., 2004). O comprimento de onda 415 nm para a quantificação é justificado pelo estudo de Chang e colaboradores (2002). Esta técnica passa por uma etapa de extração sob-refluxo e clarificação (eliminação de carotenoides e clorofila), sendo utilizada a fase de solução hidrometanólica para a quantificação, após separação com diclorometano.

2.8 Modelo animal escolhido para o estudo

Quando novos princípios ativos são pesquisados, tornam-se necessários estudos em várias espécies animais, verificando seus efeitos terapêuticos e toxicidade para que possam ser empregados como fármacos. As pesquisas destinadas a triagem de compostos que apresentam função hipolipidêmica frequentemente requerem a utilização de modelos animais, geralmente ratos, coelhos ou camundongos. Dentre os métodos empregados para provocar o aumento nos níveis de lipídios plasmáticos, podem ser destacados o uso de dietas suplementadas com colesterol (KUMAR, et al., 2006) ou o emprego de substâncias surfactantes. Neste estudo, utilizaremos ratos Wistar (MACEDO, et al., 2012; REYNÉS, et al., 2014).

2.9 Importância do estudo

De acordo com projeções da Organização Mundial de Saúde, há uma tendência de elevação das doenças cardiovasculares no Brasil, agravando mais o quadro de morbidade e mortalidade que já é elevado (SBC, 2013). O aumento dos níveis plasmáticos de colesterol de baixa densidade (LDL-colesterol), a redução dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-colesterol) e também a elevação de triglicerídeos (TRI) são fatores de risco para eventos cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morte no mundo (JAMA, 2001). O Brasil acompanha a estatística

internacional onde as principais causas de morte são as doenças cardiovasculares, com valores percentuais em torno de 25%, responsáveis por cerca de duzentas e cinquenta mil mortes ao ano (PICON E BELTRAME, 2002; DATASUS, 2009).

Estratégias destinadas a desenvolver novos fármacos para as dislipidemias envolvem a seleção de novos compostos naturais. Por meio da intervenção farmacológica tem sido realizada a redução dos níveis de colesterol plasmático e conseqüentemente o combate à aterosclerose, mostrando-se bastante benéfica. Todavia, o alto custo destes medicamentos e seus inúmeros efeitos colaterais têm estimulado as pesquisas envolvendo produtos naturais na tentativa de diminuir os níveis de colesterol (MOLL, 2006).

De acordo com Magalhães e cols. (2004), uma proporção relevante de pacientes ainda não é adequadamente tratada com os fármacos atualmente disponíveis. Esta situação gera diversas conseqüências, desde a não-adesão ao tratamento até limitações na eficácia causadas pela intolerância, pela interação com outros medicamentos e pelos efeitos adversos dos hipolipemiantes de uso rotineiro. Desse modo, agentes mais efetivos são necessários e acredita-se ser possível reverter o panorama das altas taxas de morbimortalidade global pela doença aterosclerótica coronariana e cerebrovascular.

O custo do desenvolvimento de um fitomedicamento pode ser dez vezes menor que de um medicamento sintético, ainda podendo levar dez vezes menos tempo para chegar ao mercado. Daí o interesse crescente de empresas internacionais na biodiversidade de países tropicais e subtropicais (SOUSA; MIRANDA, 2010; MANGANOTTI, 2011). Assim, o uso das plantas medicinais no Brasil é uma alternativa para a maior parte da população, em função da falta de acesso à medicina convencional e, não necessariamente, pela preferência por medicamentos de origem natural. Poucas espécies são cultivadas e, quando são, normalmente acontece em pequena escala. A maior parte das espécies utilizadas é nativa e obtidas por meio do extrativismo (MING, 1998; MANGANOTTI, 2011).

Constata-se uma elevação do número de programas oficiais de saúde, a fim de se recomendar o uso de fitoterápicos à população e incentivar o cultivo agroecológico de plantas medicinais (SOUSA; MIRANDA, 2010; MANGANOTTI, 2011). Somado a isso a descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitofármacos

podem contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em consideração que a diversidade molecular dos biomas brasileiros é ainda insuficientemente explorada como fonte de compostos de interesse farmacológico (BARREIRO, 2009).

A terapia com plantas medicinais e fitoterápicos é incentivada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo Ministério da Saúde, havendo uma portaria que aprovou o uso de plantas medicinais e fitoterapia com caráter multidisciplinar no Sistema Único de Saúde (SUS) (CFN, 2006). Diante disso, uma das espécies medicinais relacionadas pelo Ministério da Saúde com grande potencial para uso, inclusive no SUS, é a *Calendula officinalis* (BRASIL, 2010).

Pelo fato da calêndula ser uma planta com presença de grande quantidade de flavonoides e, conseqüentemente, grande potencial terapêutico no controle das dislipidemias e na prevenção de doenças cardiovasculares, estudos experimentais com ratos possibilitam verificar, de forma segura, a eficácia dessa planta no controle e prevenção de doenças relacionadas às dislipidemias. Dessa forma, o presente estudo avaliará o potencial modulador de uma formulação fitoterápica no perfil lipídico de ratos Wistar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito hipolipidêmico de uma formulação fitoterápica contendo extrato de *Calendula officinalis*, sob forma de ensaio *in vivo*, utilizando *Rattus norvegicus* linhagem Wistar albina.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar colheita de flores proveniente de cultivo da planta medicinal *Calendula officinalis* em quantidade suficiente para obtenção de extrato enriquecido em flavonoides;

3.2.2 Preparar, a partir das flores secas, extrato etanólico pelo processo de maceração;

3.2.3 Determinar quantitativamente o teor de flavonoides totais do extrato liofilizado;

3.2.4 Obter o perfil cromatográfico qualitativo do extrato liofilizado por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE);

3.2.5 Avaliar a atividade antioxidante (*in vitro*) do extrato por meio do método colorimétrico de redução do ABTS⁺, determinando-se a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC);

3.2.6 Propor formulação fitoterápica a partir do extrato preparado;

3.2.7 Avaliar *in vivo* o efeito hipolipemiante da formulação nos parâmetros bioquímicos, utilizando ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria;

3.2.8 Realizar análise histopatológica qualitativa no fígado dos animais;

3.2.9 Analisar estatisticamente os resultados.

4. METODOLOGIA

4.1 Colheita e identificação do material vegetal

A colheita do material vegetal cultivado (flores, figura 2) foi realizada no mês de setembro de 2013, no município de Oratórios (MG), região da zona da mata Minas Gerais, Fazenda Experimental da EPAMIG (20°30'S; 43°00'; 500m de altitude, temperatura média máxima anual de 21,8°C e mínima de 19,5°C, precipitação pluvial média anual de 1.250mm). A espécie foi cultivada em argissolo vermelho-amarelo.

Foram feitas exsicatas da espécie (VIC 41899), que foram depositadas no Herbário da UFV segundo o protocolo da instituição. A identificação do material vegetal foi realizada pelo especialista no Departamento de Botânica, UFV, Dr. Eric Koiti Okiyama Hattori, havendo autenticação por comparação com espécies do Horto Botânico, onde a espécie testemunho foi depositada.



Figura 2. Flores de *Calendula officinalis* provenientes de colheita em fazenda experimental.

A: Colheita das flores proveniente de cultivo em fazenda experimental.

B: Flores de *Calendula officinalis*.

Fonte: Fontes, 2013.

4.2 Secagem

Após a colheita, seleção e lavagem em água corrente, a massa fresca das pétalas de *Calendula officinalis* foi determinada em balança analítica e a secagem foi realizada em estufa com renovação e circulação de ar, na temperatura máxima de 40°C, até obter-se um teor-padrão de umidade de 10 a 12%. Após secagem, as pétalas foram trituradas em moinho de facas Marconi®, modelo MA 340/A e o rendimento em porcentagem do pó do farmacógeno (flores) foi calculado. As flores

moídas permaneceram armazenadas em papel “Kraft” até o momento do preparo do extrato (evitando a interferência de luz e umidade).

4.3 Preparação do extrato etanólico (*Calendula officinalis*)

Para o método de extração de flavonoides foi utilizada a técnica da maceração com etanol P.A. em temperatura ambiente, sob agitação diária, por setenta e duas horas. Este método é bastante simples e apresenta a vantagem do custo operacional reduzido, apresentando ótima reprodutividade em grandes escalas (SIMÕES, et al., 2004). A literatura nos mostra que os flavonoides são solúveis em água podendo ser facilmente extraídos com solventes polares, sendo o etanol e o metanol os mais utilizados (SIMÕES, et al., 2004).

O extrato foi preparado na proporção 1:5/ 20% m/v (100g flores secas e trituradas: 500 mL de etanol P.A. com 0,3% ácido cítrico). Novello (2011) destaca a importância da presença do agente acidulante ácido cítrico (0,3%) como conservante dos flavonoides durante o processo de extração. Para melhorar a eficiência da extração e para se obter massa suficiente para os ensaios biológicos, o procedimento foi repetido até a exaustão do material vegetal. Para isto, utilizamos o processo da remaceração por mais sete vezes consecutivas, renovando-se apenas o líquido extrator. O material vegetal extraído foi reunido e filtrado, concentrado em evaporador rotativo com temperatura máxima de 40°C, sob pressão reduzida, para a retirada de todo o solvente alcoólico. O resíduo obtido foi mantido em geladeira ao abrigo da luz. O extrato restante recebeu o nome de “extrato etanólico de calêndula” e foi liofilizado.

4.4 Liofilização do extrato

O extrato vegetal foi submetido a processo de secagem por liofilização em Liofilizador de bancada Terroni, modelo LC1500, utilizando-se temperatura de -55°C. O rendimento final da extração foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100$. O extrato final liofilizado foi suspenso em formulação farmacêutica oral. A preparação das soluções se deu de acordo com a dose a ser administrada, respeitando-se o peso do animal (mg/Kg/L).

4.5 Quantificação dos flavonoides totais

O método utilizado foi a espectrofotometria de absorção UV-visível (415nm), após reação com cloreto de alumínio (AlCl_3) (RUSAK, et al., 1993; LEITE, 2002; LUENGAS-CAICEDO, 2005), buscando-se o teor mínimo de 0,4% de flavonoides totais (Farmacopéia Brasileira, 2010). Realizamos as leituras de absorbância em espectrofotômetro Biospectro SP-220, sendo o teor de flavonoides totais calculado e o resultado expresso em % (p/p) de flavonoides totais calculados como quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) em relação ao extrato liofilizado. O ensaio experimental foi realizado em triplicata.

Para cada réplica, adicionou-se à 100 mg do extrato, 12 mL de metanol, sendo esta mistura aquecida, sob refluxo, durante trinta minutos. O extrato foi resfriado e filtrado e ao resíduo do material, foi adicionado 10 mL de metanol, por mais trinta min de refluxo. Em seguida, esta mistura foi filtrada, sendo reunido ao volume obtido anteriormente e completando-se o volume do balão volumétrico (10mL) com metanol.

Para eliminação de carotenoides, as réplicas (misturas acima) foram submetidas ao processo de clarificação, onde a solução do extrato (15 mL) foi tratada com diclorometano (6 mL) e água (9 mL), resultando em duas fases: a superior (hidrometanólica) e a inferior (fase orgânica – diclorometano). Retirou-se a camada hidrometanólica (superior), que foi utilizada para a reação de coloração com o cloreto de alumínio. Para a reação de coloração foram adicionados em balão volumétrico (10mL) a solução hidrometanólica do extrato (2,0 mL), ácido acético glacial (0,24 mL), solução de piridina–metanol (20:80) (4,0 mL) e solução metanólica de cloreto de alumínio anidro a 8% (1,0 mL). O volume do balão volumétrico foi completado com metanol (RUSAK, et al., 1993; LEITE, 2002; LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Após agitação do extrato e trinta minutos de repouso, realizou-se a leitura da absorbância das réplicas no comprimento de onda de 415 nm, frente às soluções de compensação, sendo estas preparadas para anularem a interferência da coloração natural do extrato. Para cada réplica, prepara-se uma solução de compensação, que contém todos os componentes da solução de leitura, exceto a solução metanólica de cloreto de alumínio anidro a 8%.

Os dados de absorvância das amostras foram comparados a uma curva padrão, construída a partir de soluções com concentrações crescentes de quercetina. Esta curva analítica para flavonoides foi obtida a partir das concentrações finais de solução de quercetina: 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL, sendo todas as leituras efetuadas em λ 415 nm.

4.6 Obtenção do perfil cromatográfico qualitativo do extrato liofilizado por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)

Por meio da CLAE foi realizada a análise qualitativa dos componentes flavônicos do extrato etanólico liofilizado de *Calendula officinalis*. As substâncias flavonoídicas de referência utilizadas para comparação foram a rutina, quercetina, naringina, hesperidina, morina, daidzeína, genisteína e kaempferol. As análises foram realizadas no laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica-UFV. Para separação cromatográfica foi utilizado um sistema de cromatografia de alta eficiência (LC-DAD) Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M20A, forno CTO-20 A), programa LabSolutions. O perfil dos extratos foi obtido utilizando-se coluna Shim-pack VP-ODS de 150 × 4,6 mm, fase reversa (C₁₈), partículas de 5 µm e pré-coluna Shim-pack GVP-ODS de 10 x 4,6 mm. Para o aprimoramento do perfil cromatográfico do extrato, buscou-se estabelecer as condições adequadas na técnica de CLAE-DAD, além de realizada a comparação com o perfil de substâncias flavonoídicas de referência, nas mesmas condições. Para tanto o método passou por otimização, sendo avaliada a influência de alguns parâmetros na resolução cromatográfica dos picos de interesse. Diversos sistemas eluentes e condições cromatográficas de análise foram testados, a fim de ser obtido o melhor perfil de separação e resolução, dos possíveis flavonoides presentes no extrato. Foram utilizadas variações na temperatura, fluxo, modo de eluição (isocrático e/ou em gradiente), concentração de ácido acético e pressão na fase móvel. Os picos de interesse foram comparados pela injeção de substâncias de referência, comparando seus tempos de retenção e espectros no UV-Vis obtidos *online* pelo detector DAD. Para o método eleito, foi utilizada temperatura no forno de 40°C e a fase móvel final foi constituída por ácido acético 0,5% (v/v) em água

ultrapura (A) e metanol (B), eluição em gradiente, com velocidade de fluxo de 1,0 mL/min.

O gradiente foi estabelecido com fase móvel consistindo de (A) Água + Ácido acético 0,5% (v/v) e (B) metanol com condição inicial em 35%. A fase móvel foi, em seguida, aumentada linearmente até 50% B em quinze minutos, sendo mantida nesta concentração por um minuto e em seguida, aumentando para 90%, depois retomando as condições iniciais em vinte minutos.

O extrato foi solubilizado em metanol, previamente filtrado em membrana para seringa Millipore® (0,45µm). Uma alíquota de 40µL desta solução metanólica do extrato foi injetada para obtenção do *fingerprint* e determinação analítica. A detecção dos picos foi registrada em 254 nm e os espectros de UV-Vis avaliados em comprimentos de onda entre 200-400nm para verificação dos componentes da planta. Com base nos resultados físico-químicos de absorção na região UV-visível/CLAE, foi possível obter o perfil cromatográfico qualitativo do extrato.

4.7 Atividade antioxidante do extrato: Método colorimétrico *in vitro* de redução do ABTS⁺ (capacidade antioxidante equivalente ao trolox- TEAC)

O ensaio TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) foi demonstrado por Miller e cols. (1993) e modificado por Re e cols. (1999). Neste método, o radical cátion ABTS⁺ é produzido pela reação do ABTS (Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈), como demonstrado na Figura 3. Esta reação, que dá origem ao radical ABTS⁺, inicia-se no dia anterior à análise (12 a 16 horas antes), ocorrendo no escuro para que o radical seja formado.

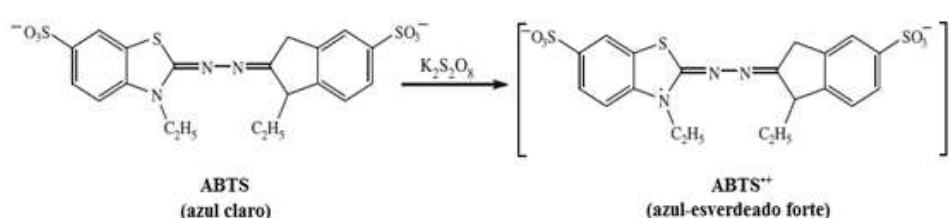


Figura 3. Oxidação do ABTS com K₂S₂O₈ e a formação do ABTS⁺.

Fonte: Gulçin, 2012.

O radical cátion $ABTS^+$, em solução, possui coloração azul-esverdeado forte com picos de absorção em 415, 645, 734 e 815 nm. A adição de substâncias antioxidantes a solução contendo o cátion pré-formado o reduz, o que resulta em um decréscimo da absorbância à 734 nm, sendo este decaimento monitorado. Trata-se de uma reação cinética, onde o percentual de inibição de $ABTS^+$ é determinado em função da capacidade antioxidante, da concentração e do tempo. No caso, a medida é relativa à reatividade do Trolox, como padrão e sob as mesmas condições, sendo o teste denominado TEAC (RE, et al, 1999).

O Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico) é um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol conhecido pelo seu alto poder antioxidante (Figura 4).

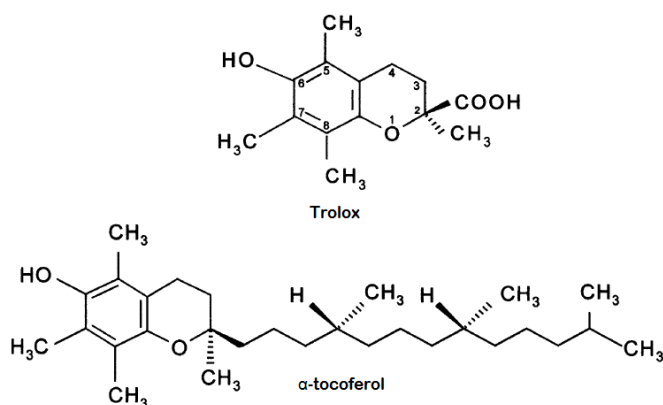


Figura 4. Estruturas químicas do Trolox e do α -tocoferol.

Fonte: Malyszko e Karbarz, 2006.

Neste ensaio a solução de Trolox foi preparada em metanol, em concentração 5 mg/mL (p/v) e, a partir da diluição com o mesmo solvente, obteve-se as concentrações testadas (0,75 - 6 μ g/mL). O extrato foi preparado em diferentes concentrações (30 - 150 μ g/mL), em triplicata, utilizando-se metanol como solvente. Para a reação, 30 μ L de solução do extrato ou do padrão Trolox, nas concentrações testadas, foram adicionados a 2970 μ L da solução de trabalho $ABTS^+$. Em seguida, as absorbâncias em λ 734 nm foram obtidas (Abs_{teste}) em função do tempo (a cada 30 segundos, durante 5 minutos de reação). Uma solução de metanol (30 μ L) e $ABTS^+$ (2970 μ L) foi utilizada como controle ($Abs_{controle}$).

Para evitar a supra ou subestimação da atividade antioxidante, as porcentagens de inibição foram calculadas usando-se uma “rede” das áreas integradas sob as curvas de decaimento de absorvância (AUC) para cada concentração testada de amostra, de Trolox e de controle. Neste tratamento dos dados, levam-se em consideração as absorvâncias medidas a 734 nm, de 30 em 30 segundos, em um tempo total de 5 minutos de reação, representando, assim, o tempo de latência, velocidade inicial e a extensão total de inibição em um único valor. Os gráficos das porcentagens de inibição assim calculadas *versus* concentrações testadas foram construídos para obter-se, pelo método dos quadrados mínimos, a equação do gráfico. Desta forma, obtém-se o coeficiente de inclinação para cada réplica testada e para o Trolox, o qual representa a magnitude da interferência da variante X (concentração) sobre a variante Y (% de inibição da formação do radical ABTS⁺), em função do tempo de reação (RE, et al, 1999).

$$\% \text{ Inibição} = [(AUC_{\text{controle}} - AUC_{\text{teste}}) / AUC_{\text{controle}}] \times 100$$

AUC_{controle} é a soma das áreas sob a curva para a solução controle medidas durante 5 minutos de reação (metanol + solução de ABTS⁺) e AUC_{teste} é a área somada sob a curva para a solução do extrato, em cada concentração testada, medidas durante 5 minutos de reação (amostra + solução de ABTS⁺).

Construiu-se um gráfico com os valores das médias do percentual de inibição em função das concentrações para o extrato analisado e para o Trolox. A partir da razão entre os valores do coeficiente de inclinação para a amostra do extrato (α_{amostra}) e para o Trolox (α_{Trolox}), obtendo-se o valor TEAC (VASCONCELOS, et al, 2007).

$$TEAC = \frac{\alpha_{\text{amostra}}}{\alpha_{\text{Trolox}}}$$

A unidade de atividade TEAC é adimensional e pode ser definida como a concentração da substância antioxidante que gera a mesma porcentagem de

inibição da absorvância do ABTS⁺ em 734 nm que uma solução Trolox a 1,0 mM, em um tempo determinado (RE, et al., 1999).

As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro Biospectro SP-220.

4.8 Obtenção da formulação fitoterápica (*Calendula officinalis*) e padronização de doses

A formulação fitoterápica foi produzida contendo veículo comercial aquoso, sendo utilizado para solubilizar as substâncias testadas (flavonoides e demais compostos do extrato de *Calendula officinalis*) (CASTRO, 2012). O veículo continha propilenoglicol 20%, carboximetilcelulose 0,4%, metilparabeno 0,1%, propilparabeno 0,05%, sacarina 0,03%, água purificada (para volume 100mL solução). Até a utilização nos animais, a solução em concentração 10% foi armazenada em frasco de vidro âmbar em geladeira.

4.9 Ensaio *in vivo*

4.9.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, classe Mammalia, ordem Rodentia, procedentes do Biotério Central do Departamento de Veterinária (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde), da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. Todos os procedimentos foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA/UFV), protocolo 09/2014 (anexo A), sendo o experimento conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estando em conformidade com diretrizes brasileiras que envolvem o uso de animais em pesquisa (Lei nº 11.794/2008). Tentativas vigorosas foram feitas para minimizar o sofrimento e fontes externas de dor e desconforto. Além disso, foi utilizado o número mínimo indispensável de animais para produzir dados científicos confiáveis.

4.9.2 Dieta hiperlipídica

A indução da dislipidemia nos animais ocorreu por administração de dieta hiperlipídica/ cafeteria (Tabela 1), seguindo o modelo experimental desenvolvido por Turchetto e cols. (2013) e Reynés e cols. (2014) ofertada *ad libitum* aos animais durante todo o experimento (período de indução e tratamento).

Tabela 1. Composição da dieta de cafeteria (g/1000g de dieta).

Ingredientes	Quantidade (g)
Patê de presunto	223
Batata frita palha	111
Bacon	111
Mortadela	111
Biscoito maisena	111
Achocolatado em pó sabor chocolate	111
Leite integral em pó	111
Ração comercial	111

Toda a dieta proposta nesta pesquisa foi confeccionada manualmente, com o auxílio de um moinho de facas e multiprocessador caseiro para o processamento dos ingredientes sólidos, sendo embalada em papel filme, mantida sob congelamento (-18 a 0°C) e protegidas da luz para evitar oxidação até o momento da utilização, respeitando-se o prazo de validade de seus componentes.

4.9.3 Divisão dos grupos

Foi empregado o delineamento experimental aleatório em sete grupos. Trinta e cinco foi o número total de animais no experimento (7 grupos com n=5).

4.9.4 Delineamento experimental

Foram submetidos à experimentação trinta e cinco ratos Wistar machos, com aproximadamente quarenta dias de idade, peso médio de 120g, divididos em sete grupos conforme descrito na tabela 2. Os animais ao chegarem ao biotério

passaram por um período de adaptação de doze dias recebendo ração comercial marca Presence[®] e água *ad libitum* e foram distribuídos aleatoriamente, em gaiolas individuais, de material polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável, cama do tipo maravalha, temperatura média de 22°C, sendo mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de doze horas claridade/escurecimento). O experimento foi dividido em duas fases: indução da dislipidemia por dieta hiperlipídica/ cafeteria (45 dias) e tratamento com formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* (20 dias). O grupo controle negativo (G1) recebeu somente ração comercial Presence[®] por todo o período de experimento (Grupo basal ou normolipídico). Já o grupo controle positivo (G2) recebeu somente dieta hiperlipídica, sem nenhum tipo de tratamento. Havia, ainda, um grupo submetido a tratamento com atorvastatina (10 mg.kg⁻¹) (G3) e um grupo (G4) que recebeu dieta hiperlipídica e administração via oro gástrica (gavagem) somente do veículo da formulação. Após o 45° dia de indução, foi iniciado o tratamento diário dos animais que durou 20 dias. Três dos sete grupos foram submetidos a tratamento com três diferentes dosagens (50, 100 e 150 mg/kg) da formulação fitoterápica contendo extrato etanólico de *Calendula officinalis* (G5, G6 e G7 respectivamente). A formulação foi administrada uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, por gavagem. Os grupos 1 e 2 também receberam administração por gavagem, no entanto, não com a formulação fitoterápica, mas somente água destilada, sob as mesmas condições experimentais, para eliminar a variável do estresse sofrido pelos animais no momento desta técnica.

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos

Grupos	Dieta/ Ração e Tratamentos
G1 (Controle)	Ração comercial Presence [®] + Água destilada
G2 (Controle)	Dieta de cafeteria (DC) + Água destilada
G3	DC + Atorvastatina 10 mg/Kg
G4	DC + Veículo da formulação
G5	DC + Formulação Calêndula 50 mg/Kg
G6	DC + Formulação Calêndula 100 mg/Kg
G7	DC + Formulação Calêndula 150 mg/Kg

4.9.5 Controle da massa corporal e do consumo alimentar

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN E GÜNZEL, 1997; SILVA, et al., 2005). Diariamente, os animais foram pesados para observar o crescimento ponderal e também, na etapa de tratamento, para fins de correção da concentração do extrato a ser administrado. Também foi realizada a avaliação da ingestão alimentar. Para tanto, a dieta ofertada aos animais foi pesada diariamente, sendo que os dados obtidos da diferença entre o ofertado e o restante não consumido e sobras no fundo da gaiola foram utilizados para o cálculo do consumo alimentar. Diariamente, foram repostas água e ração. Além disto, a cada dois dias era realizada a limpeza das gaiolas para manutenção de um ambiente saudável aos animais. Todos os animais foram observados diariamente quanto a seu comportamento e aparência geral, anormalidade de sinais clínicos, avaliação de morbidade, principalmente durante o período de tratamento.

4.9.6 Eutanásia e coleta dos tecidos

Após setenta e sete dias de experimentação, os animais sofreram eutanásia, sendo previamente anestesiados (via inalatória) com isoflurano 100% para retirada do sangue, sendo esta uma anestesia segura, sem relatos de alterações na dosagem dos parâmetros bioquímicos de interesse (TOPAL, et al., 2003). Foi necessário alterar junto ao comitê de ética a anestesia, pois o protocolo foi aprovado inicialmente de modo diferente, para isso, esta correção e outras necessárias foram enviadas ao CEUA/UFV conforme anexo B.

Nas últimas doze horas antes da eutanásia, foi retirada a alimentação de todos os grupos, permanecendo os animais com livre acesso à água. Foram coletadas amostras de sangue e fígado de todos os animais. O sangue foi coletado por punção cardíaca de acordo com Weiss et al. (2000). Neste procedimento, há ocorrência de choque hipovolêmico, o que conseqüentemente, conduz à morte do animal, que demonstra ausência de movimentos de respiração.

O sangue foi centrifugado a 3500rpm, por 10 minutos à 4°C, com a finalidade de obter-se o soro, que foi armazenado à -80°C para as análises do perfil lipídico e outros parâmetros bioquímicos. O fígado foi lavado em solução fisiológica NaCl

0,9% e pesado em balança semi-analítica. Após a pesagem, um lóbulo (quadrado) foi retirado, seccionado e estocado em formaldeído 10% v/v tamponado para análises posteriores.

Para o descarte das carcaças dos animais, foram usados sacos plásticos, devidamente identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente (com o indicativo de risco biológico) e destinados ao serviço de coleta apropriado seguindo normas de Biossegurança preestabelecidas (RDC 306 ANVISA).

4.10 Análise bioquímica dos parâmetros sanguíneos

Para avaliar o efeito modulador da formulação proposta no perfil lipídico dos ratos, as concentrações de diversos parâmetros bioquímicos no soro dos animais de todos os grupos foram verificadas. Os parâmetros avaliados foram: Colesterol total (método enzimático-colorimétrico), colesterol HDL (método enzimático-colorimétrico direto), triglicerídeos (método enzimático-colorimétrico), glicose (método enzimático-colorimétrico, glicose oxidase), ácido úrico (método colorimétrico), creatinina (método colorimétrico, Jaffé modificado), aspartato aminotransferase – TGO/AST (método cinético UV), alanina aminotransferase – TGP/ALT (método cinético UV) e bilirrubina total (método colorimétrico). O resultado do colesterol-LDL foi calculado pela equação de Friedewald ($\text{LDL-colesterol} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - \text{Triglicerídeos}/5$), onde Triglicerídeos/5 representa o colesterol-VLDL (SBC, 2013), o qual também foi avaliado estatisticamente. As análises foram realizadas em equipamento multiparamétrico automático de Bioquímica, modelo BS200, Mindray, sendo que as metodologias foram direcionadas conforme recomendações do fabricante dos kits Bioclin®.

4.11 Análise histopatológica qualitativa do fígado

Os fragmentos de fígado foram fixados em formaldeído 10% v/v tamponado (solução neutralizada a pH 7,4) e, 24h após, estocados em álcool 70° INPM, desidratados com etanol em séries de 70%, 80%, 90%, 100% p/v por 5 horas cada e xilol em duas séries p/v, também por 5 horas cada. Em seguida, os tecidos foram incorporados em blocos de parafina, cortados no micrótomo numa espessura de 5µm, desparafinados em xileno e rehidratados com uma série de lavagens com

álcoois de diferentes graduações. Cada lâmina histológica foi corada com hematoxilina-eosina. As fotos foram obtidas utilizando microscópio Olympus CX30 acoplado à microcâmara digital Olympus U_CMAD3 (Tokyo, Japan) e a observação foi realizada em aumento de 400x.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism[®], versão 6. As diferenças entre os diversos tratamentos, bem como a variação de valores dos parâmetros sanguíneos foram analisados por meio de análises de variância simples (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (comparação entre as médias dos grupos entre si). Os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão (Média \pm DP) e foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (nível de significância 5%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise química do solo

A qualidade das plantas medicinais está diretamente relacionada à quantidade de princípio ativo, daí a importância da análise do solo de cultivo, sendo este um dos fatores básicos que podem impactar na produção de matéria-prima padronizada em termos de marcadores para fitoterápicos. A melhora do cultivo visa maior rendimento de compostos ativos, sendo a calêndula uma espécie promissora e o estudo de seus sistemas de produção de importância à agricultura nacional.

Na tabela 3 encontram-se os resultados da análise química do solo utilizado para cultivo da *Calendula officinalis*. A constituição química impactou positivamente na concentração de flavonoides da planta cultivada (itens 5.3 e 5.4), podendo ser tomado como base em futuros cultivos da planta em estudo.

Tabela 3. Análise química do solo utilizado para o cultivo de *Calendula officinalis* (Argissolo Vermelho-Amarelo).

Testes (unidade)	Resultados
pH (água 1: 2,5)	5,6
P (mg dm ⁻³)	36,1
K ⁺ (mg dm ⁻³)	95,0
Ca ⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	1,8
Mg ²⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	0,7
Al ³⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	0,0
Acidez potencial H+Al (Cmol _c dm ⁻³)	1,82
Soma Bases S (Cmol _c dm ⁻³)	2,74
CTC Efetiva t (Cmol _c /dm ⁻³)	2,74
CTC (Capacidade de Troca Catiônica) a pH 7 T (Cmol _c dm ⁻³)	4,56
Saturação de Bases V (%)	60
Matéria orgânica (dag kg ⁻¹)	2,3

Laudo da análise de solos, Departamento de Solos, UFV.

5.2 Rendimento da planta

Após a secagem e trituração das flores em moinho de facas, obtivemos um total de 0,643 Kg de material seco e triturado. Este material vegetal foi submetido ao processo de extração conforme descrito no item 4.3.

A obtenção do extrato bruto do material vegetal por maceração rendeu, após evaporação do solvente e liofilização, uma massa total aproximada de 100,5 g (15,6% de rendimento a partir da droga seca), sendo este excelente no caso de extração a partir de plantas medicinais.

5.3 Quantificação dos flavonoides totais

Para expressar os resultados obtidos na quantificação de flavonoides do extrato bruto etanólico, foi construída a curva analítica com base no padrão quercetina. A equação da reta encontrada foi $y = 0,0621x - 0,008$ ($R^2 = 0,999$). A curva de calibração foi realizada nas concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ e está demonstrada na figura 5.

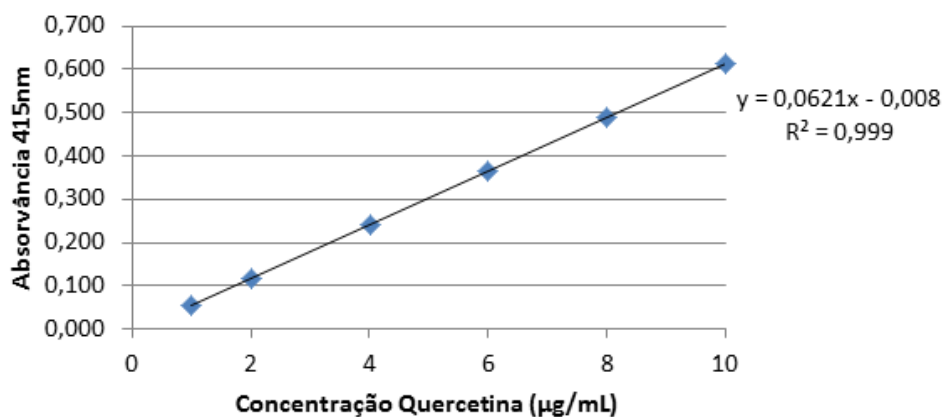


Figura 5. Curva analítica de quercetina, obtida para a quantificação de flavonoides totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível (λ 415 nm).

O teor médio do conteúdo de derivados flavonoídicos encontrado no extrato bruto liofilizado de *Calendula officinalis* (utilizado no ensaio animal) foi de 0,42%, correspondendo a $4,25 \pm 0,058$ mg de flavonoides/g de extrato, expressos em quercetina, sendo este resultado a média obtida pelas três determinações.

O resultado obtido indica que após a extração exaustiva da planta, o extrato final apresenta valor relevante de princípio ativo, que atinge o recomendado pela farmacopéia brasileira, sendo exigido por esta, o mínimo de 0,4% para a comercialização como droga vegetal. Destaca-se a presença do ácido cítrico (0,3%) como conservante dos flavonoides durante o processo de maceração, sendo um método simples, prático, econômico e aplicável a uma indústria de grande escala, promovendo teores ótimos destes metabólitos secundários (POTHITIRAT, et al., 2010; NOVELLO, 2011; VONGSAK, et al., 2013). É importante ressaltar que a grande maioria das matérias-primas vegetais provenientes de plantas de calêndula apresentam teores de flavonoides entre 0,05 e 0,1% e drogas que apresentem mais de 0,1% de flavonoides já podem ser consideradas como sendo de qualidade de acordo com Pacheco (2007). Já a legislação referente às bulas dos fitoterápicos preconiza que preparações à base de *C. officinalis* devem estar padronizadas de forma a conter 1,6 a 5,0 mg de flavonoides totais por 100 g do produto, ou seja, 0,0016 a 0,0050% de flavonoides (BRASIL, 2008). Estes dados positivos quanto aos flavonoides são reforçados ainda pelo perfil cromatográfico do extrato usado no presente estudo. A quantificação de substâncias ativas nos medicamentos ainda é realizada de forma incipiente devido à presença de fitocomplexos ativos nas plantas e seus extratos, o que dificulta a análise. Mediante este quadro, o uso de extratos padronizados em termos de marcadores específicos, que são os grupos de compostos representativos da espécie, visa garantir a homogeneidade do produto nos lotes, para melhoria da qualidade (BARA, et al., 2004). Em nossa formulação fitoterápica, os flavonoides foram utilizados como marcadores para aferir a qualidade da matéria prima (BORTOLO, MARQUES E PACHECO, 2009).

5.4 Perfil cromatográfico qualitativo do extrato liofilizado obtido por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatograma do extrato bruto liofilizado demonstrou a possível presença de flavonoides, fato este já esperado com base nas análises fitoquímicas prévias dos compostos flavonoídicos totais e dos dados disponíveis na literatura para a planta em estudo (BILIA, et al., 2002). A análise dos sinais apresentados nos espectros de ultravioleta-visível e dos tempos de retenção do extrato liofilizado em comparação com aqueles das substâncias de referência, nos permite inferir algumas

informações para o *fingerprint* do extrato liofilizado em questão, permitindo visualizar espectros que caracterizam derivados flavonoídicos na matriz em estudo.

O perfil cromatográfico qualitativo do extrato e seus respectivos tempos de retenção e espectros em UV-Vis encontram-se sumarizados nas figuras 6 e 7. Já os tempos de retenção das substâncias de referência e seus respectivos espectros em UV-Vis encontram-se na figura 8.

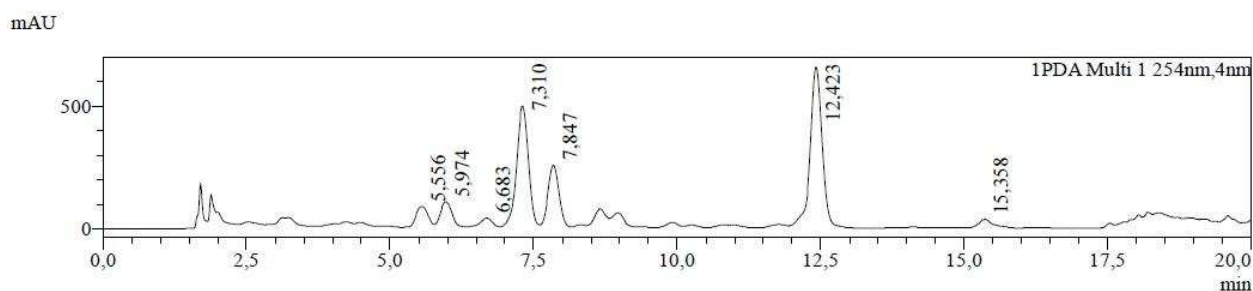


Figura 6. Perfil cromatográfico qualitativo do extrato etanólico liofilizado de *Calendula officinalis* obtido por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE). Condições cromatográficas: LC-DAD Shimadzu Prominence (bomba LC - 20 AD, detector SPD - M20A, forno CTO-20 A), programa LabSolutions, coluna Shim-pack VP-ODS de 150 × 4,6 mm, fase reversa (C₁₈), partículas de 5 μm e pré-coluna Shim-pack GVP-ODS de 10 x 4,6 mm. temperatura no forno 40°C, fase móvel constituída por ácido acético 0,5% (v/v) em água ultrapura (A) e metanol (B), eluição em gradiente, velocidade de fluxo de 1,0 mL/min.

Tempo de Retenção (min)	Espectro UV-Vis
5,556	<p>The UV-Vis spectrum for the peak at 5,556 min shows absorbance (mAU) versus wavelength (nm). The x-axis ranges from 200 to 400 nm, and the y-axis ranges from 0 to 200 mAU. Two absorption peaks are labeled at 254,8 nm and 352,9 nm. The retention time is noted as 5,556 min.</p>

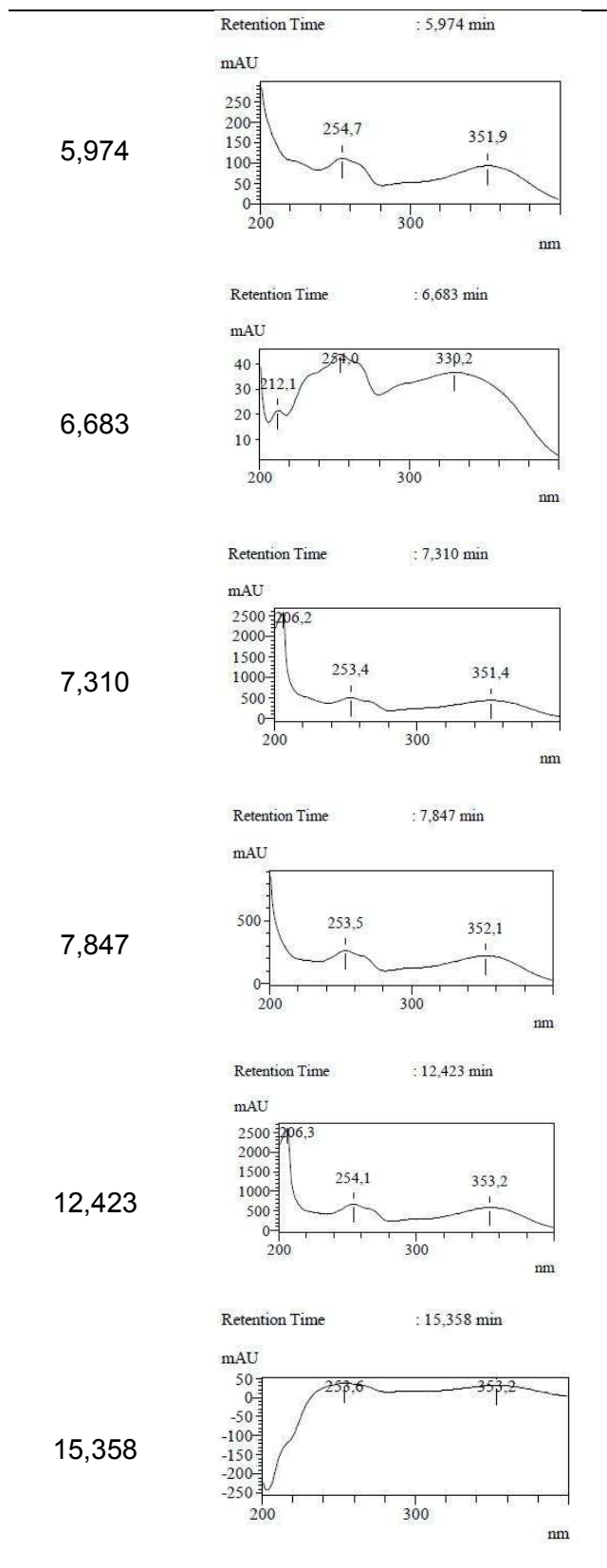
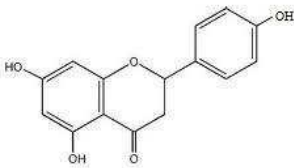
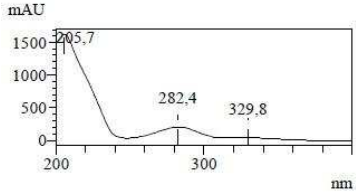
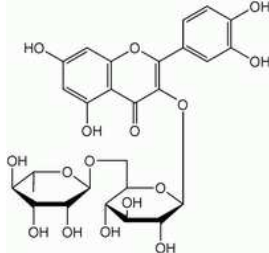
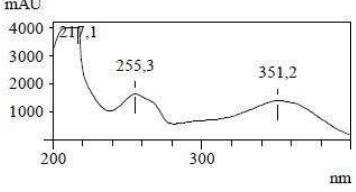
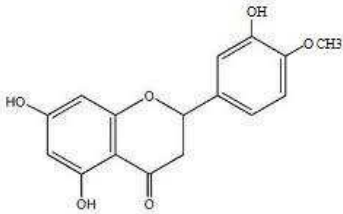
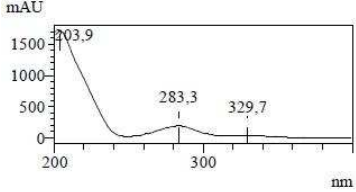
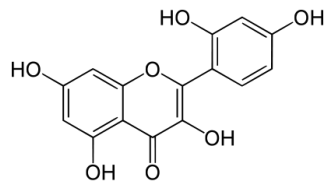


Figura 7. Espectros UV-Vis do extrato liofilizado de *Calendula officinalis* relativos a seus tempos de retenção.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Espectro UV-Vis
<p data-bbox="421 409 579 506">Naringina (flavanona)</p> 	8,603	<p data-bbox="970 472 1246 495">Retention Time : 8,603 min</p> 
<p data-bbox="437 779 558 875">Rutina (flavonol)</p> 	8,606	<p data-bbox="970 846 1246 869">Retention Time : 8,606 min</p> 
<p data-bbox="421 1182 579 1279">Hesperidina (flavanona)</p> 	9,313	<p data-bbox="970 1182 1246 1205">Retention Time : 9,313 min</p> 

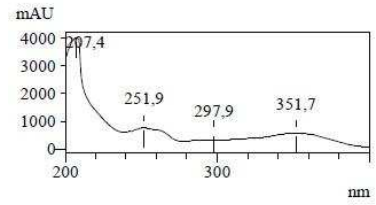
Morina

(flavonol)



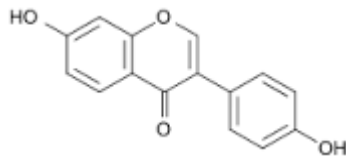
12,959

Retention Time : 12,959 min



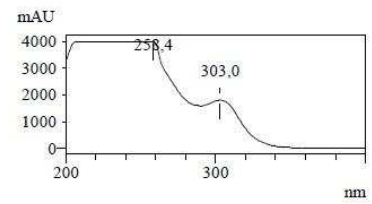
Daidzeína

(isoflavonoide)



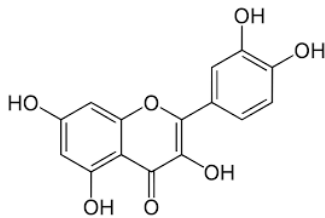
14,245

Retention Time : 14,245 min



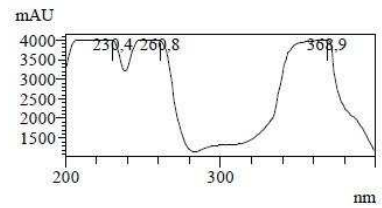
Quercetina

(flavonol)



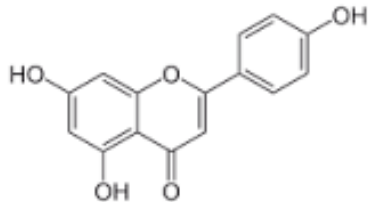
15,941

Retention Time : 15,941 min



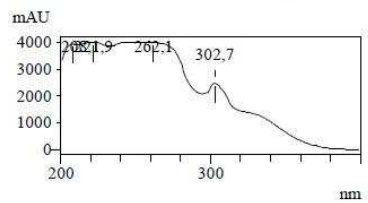
Genisteína

(isoflavonoide)



17,755

Retention Time : 17,755 min



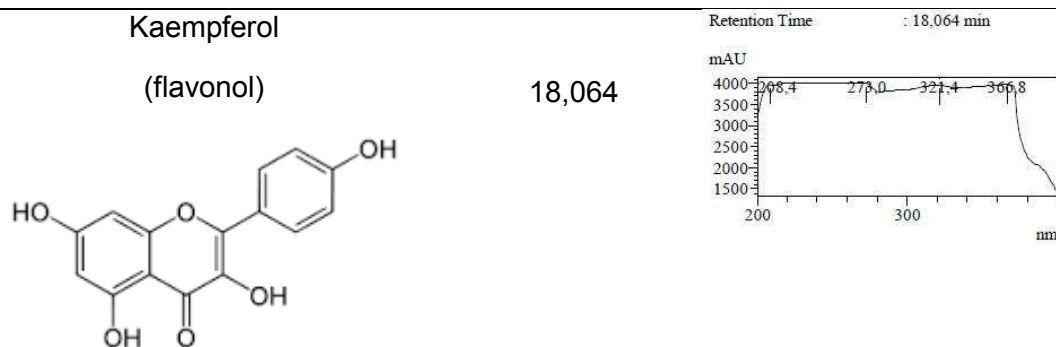


Figura 8. Tempos de retenção das substâncias de referência e seus respectivos espectros em UV-Vis obtidos por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE).

Os flavonoides, de modo geral, apresentam absorção em comprimentos de onda variados de acordo com a estrutura química, contudo a absorção entre 240-285/ 300-400nm parece ser típica desses metabólitos secundários (SIMÕES, et al., 2004). Esta informação sugere o indício da presença dessa subclasse de substâncias no extrato bruto, observando-se o perfil cromatográfico, tempos de retenção e espectros UV-Vis. Cabe ressaltar que a identificação de constituintes ativos específicos não foi obtida. A identificação destes componentes somente seria possível utilizando outras metodologias, como técnicas cromatográficas e espectroscópicas complementares.

Destaca-se no cromatograma do extrato liofilizado a presença de picos, tempos de retenção e espectros UV-Vis semelhantes aos dos padrões. O primeiro pico que merece enfoque apresenta tempo de retenção 7,847. Analisando este tempo de retenção junto ao perfil do espectro UV-Vis, é sugestiva a presença de flavonóis-O-dissacarídeo no extrato liofilizado e, também, morina e quercetina no extrato bruto da calêndula, respectivamente, em correspondência aos picos com tempos de retenção 12,423 e 15,358.

Os flavonoides são constituintes característicos da *Calendula officinalis*, família Asteraceae (RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004), estando os resultados do presente estudo de acordo com o perfil químico historicamente apresentado pela planta. A quantificação realizada em 415 nm por quercetina também é válida e nos auxilia na elucidação da presença dos componentes flavônicos no extrato utilizado no estudo animal.

5.5 Método colorimétrico de redução do ABTS⁺ (determinação da capacidade antioxidante equivalente ao trolox - TEAC)

O ensaio foi realizado utilizando-se o pico máximo de absorção $\lambda = 734 \text{ nm}$, com o objetivo de evitar-se interferências. Os resultados foram obtidos por meio de cinética de reação de redução do radical ABTS⁺, medida de 30 em 30 segundos, durante 5 minutos. Dessa forma, é possível avaliar e correlacionar o potencial antioxidante do extrato e do controle positivo, o Trolox. Assim, foi possível obter o coeficiente de inclinação para cada réplica testada e para o Trolox, o qual representa a magnitude da interferência da variante X (concentração) sobre a variante Y (% de inibição da formação do radical ABTS⁺).

O perfil cinético do Trolox demonstra um decaimento brusco da absorbância já nos primeiros 10 segundos, seguida de uma estabilização independente da concentração. O gráfico obtido encontra-se na figura 9.

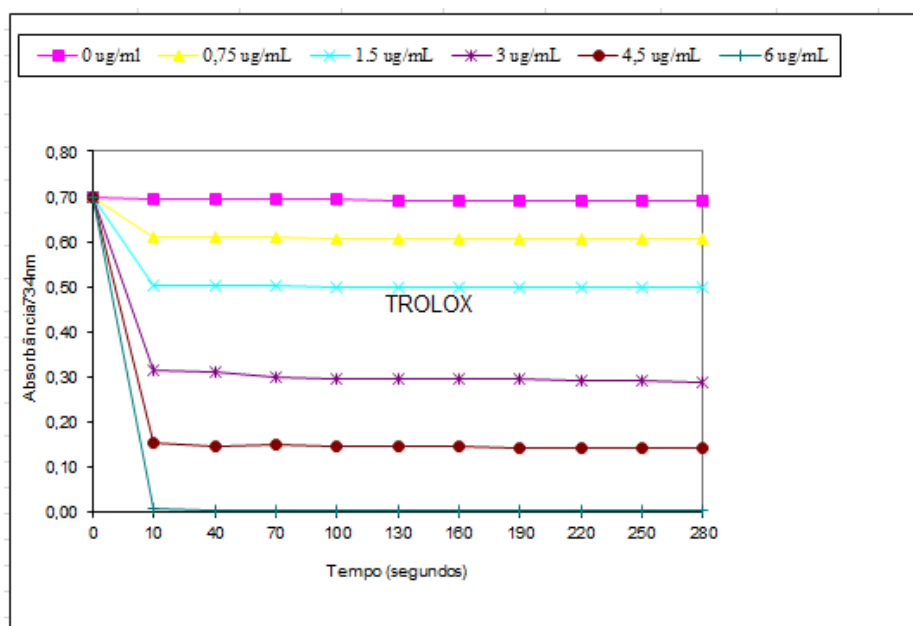


Figura 9. Cinética de reação de regeneração do radical ABTS⁺ pelo Trolox nas concentrações de 0,75 a 6 µg/mL.

O Trolox, substância usada como referência, possui uma cinética de reação com o radical ABTS⁺ bem característica. O efeito majoritário sobre a inibição da absorbância em 734 nm aparece rapidamente, logo nos primeiros 10 segundos de

reação, prossegue com menor velocidade até o primeiro minuto e logo se torna constante, como foi possível constatar.

A Figura 10 apresenta os gráficos da cinética de reação do extrato etanólico liofilizado de *Calendula officinalis* utilizado nesse estudo.

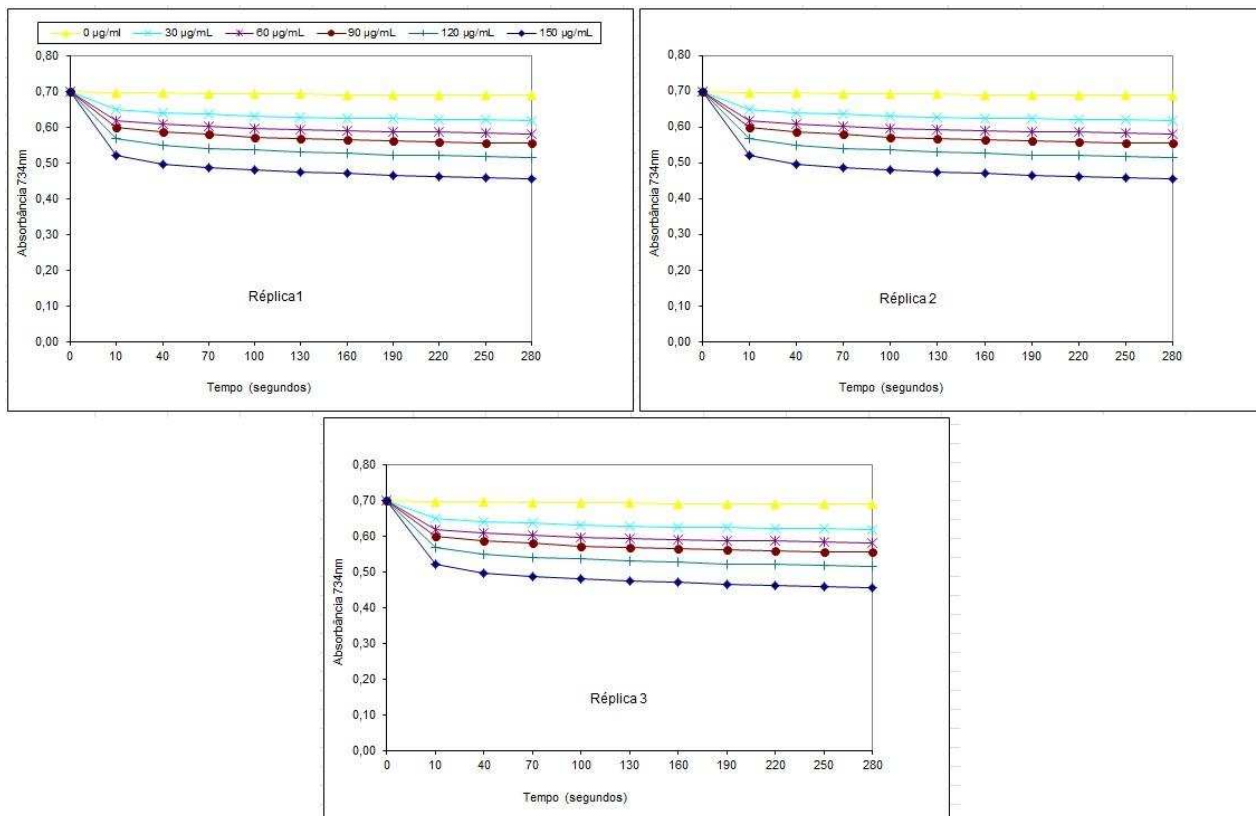


Figura 10. Cinética de reação de regeneração do radical ABTS⁺ pelo extrato etanólico liofilizado de *Calendula officinalis*.

O extrato possui ação antioxidante e a análise cinética do decaimento da absorbância é rápida nos 10 primeiros segundos, tendendo a ficar constante até o final da leitura, como demonstrado na Figura 10. Isso demonstra que o extrato etanólico das flores de *Calendula officinalis* possui metabólitos antioxidantes, sendo este fato de grande importância uma vez que, *in vivo*, espécies reativas como o radical hidroxila possuem meia-vida curta, sendo necessárias substâncias de ação imediata para sua neutralização (GUARATINI, MEDEIROS E COLEPICIOLO, 2007). Além disso, o extrato apresentou comportamento cinético semelhante ao Trolox, mas com concentrações muito superiores do que as usadas para esse padrão.

A presença de flavonóis já foi descrita na calêndula, principalmente quercetina (BILIA, et al., 2002; CETKOVIC, et al., 2004) e muitos destes podem estar

relacionados à atividade antioxidante dessa planta. Os flavonoides são substâncias dotadas de capacidade antioxidante, uma vez que a estrutura química propicia tal ação pela presença de hidroxilas fenólicas e pelo fato do radical flavonoila ser estabilizado por deslocamento de carga pelo anel aromático (COOK E SAMMAN, 1996; PIETTA, 2000; ANGHILERI E THOUVENOT, 2000; RODRIGUES, GONÇALVES E SILVA, 2004; SCHMITZ, et al., 2005; SOUSA, et al., 2007; MORAIS, et al., 2009). Além disso, há a possível correlação entre o potencial antioxidante e antiaterosclerótico, uma vez que a propriedade antioxidante desses derivados parece ser importante no tratamento da aterosclerose e doenças inflamatórias crônicas, já que o estresse oxidativo normalmente acompanha essas patologias.

O ensaio TEAC avalia a atividade antioxidante de uma amostra de acordo com o mecanismo de ação do Trolox. Sabe-se que a atividade do Trolox, assim como dos demais análogos da vitamina E, está relacionada às hidroxilas presentes no núcleo cromanol e que são capazes de doar elétrons na forma de hidrogênio (H[•]). Sendo assim, para apresentar valores altos de TEAC, as substâncias presentes na amostra devem possuir mecanismo de ação semelhante aquele do Trolox nas mesmas concentrações (RE, et al, 1999; PANNALA, et al., 2001; VASCONCELOS, et al, 2007). O valor TEAC, ou seja, atividade equivalente àquela do Trolox, foi estimado para o extrato pela determinação da relação entre os coeficientes de inclinação encontrados para o Trolox e para o extrato. A figura 11 representa esta comparação para o extrato no ensaio de redução do radical ABTS⁺ e o resultado está sumarizado na Tabela 4.

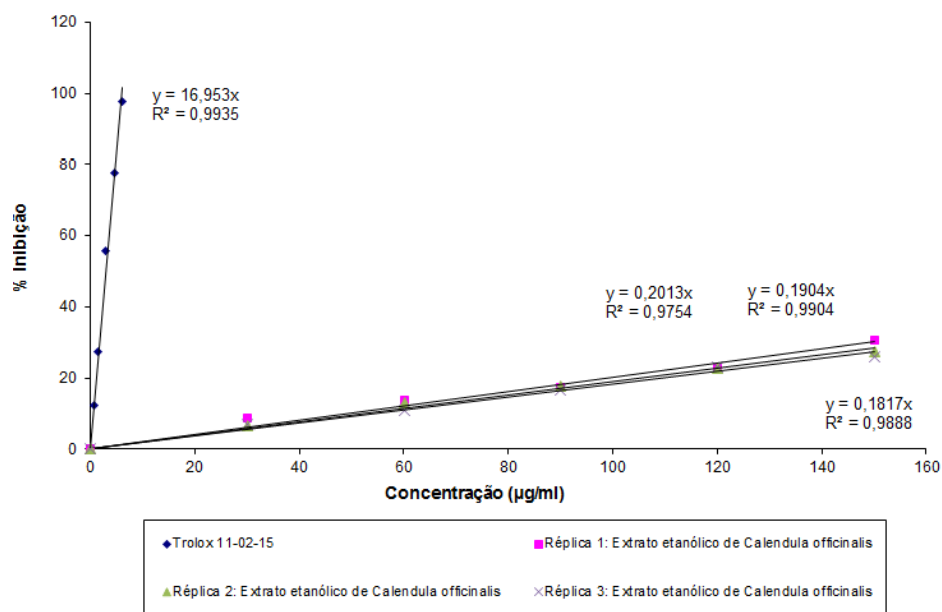


Figura 11. Comparação da % inibição obtida das três determinações no ensaio de redução do radical ABTS⁺.

Tabela 4. Valor de TEAC obtido da média das 3 determinações do extrato testado frente ao cátion radical ABTS⁺.

Amostra	TEAC	DP
Extrato etanólico de <i>Calendula officinalis</i>	0,011	± 0,001

O valor TEAC está diretamente relacionado à concentração dos ativos no extrato com mesmo mecanismo de ação do Trolox. A partir da análise dos gráficos, podemos verificar que o extrato etanólico de *Calendula officinalis* apresentou uma boa atividade antioxidante, verificada na rápida ação (10 segundos iniciais perdurando até 30 segundos de teste e tendendo a ficar constante até os cinco minutos finais), mas com baixo valor TEAC. As análises dos resultados demonstram que mesmo não apresentando valor de TEAC alto, o extrato apresenta atividade antioxidante, excelente concentração de flavonoides e perfil cromatográfico que sugerem uma boa “performance”. Dessa maneira, extratos ou frações com reduzido valor TEAC podem ser potencialmente ativos por outros mecanismos (PANNALA, et al., 2001). Além disso, muitos dos métodos de medição da atividade antioxidante não se correlacionam exatamente com a habilidade dos compostos em inibir a

deterioração oxidativa *in vivo*. Pela diversidade de tipos de radicais e os inúmeros alvos de oxidação, dificilmente haverá um método único capaz de representar de forma precisa a atividade antioxidante real de um composto. Para uma avaliação correta desta atividade em sistemas biológicos, modelos individuais devem ser desenvolvidos desde que representem as mesmas condições químicas e físicas esperadas para o sistema em análise (JUSTUS, 2014).

5.6 Avaliação da atividade hipolipemiante da formulação contendo *Calendula officinalis*

5.6.1 Controle da massa corporal e consumo alimentar

Os controles de massa corporal e consumo alimentar foram realizados diariamente, no entanto, para as análises estatísticas foram utilizados os resultados obtidos a cada três dias.

No início do experimento, não houve diferença significativa entre os pesos dos animais nos diferentes grupos ($p < 0,05$). Ao final do experimento, foi observada diferença significativa do peso corporal final em relação ao peso inicial para todos os grupos de estudo ($p < 0,05$). A figura 12 demonstra a evolução do peso corporal dos ratos Wistar durante o período total do experimento.

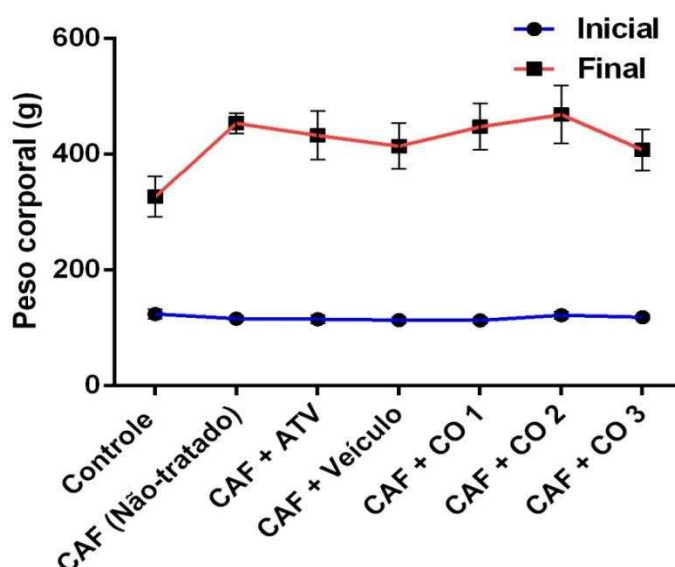


Figura 12. Evolução do peso corporal dos ratos Wistar durante o período total do experimento (77 dias). Houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre pesos iniciais e finais, teste *one way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey.

Ao final do estudo, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os pesos corporais do grupo 1 (G1) comparados aos grupos 2, 3, 5 e 6 (G2, G3, G5 e G6). Paralelamente, observamos ainda valores de consumo alimentar inferiores e estatisticamente significativos para os grupos G4 e G7 em relação aos outros grupos no período do tratamento, o que pode justificar a ausência de diferença estatística no peso corporal final entre esses grupos mencionados e o grupo 1 (controle basal). Apesar de não haver diferença estatística nos pesos de G4 e G7 em relação a G1, observa-se que o peso final médio daqueles animais foi bastante superior em relação aos desses, mas não suficiente para a significância estatística. Constata-se ainda que esta diferença foi verificada essencialmente no período de tratamento, fato observado nos gráficos 13 e 14, que demonstram, respectivamente, a evolução do peso corporal no período da indução e tratamento. Foi observado ainda que o grupo 6 foi o de maior peso corporal, sendo também o grupo com maior consumo alimentar médio.

A denominada dieta de cafeteria é um modelo de indução exógena e tem sido utilizada em pesquisa experimental com o objetivo de se aproximar o consumo alimentar de animais ao das sociedades modernas (PEREIRA, et al., 2003). Dietas hiperlipídicas, do tipo *fast-food*, ocidental ou cafeteria têm sido bastante utilizadas em estudos com modelos experimentais por serem eficazes em induzir a obesidade semelhante à humana (KRETSCHMER, et al., 2005; BURNEIKO, et al., 2006). Essa dieta apresenta grande quantidade de calorias e reduzido valor nutritivo por ser enriquecida em carboidratos e lipídios (KRETSCHMER, et al., 2005; SCOARIS, et al., 2010), podendo determinar alterações no metabolismo glicídico, lipídico e na função endotelial, induzindo o estresse oxidativo caracterizado pela inflamação, o estoque de lipídios no tecido adiposo, sendo um modelo muito útil na avaliação de dislipidemias e doenças associadas (NADERALI, et al., 2001; CESARETTI E JUNIOR, 2005; MILAGRO, et al., 2006).

Pode-se observar que a dieta de cafeteria foi eficiente na indução da obesidade nos animais em estudo, fato este verificado na diferença estatística geral comparada ao peso corporal do grupo 1 (único grupo onde não houve a administração da dieta de cafeteria). Pérez-Matute e cols. (2007) verificaram aumento significativo no peso final de ratos Wistar machos que receberam dieta de

cafeteria ao final de 35 dias, quando comparado com o grupo controle. Ao fornecer dieta de cafeteria por 42 dias a ratas Wistar, Campion e Martinez (2004) verificaram que o ganho de peso foi 29% maior no grupo cafeteria em relação ao controle não obeso. A formulação fitoterápica não influenciou na redução da massa corporal dos animais no estudo, sugerindo que o efeito dos flavonoides sobre os parâmetros bioquímicos não está relacionado à perda de peso. Esses resultados corroboram os dados obtidos por Rodrigues e cols. (2003) que não encontraram alterações na massa corporal dos ratos tratados com o flavonoide rutina.

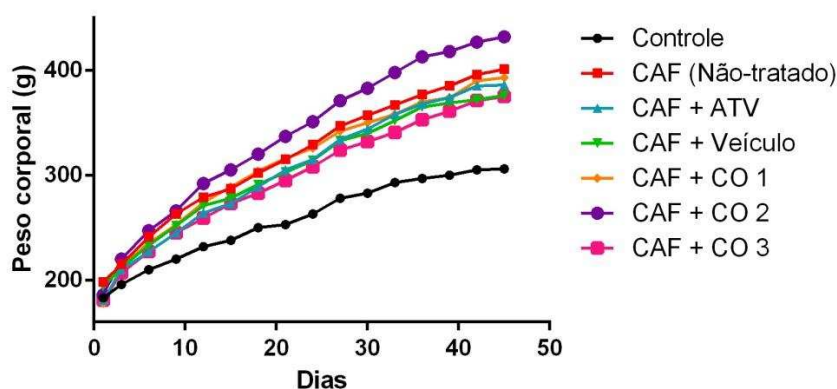


Figura 13. Evolução do peso corporal dos ratos Wistar durante o período de indução.

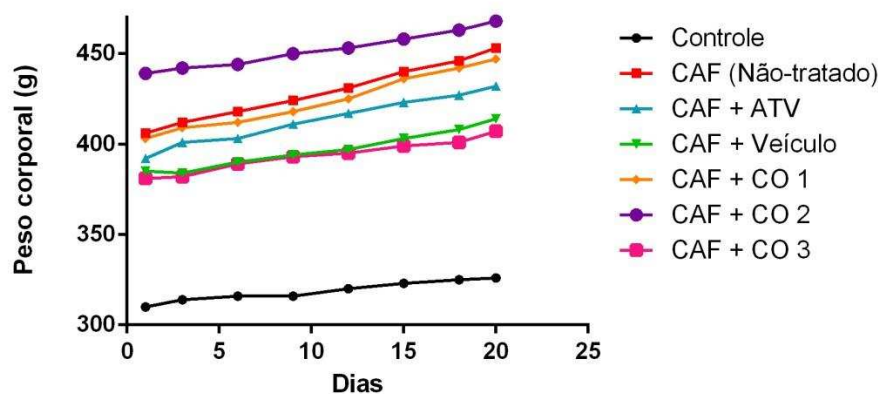


Figura 14. Efeito da administração de formulação fitoterápica de *Calendula officinalis* (50, 100 e 150 mg/kg), por via oral, sobre peso corporal de ratos Wistar por 20 dias consecutivos.

Houve diferença estatisticamente significativa no consumo alimentar médio do grupo G6 quando comparado aos grupos G4 e G7. Nota-se no início da administração da dieta de cafeteria um súbito aumento no consumo alimentar dos

grupos, visto que a dieta hiperlipídica utilizada no estudo é bastante palatável, no entanto, ao considerarmos o experimento como um todo, observa-se que o consumo da ração comercial não foi diferente estatisticamente, quando comparado ao consumo da dieta de cafeteria. Somado a isto, o consumo alimentar dos animais dos diferentes grupos de uma maneira geral tende a uma constante no final do experimento (setenta e sete dias), como demonstrado na figura 15. Contraditoriamente, outros trabalhos utilizando animais tratados com dieta de cafeteria demonstraram aumento significativo no consumo alimentar em relação ao grupo basal o que conseqüentemente, leva ao ganho de peso e aumento do tecido adiposo (BOQUÉ, et al., 2009; MACEDO, 2010).

Nas figuras 15 e 16, são demonstrados os gráficos de consumo alimentar pelos ratos Wistar, respectivamente, nos períodos de indução + tratamento e analisado isoladamente no período de tratamento. Durante o período de tratamento, houve diferença significativa no teste *one way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey nos seguintes grupos: G1 vs G4 e G7 ($p < 0,05$); G6 vs G4 ($p < 0,05$) e G7 ($p < 0,01$); G5 vs G2 ($p < 0,05$), G3 ($p < 0,05$), G4 ($p < 0,001$) e G7 ($p < 0,001$).

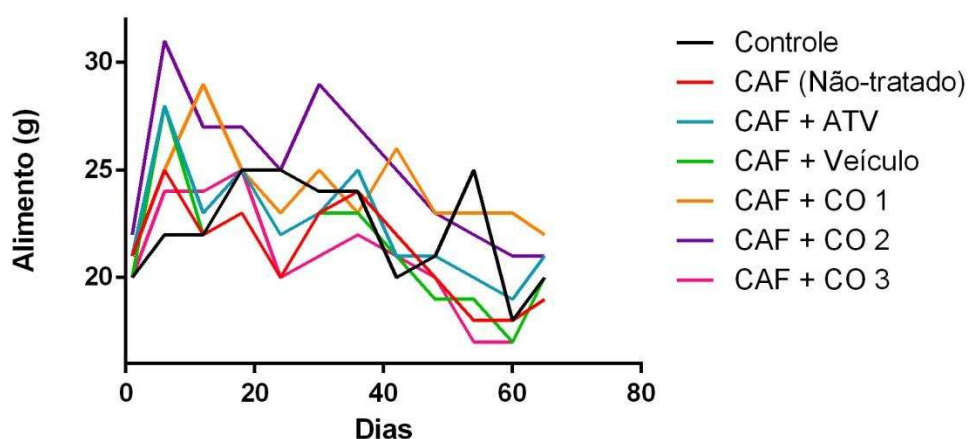


Figura 15. Consumo alimentar dos ratos Wistar durante o período de indução e tratamento. Houve diferença significativa (G6 vs G2, G4 e G7), teste *one way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey.

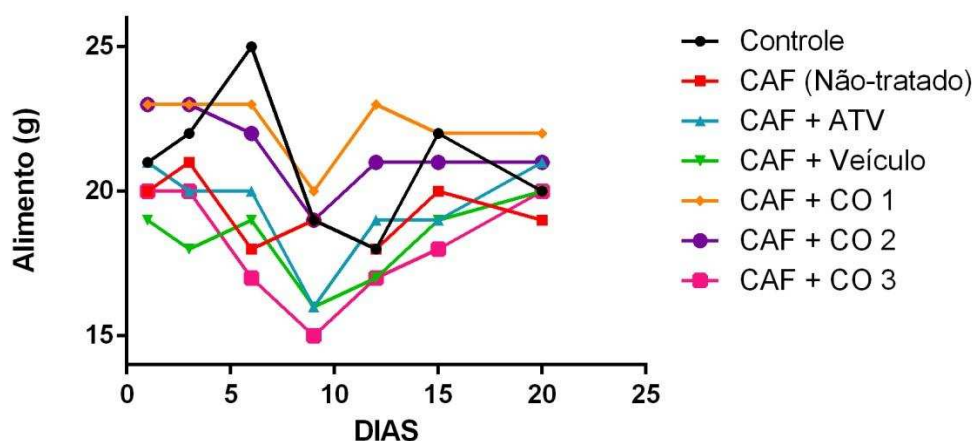


Figura 16. Consumo alimentar dos ratos Wistar durante o período de tratamento.

5.6.2 Análises bioquímicas dos parâmetros sanguíneos dos animais

A partir do soro dos ratos Wistar foram analisados os parâmetros bioquímicos do perfil lipídico (Colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, colesterol VLDL e colesterol LDL), glicose, creatinina e ácido úrico, as enzimas aspartato aminotransferase – AST/TGO e alanina aminotransferase – ALT/TGP e bilirrubina total, além da relação LDL/HDL. Os resultados estão representados na figura 17. No anexo C, encontram-se os resultados bioquímicos descritos numericamente por grupos.

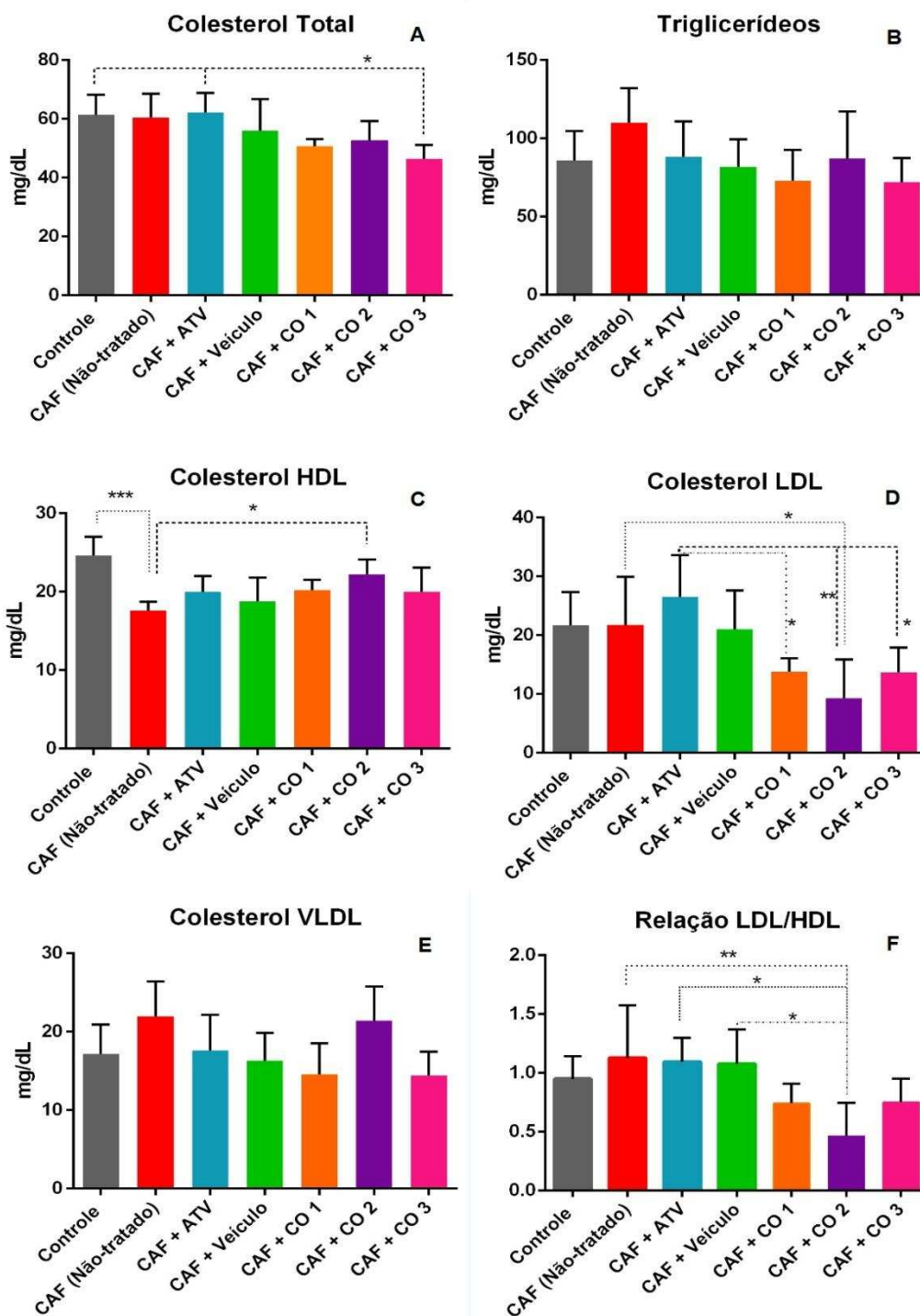
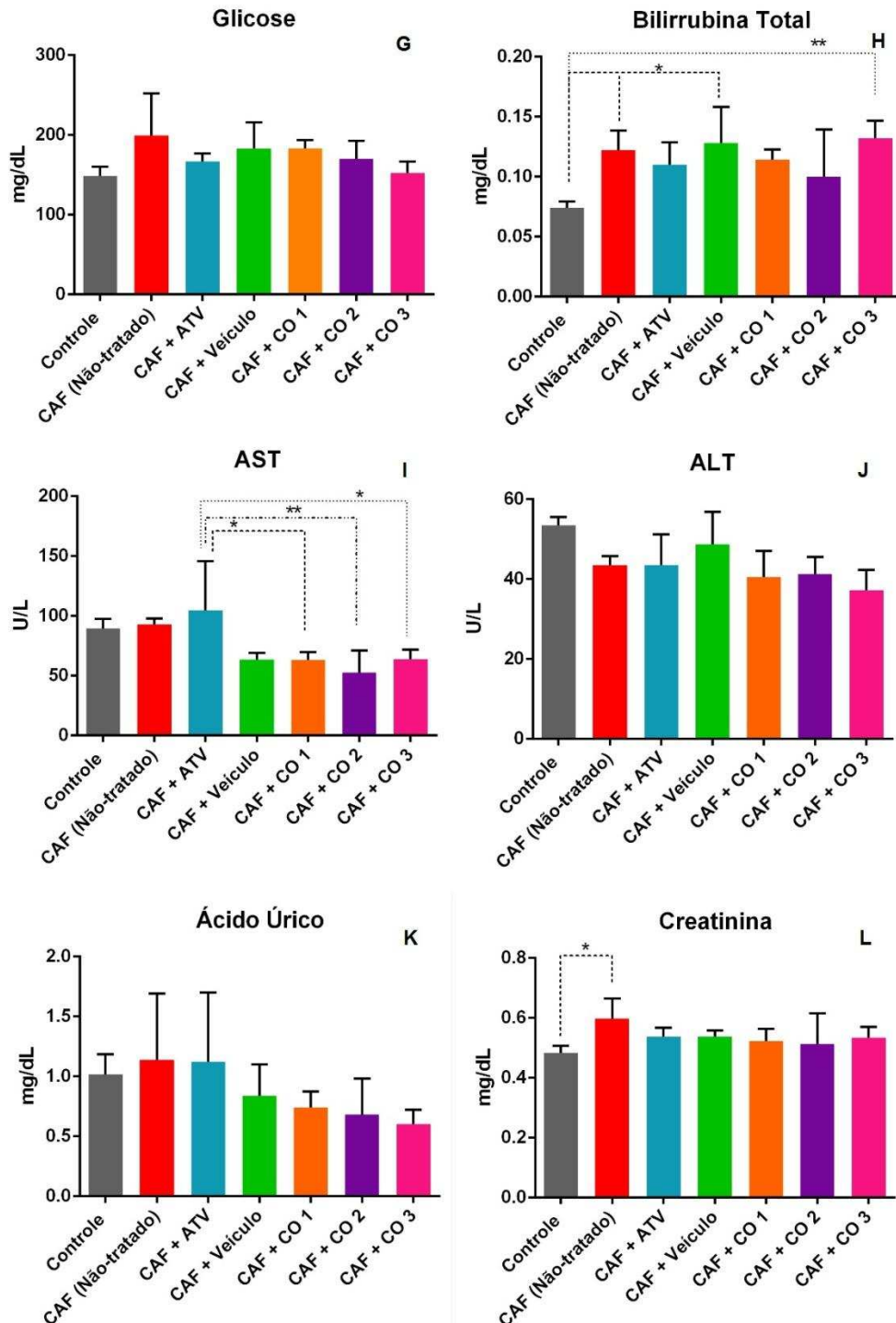


Figura 17. Efeito do tratamento com a formulação fitoterápica, contendo extrato de *Calendula officinalis* sobre os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria. Dados expressos em média \pm DP (n=5). Teste *one way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey (n=5). G1: Controle basal; G2: Dieta CAF, sem tratamento; G3: CAF+ Atorvastatina (10 mg/Kg); G4: CAF+ veículo formulação; G5, G6 e G7: CAF+ tratamento com formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* doses 50, 100 e 150 mg/Kg respectivamente. Média (mg/dL) \pm DP. Para AST e ALT: Média (U/L) \pm DP. Diferenças estatísticas nas chaves relacionadas ao grupo de comparação: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Continuação da figura 17



Dados expressos em média \pm DP (n=5). Teste *one way* ANOVA complementado pelo teste de Tukey (n=5). G1: Controle basal; G2: Dieta CAF, sem tratamento; G3: CAF+ Atorvastatina (10 mg/Kg); G4: CAF+ veículo formulação; G5, G6 e G7: CAF+ tratamento com formulação fitoterápica contendo *Calendula officinalis* doses 50, 100 e 150 mg/Kg respectivamente. Média (mg/dL) \pm DP. Para AST e ALT: Média (U/L) \pm DP. Diferenças estatísticas nas chaves relacionadas ao grupo de comparação: * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001).

Para o colesterol total, o grupo G7 foi o único que apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$), embora seja em comparação aos grupos G1 e G3 ($46,4 \pm 4,67$ mg/dL *versus* $61,4 \pm 6,8$ mg/dL e $62,2 \pm 6,69$ mg/dL, respectivamente). No entanto, em relação ao grupo controle G2 ($60,4 \pm 8,26$ mg/dL), não houve diferença estatisticamente significativa, apesar da tendência de redução observada nos grupos de tratamento (~20%), sendo este um dado interessante e clinicamente relevante que sugere possível prevenção das dislipidemias. Estes dados corroboram o estudo de Freitas (2014), que mostra que num período de indução e tratamento totalizando 50 dias, não houve diferença estatisticamente significativa neste quesito. Sagae e cols. (2013) também constataram que não houve alteração na concentração de colesterol total após dez semanas de administração de dieta de cafeteria, embora tenham sido observados redução no conteúdo de colesterol HDL e aumento no colesterol LDL. Uma elevada concentração de lipídios na dieta, pode ter induzido um “*feedback* negativo”. Desta forma, quando esta ingestão ocorreu em excesso, a concentração crescente do colesterol inibiu a enzima HMG-CoA-redutase, proporcionando assim um sistema de controle intrínseco, a fim de “evitar” aumento excessivo na concentração sérica de colesterol (MORAES, 2009). Além disto, é importante considerar que no estudo foram utilizados ratos jovens, ou seja, com metabolismo bastante acelerado, sendo que os ratos Wistar, propriamente ditos, já demonstram um metabolismo lipídico muito mais eficiente em relação aos humanos, apresentando três tipos de ácidos biliares, assim como HDLs, o que os torna ainda mais resistentes à indução da dislipidemia (AGUILA, et al, 2002). Todos estes resultados são fortemente positivos, considerando que o rato Wistar é um modelo limitado para estudo da dislipidemia. Dessa maneira, em humanos, proporcionalmente, os resultados do estudo indicam um valor clínico excepcional.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com a formulação fitoterápica (contendo o extrato de *Calendula officinalis*) e o controle G2 para triglicerídeos e colesterol VLDL, apesar de ser nítido o aumento destes parâmetros neste grupo (controle “positivo”) quando comparado ao grupo G1 (controle basal). Apesar de não haver variação estatisticamente significativa, há redução dos níveis nos grupos tratados quando comparados aos G2, o que indica

correlação clínica positiva. Yang e cols. (2009) demonstraram que animais experimentais Apo E apresentaram redução da lesão aterosclerótica sem ocorrer mudanças significativas dos níveis de colesterol total e triacilgliceróis séricos. Braz, Gutierrez e Daluz, et al. (2007) mostraram que o colesterol total e o triacilgliceróis exercem pouca ou nenhuma influência na deposição lipídica da artéria coronária em indivíduos com aterosclerose severa, justificando a redução da lesão aterosclerótica por outros fatores que não sejam a diminuição destes parâmetros. No estudo de Champion e Martinez (2004), os triacilgliceróis também não se alteraram com a ingestão de dieta de cafeteria por ratos Wistar por 42 dias.

No caso do LDL-colesterol, observamos redução nos três grupos de tratamento (G5, G6 e G7) relacionados aos outros quatro grupos (G1, G2, G3 e G4). Os grupos 5 ($13,8 \pm 2,33$ mg/dL) e 7 ($13,72 \pm 4,17$ mg/dL) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo 3 ($26,52 \pm 7,09$ mg/dL), grupo este tratado com a atorvastatina. Já o grupo que utilizou a formulação na dose 100 mg/Kg (G6) ($9,28 \pm 6,59$ mg/dL) apresentou redução significativa em relação a G3 ($p < 0,01$) mas também ao compará-lo com G2 ($21,76 \pm 8,24$ mg/dL) ($p < 0,05$), sendo esta redução de grande importância para nosso objetivo central. O fator mais importante no processo do desenvolvimento da aterosclerose consiste na presença de altas concentrações plasmáticas de colesterol na forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (GUYTON, 1997). Em seres humanos, esse nível de modulação representa um valor clínico fortemente positivo, auxiliando na manutenção dos níveis séricos adequados para que não represente um fator de risco. Segundo Kaiser e Alcantara (1998), a atorvastatina exibe as reduções mais expressivas do LDL-colesterol quando comparada às outras estatinas, baixando também significativamente os triacilgliceróis, sendo a principal escolha no tratamento da hipercolesterolemia familiar, embora esta redução eficiente não tenha sido verificada em nosso estudo. A formulação fitoterápica utilizada no ensaio *in vivo* apresentou um perfil de redução do LDL significativamente eficiente quando comparado a atorvastatina, embora não haja diferença estatística em relação à concentração plasmática de triacilgliceróis deste grupo.

Um dado bastante interessante é a diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do HDL-colesterol no grupo 2 ($17,6 \pm 1,14$ mg/dL) quando comparada ao

grupo 1 ($24,6 \pm 2,40$ mg/dL). Constata-se, assim, o efeito redutor do HDL- colesterol por meio da dieta de cafeteria (utilização desta dieta ocorreu por sessenta e cinco dias). A dosagem 100 mg/Kg foi efetiva em elevar significativamente ($p < 0,05$) o HDL-colesterol quando comparada com G2, embora todos os grupos de tratamento tenham apresentado elevação deste parâmetro. Este aumento é bastante vantajoso, uma vez que a lipoproteína HDL realiza o transporte reverso do colesterol, ou seja, remoção de colesterol dos tecidos periféricos, incluindo macrófagos e células espumosas da íntima arterial, para o fígado para excreção pela bile e fezes, além de haver estudos que comprovam o seu papel protetor na função endotelial (SILVA, et al., 2001; JEON, et al., 2004; SBC, 2013). Estudos epidemiológicos exibem relação inversa entre a incidência de doenças cardiovasculares e os níveis plasmáticos de HDL-colesterol por apresentar este, um papel antiaterogênico, atribuído às suas atividades anti-inflamatória, antitrombótica e proteção contra a oxidação das LDLs na parede arterial, papel chave na aterogênese (OLIVEIRA, et al., 2002; LEANÇA, et al., 2010). Considerando-se que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte e que estudos clínicos com estatinas revelam risco cardiovascular residual mesmo após correção das concentrações de LDL-colesterol, estratégias farmacológicas para elevar as concentrações de HDL-colesterol tornaram-se alvo de intensas pesquisas, levando em consideração que o efeito predominante das estatinas é verificado sobre os níveis de LDL-colesterol e triacilgliceróis, apresentando um efeito modesto sobre a concentração plasmática de HDL-colesterol (JEON, et al., 2004; SCHULZ, 2006; LEANÇA, et al., 2010).

Apesar de não haver redução significativa do colesterol total, triacilgliceróis e VLDL, nota-se uma tendência ao “equilíbrio” destas frações entre si. A redução em LDL e aumento no HDL, mas sem alterações nos outros parâmetros citados, é de grande valia, por serem, principalmente, as mais interessantes para o efeito anti-aterosclerótico.

A relação LDL/HDL é um dos tipos de indicadores de risco cardiovascular mensurados (JEON, et al., 2004; MACEDO, 2010). Esta relação determina o grau de disfunção endotelial na microcirculação coronária, indicando que o HDL exerce um efeito protetor neste sentido. Baixos níveis de HDL-colesterol contrapostos com elevadas concentrações plasmáticas de LDL-colesterol estão consistentemente

relacionados com aumento do risco de eventos cardiovasculares. Com isso, sabe-se que quanto maior é a relação LDL/HDL, maior é o risco de ocorrer estas doenças (CASTELLI, et al., 1986; SBC, 2013). Com relação a este parâmetro, o grupo G6 apresentou redução significativa em comparação aos grupos G2, G3 e G4. Portanto, o consumo da formulação contendo o extrato de calêndula liofilizado na dose de 100 mg/Kg reduziu o risco cardiovascular quando comparado ao grupo G2 que ingeriu a dieta, mas não passou por tratamento, sendo mais eficiente que a atorvastatina.

Para a glicose, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, mesmo observando-se a tendência biológica no aumento da concentração deste parâmetro no grupo G2, indicando apenas que a dieta de cafeteria iniciou as alterações nos padrões de glicose. Assim, não notamos impacto estatisticamente significativo, embora haja redução nas concentrações deste parâmetro proporcionalmente ao aumento da dose após o tratamento com a formulação fitoterápica. Estes dados estão de acordo com Pérez-Matute e cols. (2007), que não verificaram alterações nos níveis de glicose plasmática em ratos alimentados com dieta de cafeteria por cinco semanas. De acordo com Campion e Martinez (2004), após 42 dias de experimento com dieta de cafeteria não foram verificadas alterações nos triacilgliceróis e na glicemia em ratos Wistar. Chakraborty, Arora e Majee (2011) avaliaram a ação hipoglicêmica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Calendula officinalis* em ratos diabéticos, a uma dose de 100 mg/kg de peso corporal, que resultou numa redução significativa da glicose no sangue, glicosúria e lipídios séricos nos ratos diabéticos (indução por aloxano). Há estudos que demonstram que animais obesos não apresentam aumento da glicemia por um mecanismo compensatório aumentando os níveis circulantes de insulina para compensar sua ação reduzida e manter a normoglicemia (MACEDO, 2010).

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros bioquímicos, notamos médias de porcentagens de variação que merecem destaque em nosso estudo. Para glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triacilgliceróis e LDL-colesterol observamos médias de variação, respectivamente, de 15,5%, 17,3%, 18,2%, 29,6% e 43,6%. Estes resultados e porcentagens de variação demonstram que a formulação apresentou um ótimo resultado, clinicamente

relevante e, especialmente, na dose 100 mg/Kg apresenta efeito hipolipêmico em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria.

Para a bilirrubina total, marcadora de lesão hepática, nota-se aumento em todos os grupos quando comparados ao grupo basal (G1). Entretanto, comparando-se a este grupo, houve aumento com significância estatística ($p < 0,05$) em G2, G4 e G7, demonstrando que a formulação de maior dose (150 mg/Kg) mostrou-se com maior tendência a toxicidade ao fígado. Para as enzimas utilizadas como marcadoras de hepatotoxicidade (AST e ALT), não foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos tratados com a formulação em relação aos grupos controle. Merece destaque o nível mais elevado e significativo estatisticamente ($p < 0,05$) da enzima AST no grupo tratado com a atorvastatina, quando comparado aos grupos tratados com a formulação rica em flavonoides (G5, G6 e G7), sugerindo que o fitoterápico com base de *Calendula officinalis* apresentou menor risco de toxicidade hepática em relação a atorvastatina. No entanto, a dose de 150 mg/Kg apresentou aumento em bilirrubina total. Dessa forma, somente as doses de 50 e 100 mg/Kg seriam superiores em relação a este quesito. Silva e cols. (2005) estudaram os efeitos dos parâmetros de toxicidade hepática em ratas Wistar após administração do extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* para doses de 0,25, 0,5, e 1,0g/kg e verificaram aumentos de ALT, respectivamente, de 62,3, 30,2 e 44,4%, apesar das dosagens serem bem superiores às utilizadas em nosso estudo. 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, citoplasmática. 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 (SILVA, et al., 2007). No presente estudo, a atividade das enzimas foi utilizada para investigar se haveria alguma resposta tóxica aguda dos hepatócitos frente à ingestão da calêndula. Como não ocorreram alterações nessas medidas enzimáticas, podemos afirmar que, o nível de administração utilizado nesse trabalho não foi suficiente para causar resposta hepática aguda que resultasse em lesão tecidual, quando avaliado

pelas aminotransferases. É importante destacar que a toxicidade real da formulação deve ser melhor investigada e sempre com relação aos animais sadios.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento (G5, G6 e G7) relacionados aos grupos controle (G1 e G2) para os marcadores utilizados para nefrotoxicidade (ácido úrico e creatinina). No entanto, observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) para a creatinina no grupo 2 quando comparado ao grupo 1, sugerindo um possível dano renal relacionado à dieta de cafeteria que deve ser melhor avaliado. O aumento dos níveis plasmáticos de creatinina pode ser indicativo de sobrecarga renal aguda, insuficiência renal ou um aumento no catabolismo proteico (SILVA, et al., 2007).

Os resultados demonstraram uma ação benéfica da formulação fitoterápica (contendo o extrato liofilizado de *Calendula officinalis*) administrada por via oral, durante vinte dias, em ratos Wistar. Todos os grupos tratados apresentaram melhorias no perfil lipídico sérico, no entanto, somente foram obtidos resultados estatisticamente significativos (valores inferiores de LDL e superiores de HDL) em relação ao grupo 2 (administração de dieta de cafeteria e sem nenhum tipo de tratamento) para o grupo de dosagem 100 mg/Kg (G6). Estes animais apresentaram os melhores e mais eficazes resultados quando comparados ao grupo controle “positivo”, demonstrando melhor efeito terapêutico nesta pesquisa. Acredita-se que o extrato estudado possui propriedades importantes que dificultam o processo de aterosclerose. Além disso, não houve indícios de possíveis efeitos nefro e hepatotóxicos agudos na dosagem de 100 mg/Kg. Ainda que o mecanismo de ação não tenha sido pesquisado neste estudo, demonstrou-se que a utilização do extrato de calêndula enriquecido em flavonoides possa gerar ótimos resultados na dislipidemia. Pode gerar produtos com baixo custo de aquisição, não apresentando, inclusive, efeitos adversos como os fármacos utilizados atualmente na hiperlipidemia (estatinas isoladas ou em associação, principalmente).

A comprovação de dados em modelos animais por meio da pesquisa científica relativa às propriedades hipolipemiantes da calêndula é recente, e os dados disponibilizados, que são poucos, fazem referência a estudos *in vitro* ou em modelos de *Diabetes mellitus* (ratos diabéticos aloxano induzidos), utilizando extrato das folhas desta planta (CHAKRABORTHY, ARORA E MAJEE, 2011). Os

flavonoides podem corrigir parâmetros bioquímicos do metabolismo lipídico. Há evidências que o extrato de *Calendula officinalis*, que é rico em flavonoides, pode gerar melhora da dislipidemia, que é um grande fator de risco para a aterosclerose (PIZZIOLO, et al., 2011).

Os resultados obtidos são concordantes com os estudos de Jeon e cols. (2004), onde o flavonoide naringina reduziu significativamente os níveis de LDL-colesterol em coelhos alimentados com 0,5% de dieta rica em colesterol, enquanto aumentou significativamente a fração HDL-colesterol em comparação com o grupo controle, sendo que a concentração de triacilgliceróis no plasma não foi afetada por qualquer tipo de tratamento. De acordo com Oliveira e cols. (2002), flavonoides como a quercetina inibem a oxidação e citotoxicidade da LDL *in vitro*, assim como reduzem os teores de lipídios em ratos, já a rutina demonstrou efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica. Estes dois flavonoides citados são comprovados como potentes inibidores da agregação plaquetária em animais. Alguns flavonoides podem inibir ainda a enzima ciclooxigenase, impedindo a formação das prostaglandinas e leucotrienos e diminuindo, conseqüentemente, a formação de processos inflamatórios.

Há grande variação nos resultados de parâmetros bioquímicos relativos às dietas hiperlipídicas relatados na literatura. Esta diversidade de dados pode ser decorrente da utilização de protocolos de dieta diferenciados, onde há variação do tempo de aplicação ou composição das dietas ou ambos (MACEDO, 2010).

A ação hipolipidêmica do extrato de calêndula liofilizado também tem sido descrita para outros alimentos ricos em compostos fenólicos, tais como chá verde, maçã e uva vermelha (APRIKIAN, et al., 2002; NAISSIDES, et al., 2004; BOSE, et al., 2008). Esses autores sugerem que compostos fenólicos inibem a absorção intestinal de lipídios da dieta por formarem complexos com essas biomoléculas e assim interferem no processo de emulsificação, solubilização e hidrólise das micelas. Um outro mecanismo possível é o aumento da excreção biliar e fecal de colesterol e *up regulation* de receptores de LDL hepáticos (ALI e BLUNDEN, 2003; POURGHASSEM- GARGARI, et al., 2009;. ASGARY, et al., 2013).

Há diversas hipóteses acerca da atividade biológica dos compostos bioativos, de mecanismos de ação dos flavonoides relativos ao metabolismo lipídico. Um dos

mecanismos atribuído a estes compostos é a inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), o que resulta no aumento do número de receptores hepáticos para LDL, aumentando a endocitose e, conseqüentemente, reduzindo o nível plasmático de colesterol-LDL (KIRK, et al., 1998; SILVA, et al., 2001; OLIVEIRA, et al., 2002; SCHWERTZ, et al., 2012). Outro seria a atuação na elevação da atividade do sistema mitocondrial hepático, com o conseqüente aumento do metabolismo lipídico favorecendo a excreção de colesterol do fígado, pela formação dos sais biliares. Uma justificativa para esse resultado seria a ação dos flavonoides sobre a inibição da lipase pancreática, impedindo a absorção de lipídios em nível intestinal, o que gera maior excreção de gordura nas fezes (PINTO, et al., 1999). Lima e cols. (1999) determinaram a atividade de lipase na presença de diferentes flavonoides e detectaram que, em presença da rutina (flavonoide possivelmente presente na formulação utilizada no estudo), não houve aumento significativo da atividade da lipase ($p < 0,05$) para nenhuma das concentrações de substrato usadas. Dessa forma, pode-se inferir que este não foi um mecanismo de ação presente neste trabalho, uma vez que em casos de ativação da lipase, esses autores verificariam uma redução nos níveis de triacilgliceróis, o que não foi observado.

Há estudos que relatam o efeito sinérgico da rutina e quercetina (flavonoides possivelmente presentes em nosso extrato) com a vitamina C, potencializando a ação antioxidante desses flavonoides no organismo (APRIKIAN, et al., 2002; BECHO, MACHADO E GUERRA, 2009; SCHWERTZ, et al., 2012). De acordo com Terao (2009), o mecanismo de atividade antioxidante dos compostos flavônicos envolve o sequestro direto de espécies reativas de oxigênio, bem como a inibição de enzimas oxidativas que as geram, podendo oxidar o LDL. Outros estudos também têm demonstrado que esses flavonoides inibem a biossíntese de eicosanóides (resposta antiinflamatória) e previnem agregação plaquetária (SILVA, et al., 2001).

Akila e Devaraj (2008) sugerem que extratos ricos em compostos fenólicos atuam no aumento da atividade da enzima 7α -hidroxilase hepática, limitante da velocidade da biossíntese dos ácidos biliares, estimulando a conversão de colesterol nestes compostos, representando o mecanismo mais importante do catabolismo de

colesterol, por promover o aumento de sua excreção fecal, explicando assim, a redução de colesterol total, LDL e VLDL no soro de ratos.

Um outro mecanismo bastante interessante é o da enzima paraoxonase (PON), devido a sua ligação ao perfil lipídico e seu efeito protetor como antioxidante da lipoproteína de alta densidade (HDL), que estaria diretamente ligada à redução de fatores de disfunção endotelial protegendo contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Há relatos da importância dos produtos ricos em flavonoides como bons estimuladores da PON1. Determinadas intervenções dietéticas aumentam o HDL-colesterol, sem alterar a atividade da PON, sendo importante determinar a qualidade e a quantidade das partículas do HDL-colesterol (CORREIA E PERRY, 2010).

O estudo de Schulz (2006) demonstra ainda que a quantificação de apo-B é um melhor marcador de risco cardiovascular que os níveis de LDL-colesterol isoladamente, havendo uma grande correlação entre os níveis de apo-B e os níveis de não-HDL colesterol (colesterol total menos HDL-colesterol). Contudo, a determinação de apo-B é dispendiosa e apresenta dificuldades técnicas, não sendo utilizada rotineiramente. Sugere-se, ainda diferentes dosagens como a de LDL-oxidado que é aterogênico (modificado por glicosilação ou oxidação), enzimas do estresse oxidativo (malondialdeído, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e citocinas inflamatórias no tecido adiposo.

5.6.3 Análise histopatológica qualitativa do fígado

O peso (g) do fígado dos animais do grupo 2 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo 1 (controle basal), demonstrando um aumento deste órgão nos animais alimentados com dieta de cafeteria e não tratados (G1: $11,08 \pm 1,61$ vs. G2: $14,02 \pm 0,75$). Este órgão desempenha um papel vital na regulação do metabolismo do colesterol e é responsável por diversos processos metabólicos de desintoxicação do organismo, sendo que a aterosclerose e a esteatose hepática estão associadas a mudanças na arquitetura de vários órgãos, entre eles o fígado (JEON, et al., 2004; WU, et al., 2007; RANAWAT, et al., 2010; CASTRO, 2011). Segundo JEON, et al. (2004), um alto teor de gordura na dieta geralmente induz ao acúmulo de colesterol hepático, esteatose hepática e aumento do peso do fígado em animais e estes

resultados foram demonstrados neste estudo, onde foi observada a presença de grande quantidade de gotículas lipídicas nos hepatócitos de animais do grupo 2 (controle “positivo”). Em contrapartida, os grupos que foram tratados apresentaram uma diminuição considerável na porcentagem de gotículas de gordura, ou seja, vacuolizações lipídicas hepáticas, o que pode ser verificado na figura 18.

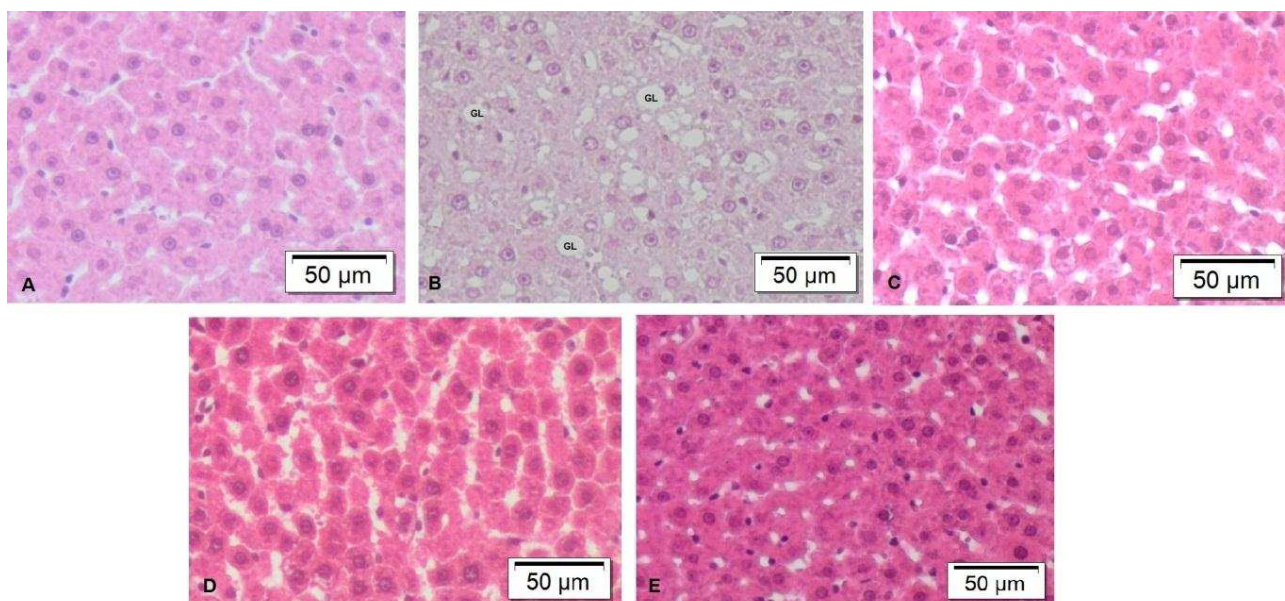


Figura 18. Fotomicrografias de cortes transversais do tecido hepático dos ratos Wistar. A= Grupo controle negativo (G1); B= Grupo controle “positivo”; C= Grupo tratado (dose 50 mg/Kg); D= Grupo tratado (dose 100 mg/Kg); E= Grupo tratado (dose 150 mg/Kg); Gotículas Lipídicas (GL). Hematoxilina-Eosina (HE), 400x. Barra 50µm.

Nos grupos 5, 6 e 7 (figura 18C, D e E respectivamente), a análise morfológica demonstra uma menor infiltração lipídica comparada ao grupo controle “positivo” (figura 18B) que apresenta gotículas lipídicas mais numerosas e também volumosas (macrovesiculares). Observa-se que o tratamento com a formulação fitoterápica contendo o extrato de *Calendula officinalis* (C. O.) afetou a histologia do fígado, atenuando uma possível esteatose hepática, minimizando a gordura, decorrente de maior síntese hepática, presente neste órgão. O citoplasma dos hepatócitos dos grupos tratados apresentou-se bastante homogêneo e com as gotas lipídicas menos numerosas e volumosas (microvesiculares). Concomitantemente, nota-se uma atenuação das enzimas hepáticas (AST/ALT), demonstrada na redução do percentual destes parâmetros bioquímicos quando comparados ao grupo 2, como é demonstrado no anexo C. Dessa maneira, a formulação contendo os flavonoides

parece preservar a morfologia do tecido hepático de possíveis danos induzidos por níveis elevados de lipídios da dieta.

Esses resultados podem ser justificados pela composição da calêndula, que é rica em flavonoides, especialmente flavonois (RODRIGUES, et al., 2004) e têm sido estudadas por apresentarem possíveis efeitos sobre o ataque de radicais livres no organismo em razão das suas propriedades antioxidantes (SBC, 2013).

A dieta de cafeteria utilizada neste trabalho faz uso de insumos com alto teor de gordura, utilizados na alimentação humana com grande frequência, tratando-se de uma ótima ferramenta para os estudos de doenças associadas ao fígado como, por exemplo, a esteatose hepática em ratos Wistar. Por apresentar uma diminuição do fluxo sanguíneo da microcirculação, o fígado com esteatose é mais vulnerável a lesões. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são formadas através de altos níveis de ácidos graxos intracelulares na mitocôndria e peroxissomos. Com isso, é gerada uma maior síntese das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e expressão de citocinas, assim como mudanças na arquitetura hepática (FREITAS, 2014). Por esses motivos, sugere-se um estudo da esteatose a partir dos resultados qualitativos obtidos.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com a formulação fitoterápica contendo extrato de *Calendula officinalis* enriquecido em flavonoides (0,42%) pode ser uma alternativa para as dislipidemias. Houve efeito modulador do perfil lipídico, redução estatisticamente significativa de LDL-colesterol e também aumento do HDL-colesterol, em ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria. Dentre as doses utilizadas, a 100 mg/kg foi a que apresentou melhor resposta sobre o perfil lipídico dos animais. Essa dosagem pode ser estabelecida como referência para trabalhos futuros ou para extrapolação em seres humanos.

Os flavonoides e suas propriedades, em especial a função antioxidante e ateroprotetora, são provavelmente os responsáveis pelo efeito hipolipidêmico verificado nesse trabalho, contudo é importante mencionar que estas propriedades podem não ser atribuídas a um único componente, mas sim a interação e sinergismo entre vários compostos que levam a estes efeitos favoráveis.

Estes resultados da atividade hipolipemiante são consistentes com relatos anteriores sobre o efeito favorável desta planta sobre o perfil lipídico, concluindo que a planta medicinal estudada apresenta potencial para utilização no controle e prevenção das dislipidemias e doenças associadas, podendo atuar na redução do risco cardiovascular.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados promissores obtidos neste trabalho abrem perspectivas para o possível isolamento e identificação das substâncias ativas responsáveis pela atividade hipolipemiante, visando o possível desenvolvimento de novos medicamentos desta classe. Dessa forma, reforça-se o uso medicinal da *Calendula officinalis* para o tratamento das dislipidemias, respaldando a continuação das pesquisas científicas referentes às propriedades desta planta. São necessários ainda estudos clínicos e toxicológicos, assim como farmacocinéticos que comprovem estes efeitos e explorem os possíveis mecanismos de ação. Os resultados a partir deste estudo poderão ser utilizados para padronização e aplicação de extrato de flores de *Calendula officinalis* na indústria farmacêutica.

Esses resultados podem contribuir na proposta de formulações terapêuticamente úteis ao SUS a partir de produtos naturais, sustentadas no país pela política atual de incentivo ao uso da fitoterapia. Esse princípio tem como objetivo garantir o acesso seguro de fitoterápicos, além de estimular projetos de sua produção, destacando-se a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde está presente a calêndula. O uso das plantas medicinais e fitoterápicos traz benefícios para o Brasil, como a redução da importação de medicamentos, proporcionando à população medicamentos com custo mais acessível, menor incidência de efeitos adversos e maior reconhecimento das tradições populares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; LOESCHER, C. M. **Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modeling.** Analytica Chimica Acta, v. 798, p.103– 108, 2013.
- AGUILA, M. B. et al. **Metabolismo lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios.** Arq Bras Cardiol, v. 78, n. 1, p. 25-31, 2002.
- AHMAD, H., KHAN, I.; WAHID, A. **Antiglycation and antioxidation properties of juglans regia and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing.** J Tradit Chin Med. v. 32, n.3, p. 411-414, 2012.
- AKIHISA, T., et al. **Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects.** Phytochemistry, v. 43, p.1255-1260, 1996.
- AKILA, M.; DEVARAJ, H. **Synergistic effect of tincture of *Crataegus* and *Mangifera indica* L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats.** Vascul Pharmacol. v.49, p.173-177, 2008.
- ALI, B. H.; BLUNDEN, G. **Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*.** Phytotherapy Research, v. 17, p. 299–305, 2003.
- AL-QARAWI, A. A. et al. **Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) and the adrenal-kidney-pituitary axis in rats.** Food Chem Toxicol, v. 40, p.1525-1527, 2002.
- ALVES, C. Q. et al. **Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos.** Quím. Nova, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIM, A. G.; TIRAPEGUI, J. **Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio.** Rev. Nutr, v.21, n.5, p. 563-575. 2008.
- ANGHILERI, L. J.; THOUVENOT, P. **Natural polyphenols iron interaction: its biological importance.** Biological Trace Element Research, v.73, p.251-258, 2000.
- APRIKIAN, O. et al. **Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats.** J. Nutr., v. 132, p.1969-1976, 2002.
- ARAÚJO, C. B. O. et al. **Uso da adubação orgânica e cobertura morta na cultura da calêndula (*Calendula officinalis* L.).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, n. 2, p.117-123, 2009.
- ASGARY, S. et al. ***Nigella sativa* L. improves lipid profile and prevents atherosclerosis: Evidence from an experimental study on hypercholesterolemic rabbits.** Journal of functional foods. v. 5, p. 228-234, 2013.

BAKÓ, et al. **HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products.** J. Biochem. Biophys Methods, v.53, p.241–250, 2002.

BARA, M. T. F. et al. **Determinação de ginkgoflavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados.** Revista Eletrônica de Farmácia. v. 1, n. 1, p.1-7, 2004.

BARREIRO, E. J. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** Quim. Nova, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. **Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico.** Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BILIA, A. R. et al. **Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS.** Chromatographia. v. 53, p. 210–215, 2001.

BILIA, A. R., et al. **Stability of the constituents of Calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. v. 30, n.3, p. 613-624, 2002.

BOCCHI, E. A. et al. **III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica.** Arq Bras Cardiol. v. 93, supl 1, p. 1-71, 2009.

BOGDANOVA, X.; FARMAKOL, T. **Biological effects of some aromatic plants.** Toksikol, v. 33, p. 349–355, 1970.

BOQUÉ, N. et al. **Some cyclindependent kinase inhibitors-related genes are regulated vitamin C in a model os diet-induced obesity.** Biol Pharm Bull. v.32, n.8, p.1462-1468, 2009.

BORELLA, J. C. et al. **Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae).** Rev Ciênc Farm Básica Apl., v. 31, n.2, p.193-197, 2010.

BORTOLO, D. P. G.; MARQUES, P. A. A.; PACHECO, A. C. **Teor e rendimento de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação.** Rev. Bras. Pl. Med., v.11, n.4, p. 435-441, 2009.

BOSE, M. et al. **The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice.** J. Nutr. v. 138, p.1677-1683, 2008.

BURNEIKO, R. C. M. et al. **Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses.** Food Chemistry Toxicology. v.44, p.1167–1172, 2006.

BRASIL. **Resolução – RE nº 89. 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos simplificado.** Diário Oficial da União, Brasília, 18 de março de 2004.

BRASIL. **Resolução RDC nº 306. 7 de dezembro de 2004. Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.** Diário Oficial da União. ANVISA. Brasília, 07 de dezembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006.

BRASIL. **Regulamentação da prescrição fitoterápica pelo nutricionista de plantas in natura frescas, ou como droga vegetal nas suas diferentes formas farmacêuticas.** Conselho federal de nutrição (CFN), n. 402, 2007.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **V Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 101, n.4, Suplemento I, São Paulo, 2013.

BRASIL. Fiocruz. **Manual de utilização de animais/Fiocruz.** Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. **Lei nº11794. 8 de outubro de 2008. Regulamentação dos procedimentos para o uso científico de animais.** Diário Oficial da União. Brasília, 8 de outubro de 2008.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada, nº 95. 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União. 12 de dezembro de 2008.

BRASIL. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2010.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada, nº 26. 13 de maio de 2014. Regulamento técnico para registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União. ANVISA. Brasília, 13 de maio de 2014.

BRAZ, J. R.; GUTIERREZ, P. S.; DA LUZ, P. L. **Coronary fat content evaluated by morphometry in patients with severe atherosclerosis has no relation with serum lipid levels.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 40, n. 4, p. 467-473, 2007.

CALIXTO, J. B.; YUNES, A. R. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** 1ªed., Santa Catarina, Argos, 2001.

CAMPION, J.; MARTINEZ, J. A. **Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet.** *Hormone and metabolic research*, v. 36, p. 485-491, 2004.

CARVALHO, A. C. B. et al. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.** *Revista T&C Amazônia*, n. 11, p. 26-32, 2007.

CASTELLI, W. P. et al. **Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham study.** v. 256, n.120, p. 2835-2838, 1986.

CASTRO, C. A. **Lesão aterosclerótica, capacidade antioxidante e histopatologia de camundongos ApoE -/- alimentados com açaí (*Euterpe edulis martius*) e submetidos ao treinamento físico.** Mestrado (Educação Física-UFV), Universidade Federal de Viçosa, 2011.

CASTRO, A. S. B. **Atividade farmacológica de extratos de abacate (*Persea americana miller*), acerola (*Malpighia emarginata d.c.*) e do flavonóide naringina no tratamento da dislipidemias.** Mestrado (Bioquímica Agrícola-UFV), Universidade Federal de Viçosa, 2012.

CESARETTI, M. R. L.; JUNIOR, O. K. **Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.50, n.2, 2006.

CETKOVIC, et al. **Antioxidant properties of marigold extracts.** *Food Research International.* v.37, p.643-650, 2004.

CHAKRABORTHY, G. S.; ARORA, R.; MAJEE, C. **Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis*.** *International Research Journal of Pharmacy.* v. 2, n. 1, p. 61-65, 2011.

CHANG, C. C. et al. **Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods.** *Journal of Food and Drug Analysis.* n. 10, v.3, p. 178-182, 2002.

CHIEJ, R. **The Macdonald Encyclopedia of Medicinal Plants.** Macdonald & Co., London, 1988.

CITADINI-ZANETTE, V. NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E. T. ***Calendula officinalis* L. (Asteraceae): Aspectos botânicos, ecológicos e usos.** *Visão Acadêmica*, v.13, n.1, 2012.

COCHRAN, W.G. **Sampling Techniques.** 3ª ed. New York. Ed.Wiley, 1977.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. **Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.7, n.2, p. 66-76, 1996.

CORREA JÚNIOR, C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. FUNEP, 2ed, Japoticabal, 162 p, 1994.

CORREIA, J. D.; PERRY, I. D. S. **Modulação dietética da atividade da paraoxonase: Revisão de estudos em humanos**. Rev HCPA. v. 30, n.3, p. 271-278, 2010.

CORSINI, A.; MAGGI, F.; CATAPANO, A. L. **Pharmacology of competitive inhibitors of HMGCoA reductase**. Pharmacological Res, v.31, p.9-27, 1995.

COTELLE, N. et al. **Antioxidant properties of hydroxy-flavones**. Free Radical Biology and Medicine, v. 20, p. 35–43, 1996.

DAFERERA, D. J. et al. **GC–MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum***. J Agric Food Chem. v. 48, p. 2576-2581, 2000.

DATASUS. **Departamento de Informática do SUS**. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/> Ministério da Saúde. Governo do Brasil, 2009.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. **Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos**. Revista Infarma, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

DELLA-LOGGIA, R. et al. **The role of triterpenoids in the anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers**. Planta Med, v. 60, p.516-520, 1994.

DORNAS, W.C. et al. Flavonoides: **Potencial terapêutico no estresse oxidativo**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press, Boca Raton, p. 87–88, 1991.

DUMENIL, G., CHEMLI, R.; BALAUSARD, G. **Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis***. Annales Pharmaceutiques Françaises v. 38, p. 493–499, 1980.

EATON, C. B. **Hyperlipidemia**. Prim Care Clin Office Pract. v 32, p.1027–1055, 2005.

FALEIRO, L., et al. **Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp. *mastichina* and *Thymus albicans***. II Wocmap congress on medicinal and aromatic plants, part 2: pharmacognosy, pharmacology, phytomedicine, toxicology; Mendoza. Argentina, 1999.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. **Análise de própolis**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

FREITAS, R. B. **Estudos fitoquímicos do óleo e do extrato desengordurado enriquecido em antocianinas dos frutos de *Euterpe edulis* Martius e análise dos seus potenciais efeitos sobre o metabolismo lipídico e a esteatose hepática em animais.** Doutorado (Bioquímica Agrícola-UFV), Universidade Federal de Viçosa, 2014.

GIL, B. Á. et al. **Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades.** Rev. Cubana Plant. Med., v. 5, n. 1, p. 30-31, 2000.

GUARATINI, T., MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICIOLO, P. **Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia.** Quím. Nova. v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GÜLÇİN, I. **Antioxidant activity of food constituents: an overview.** Arch. Toxicol. v. 86, p. 345–391, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado De Fisiologia Médica.** 9ª Edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1997.

HAMBURGER, S. et al. **Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from marigold (*Calendula officinalis*).** Fitoter, v. 74, p. 328-338, 2003.

HANSSON, G. K. **Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.** New England Journal of Medicine, v. 352, n.16, p.1685–1695, 2005.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** Pharmacology & Therapeutics. v.96, p. 67–202, 2002.

HEITOR, L. C. **Crescimento, nutrição e flavonoides totais em *Calendula officinalis* L. em resposta a inoculação com micorrizas arbusculares e doses de fósforo.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases, RJ, 2013.

HELALY, F. M. et al. **Natural rubber base matrix containing *Calendula officinalis* plant as a source of molluscicidal saponin.** Journal of Controlled Release, v. 57, p. 1-7, 1999.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** 20ª ed. São Paulo, Editora Manole, 2008.

HONÓRIO, I. C. G. **Crescimento, desenvolvimento e teor de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.).** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H. **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*, v. 11, p.171-178, 1997.

JAIN, P. G. et al. **Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats.** *Rev. Bras. Farmacogn.* v. 20, n.6, p. 969-973, 2010.

JAMA. **Executive Summary of the Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).** v. 285, p. 2486-97, 2001.

JEON, S. M. et al. **Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits.** *Clinical nutrition*, v.23, p.1025-1034, 2004.

JORGE, P. A. R. et al. **Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e sinvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos.** *Arq. Bras. Cardiol.* v. 84, n. 4, p. 314-319, 2005.

JOSHI, S. C., SHARMA, M.,; JAIN, S. **Hypolipidemic effects of *Myristica fragrans* seeds in cholesterol fed rabbits.** In *Proceeding of botanical product's seminar and expo-2005*, p. 140–143, 2005.

JÚNIOR, J. O. C. S.; PEREIRA, N. L. **Avaliação da permeação *in vitro* de gel fitoterápico contendo extrato seco por nebulização de *Shyphytum officinale* L.** *Rev. Bras. Farm.*, v. 90, n. 1, p. 3-9, 2009.

JUSTUS, L. S. C. **Potencial antioxidante de produtos naturais.** Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Farmácia)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

KAISER, S. E.; ALCANTARA, M. L. **O Impacto dos Inibidores da HMG-CoA Redutase na Modificação da História Natural da Doença Coronária.** *Arq Bras Cardiol.*, v. 71, n.2, 1998.

KALVATCHEV, Z. et al. **Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers.** *Biomed Pharmacother.* v. 51, n.4, p.176-180, 1997.

KELLY, G. E.; HUSBAND, A.J. **Flavonoids compounds in the prevention of prostate cancer.** *Methods Mol Med*, v. 81, p.377-394, 2003.

KHALID, K. A.; SILVA, J. A. T. **Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions.** *Scientia Horticulturae*, v. 126, n. 2, p. 297–305, 2010.

KIRK, E. A. et al. **Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL-receptor-deficient Mice.** J Nutr. n. 128, v. 6, p. 954-959, 1998.

KLEIN, T. et al. **Fitoterápicos: um mercado promissor.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. UEM, Maringá, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KONG, W. J. et al. **Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins.** Natural Medicine, v. 10, p. 1344-1351, 2004.

KRETSCHMER, B. D. et al. **Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance.** Life Science. v. 76, p. 1553–1573, 2005.

KUMAR, S. A. et al. **Protective role of eicosapentaenoate-lipoate derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis.** Atherosclerosis. v. 189, p.115-122, 2006.

KUSKOSKI, E. M. et al. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos.** Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 25, p. 726-732, 2005.

LEANÇA, C. C. et al. **HDL: o yin-yang da doença cardiovascular.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 54, n. 9, p. 777-784, 2010.

LEFER, A. M.; SCALIA, R.; LEFER, D.J. **Vascular effects of HMG-COA reductase inhibitors unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease.** Cardiovasc Res, v. 49, p. 281-287, 2001.

LEITE, J. P. V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas.** Tese (Doutorado em Ciências)- Depto Química, ICEX- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 299p, 2002.

LI, L. XINGMING, G. **Extraction of total saponins from *Calendula Officinalis* L. and its effects of anti-oxidation & hypolipidemic.** Journal of Mountain Agriculture and Biology, v. 3 , p. 246-248, 2010.

LIMA, L. R. P. et al. **Determinação da atividade de lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina.** Ciênc. agrotec. v. 23, n. 3, p. 626-631, 1999.

LIMA, G. R. **Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília, 2006.

LIMA, L. R. P. et al. **Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos.** Braz. J. vet. Res. anim. Sci., v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: Estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonoides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 259p, 2005.

MACEDO, I. C. **Estresse crônico associado à dieta hipercalórica em ratos wistar: Parâmetros ponderais e bioquímicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 111p, 2010.

MACEDO, I. C. **Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels.** Peptides, v.38, p.189–196, 2012.

MAGALHÃES, M. E. C. et al. **Novas perspectivas no tratamento das dislipidemias.** Revista da SOCERJ –Universidade do Estado do Rio de Janeiro, v. 17, n.5, p.105-111, 2004.

MAHMOOD, Z. A., et al. **Herbal treatment for cardiovascular disease the evidence based therapy.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 23, n.1, p.119–124, 2010.

MALYSZKO, J.; KARBARZ, M. **Electrochemical oxidation of trolox and tocopherol in acetic acid: A comparative study.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 595, p.136–144, 2006.

MANACH, C. et al. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** Am J Clin Nutr.v. 79, n.5, p. 727-747, 2004.

MANGANOTTI, S. A. **Produção de biomassa, teor de flavonoides e qualidade microbiológica de calêndula (*Calendula officinalis* L.) em dois sistemas de irrigação e três coberturas de solo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MICHELIN, D. C. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MILAGRO, F. I. et al. **Weight gain induced by high fat feeding involves increased liver oxidative stress.** Obesity, Silver Spring, n.14, p.1118-1123, 2006.

MILLER, N. J. et al. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates.** Clin. Sci. v.84, p. 407-412, 1993.

MING, L. C. **Adubação orgânica no cultivo de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br. Verbenaceae.** In: MING, L. C. (Coord.). Plantas medicinais, aromáticas econdimentares: avanços na pesquisa agronômica. v 1. p.165-191, 1998.

MOLL, M. C. N. **Antihiperlipemiantes de origen vegetal.** Revista de Fitoterapia, v.6, p.11-26, 2006.

MORAES, V. B. **Efeito do resíduo da moagem a seco de milho micropulverizado no metabolismo lipídico, na glicemia e na composição corporal em ratos alimentados com dieta de cafeteria.** Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MORAIS, S. M. et al. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil.** Revista brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

MUÑOZ, K. et al. **Rapid HPTLC-based method for quality control: simultaneous chemical analysis and antioxidant activity determination in herbal, nutraceutical and functional foods.** Procedia – Food Science 1, p. 960-964, 2011.

MUSCAT, G. E. O. et al. **Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors.** The Journal of Biological Chemistry. v. 277, n.43, p. 40722–40728, 2002.

NADERALI, E. K. et al. **Diet induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight.** Clin Sci. v. 100, p. 635-641, 2001.

NAISSIDES, M. et al. **The effect of acute red wine polyphenol consumption on post prandial lipaemia in post-menopausal women.** Atherosclerosis. v. 1770, p. 401-408, 2004.

NAZARI, A. et al. **The effect of *Satureja khuzestanica* on triglyceride, glucose, Creatinine and Alkaline phosphatase activity in rat.** J. Shahrekord Univ Med Sci, v. 7, p. 1-8, 2005.

NOVELLO, A. A. **Extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidante e antiaterogênica em camundongos ApoE -/-.** Mestrado (Ciência da Nutrição-UFV), Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, T. T. et al. **Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos.** Rev. Nutr. Campinas. v. 15, n.1, p. 45-51, 2002.

OLIVEIRA, F. Q. et al. **Espécies vegetais indicadas na odontologia.** Rev. Bras. Farmacogn., v.17, n.3, 2007.

PACHECO, A. C. **Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.)**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 61p, 2007.

PAIM, L. F. N. A. et al. **Assessment of plant development, morphology and flavonoid content in different cultivation treatments of *Calendula officinalis* L., Asteraceae**. Rev. Bras. Farmacognosia, Curitiba , v. 20, n. 6, 2010.

PANNALA, A. S. et al. **Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics**. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 282, n. 5, p.1161-1168, 2001.

PEREIRA, L. O. et al. **Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina**. Arq. Bras. Endocrinologia e Metabologia. v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

PEREIRA, A.V. et al. **Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae**. Acta Scientiarum. Health Sciences. v. 31, n. 2, p.119-124, 2009.

PEREIRA, R. P. et al. **Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus***. Neurochem Res, v.34, p. 973-983, 2009.

PÉREZ-MATUTE, P., et al. **Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α** . British Journal of Nutrition. v. 97, p. 389-398, 2007.

PICON, B. D.; BELTRAME, A. **Dislipidemias em pacientes de alto risco para desenvolver doenças cardiovasculares**. Consulta pública SAS/MS, nº13, 12 de novembro de 2002.

PIETTA, P. G. **Flavonoids as antioxidants**. Journal of Natural Products. n. 63, v. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO, J. N.; MOREIRA, J.; ROSSATO, A. E. ***Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Chá verde) e seus aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos**. Infarma. v. 22, p. 32-41, 2010.

PINTO, A. S. et al. **Ação de flavonoides sobre os níveis de lipídios em ratos tratados com triton e seus efeitos antioxidantes**. Rev Esc Farm Odontol. v. 21, p. 21-28, 1999.

PINTO, A. R. et al. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos**. Viçosa, MG, 2012. 70 p. Disponível em: <<http://www.bbt.ufv.br/>>. Acesso em: 01mar2015.

PIZZIOLO, V. R. et al. **Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, n.1, p.98-109, 2011.

PLETZ, R.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P. R. **Cuidados com a manipulação de produtos de origem vegetal em farmácias magistrais.** Infarma. v. 22, p. 3-12, 2010.

PORTAL, V. L. et al. **Comparação do Efeito de Dois Inibidores da HMG CoA Redutase sobre a Suscetibilidade da LDL à Oxidação.** Arq Bras Cardiol, v. 80, n. 2, p.150-155, 2003.

POTHITIRAT, W. et al. **Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods.** Pharm. Biol. v. 48, p. 182–186, 2010.

POURGHASSEM-GARGARI, B. et al. **Effect of dietary supplementation with *Nigella sativa* L. on serum lipid profile, lipid peroxidation and antioxidant defense system in hyperlipidemic rabbits.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 3, n. 10, p. 815–821, 2009.

RAIDA, K. et al. **The effect of *Crataegus aronica* aqueous extract in rabbits fed with high cholesterol diet.** Eur J Sci Res. v. 22, p. 352-360, 2008.

RAMOS, A. et al. **Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L.** Journal of Ethnopharmacology, v. 61, p. 49–55, 1998.

RANAWAT, L. et al. **Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ induced hepatic damage in rats.** Journal of Ethnopharmacology. v. 127, p. 777-780, 2010.

RE, R. et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radical Biol. Med. v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REYNÉS, et al. **Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet.** Food Research International. v. 64, p. 839–848, 2014.

RODRIGUES, P. O., GONÇALVES, T. C.; SILVA, W. B. **Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae).** Acta Farm. Bonaerense. v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

RODRIGUES, H. G. et al. **Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de HDL-colesterol.** Rev Nutr. v. 16, n.3, p. 315-20, 2003.

RUSAK, G. et al. **The determination of the content of the polyphenols in aerial parts of species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae).** Acta Pharmaceutica. v. 43, p. 121-125, 1993.

SAGAE, S. C. et al. **Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet.** Physiol Behav. v.119, n. 2, p.119, p.1-8, 2013.

SAIJA, A. et al. **Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes.** Free Radic Biol Med, v. 19, p. 481-486, 1995.

SANTOS, S. C. et al. **Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Bahia, v. 20, n. 1, p. 124-129, 2010.

SANZ, N. et al. **Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide.** Biochim Biophys Acta, v. 1384, p. 66-78, 1998.

SCHMITZ, W. et al. **O chá verde e suas ações como quimioprotetor.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SCHWERTZ, M. C. et al. **Efeito hipolipidêmico do suco de camu-camu em ratos.** Rev. Nutr., Campinas, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2012.

SCOARIS, C. R. et al. **Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats.** Nutrition. v. 26, p. 312-320, 2010.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A. **Study of the antiinflammatory effect of a group of plant extracts.** Veterinary Sciences. v.18, p. 87–93, 1981.

SCHULZ, I. **Tratamento das dislipidemias – Como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes.** Arq Bras Endocrinol Metab. v. 50, n.2, p. 344-359, 2006.

SILVA, R. R. et al. **Efeito hipolipidêmico dos flavonoides naringina e rutina.** ALAN, v. 51, n. 3, p. 258-264, 2001.

SILVA, E. J. R. et al. **Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar.** Rev. Bras. Farmacognosia, v. 15, n. 2, 2005.

SILVA, E. J. R. et al. **Toxicological Studies on Hydroalcohol Extract of *Calendula officinalis* L.** Phytother. Res. v. 21, p. 332–336, 2007.

SILVEIRA, M. A. M. et al. **Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.).** Revista Brasileira de Sementes, v. 24, n. 2, p. 31-37, 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFSC/ Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia**. Revista brasileira de Farmacognosia, Florianópolis: UFSC, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SLIWOWSKI, J. **Ursadiol: A new triterpene diol from *Calendula officinalis* flowers**. Phytochemistry. v. 12, p. 157-160, 1973.

SOBRATTEE, M. A. et al. **Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions**. Mutation Research. v. 579, p. 200–213, 2005.

SOUSA, C. M. M. et al. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, T. D. et al. **Efficacy study of the bioactive fraction of *Acorus calamus* in hyperlipidemia**. Indian Journal of Pharmacology, v. 39, n. 4, p. 196–200, 2007.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agropecuaria/artigo_agropecuaria/plantas_medicinais_e_fitoterapicos:_alternativas_viaveis.html?query=plantas+medicinais>. Acesso em: 18 dez 2013.

SVANIDZE, N., et al., **Perspectivas de cultivo de *Calendula officinalis***. Revista Cubana de Farmacia, v. 9, p. 97–101, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, R. **Fisiologia Vegetal**. 3ªed, Porto Alegre, 719 p. 2004.

TERAO, J. **Dietary flavonoids as antioxidants**. Forum of Nutrition, v. 61, p. 87–94, 2009.

TOLEDO, A. C. O. et al. **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. Revista Lecta, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TOMAS, M. et al. **The antioxidant function of high density lipoprotein: a new paradigm in atherosclerosis**. Rev Esp Cardiol, v. 57, n. 6, p. 557-569, 2004.

TOPAL, A. et al. **Hepatic effects of halothane, isoflurane or sevoflurane anaesthesia in dogs**. Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine. v. 50, n. 10, p. 530-533, 2003.

TURCHETTO, Q. et al. **Suplementação de ácido linoleico conjugado associado ao exercício físico em parâmetros morfofuncionais de ratos submetidos à dieta de cafeteria**. Rev. Educ. Fis/UEM, v. 24, n. 1, p. 121-134, 2013.

WEISS, J., et al. **Collection do Body Fluids, In The Laboratory Rat** (ed. Krinke, G.J.), Academic Press: London. p. 485-510, 2000.

WIJESEKERA, R. O. B. **The medical plant industry**. Rajagiriya: Intecnos Associates International Industrial Consultants. 269p, 1984.

WITZTUM, S.; STEINBERG, D. **The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans?** Trends in Cardiovascular Medicine, v. 11, n. 3, p. 93-102, 2001.

WU, Y. et al. **Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats**. Toxicology, v. 232, p. 50-56. 2007.

VAISAR, T. et al. **Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL**. J Clin Invest. v. 117, n. 3, p. 746-756, 2007.

VANACLOCHA, B.; CAÑIGUERAL, S. **Fitoterapia. Vademecum de prescripción**. Barcelona: 4 ed. Masson, 2003.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. **EROs, ERNs, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação**. Quím. Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VONGSAK, B. et al. **Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method**. Industrial Crops and Products. v. 44, p. 566– 571, 2013.

YANG, H. et al. **Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses Benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis**. Atherosclerosis, v. 207, n. 1, p. 51-58, 2009.

ZANELLA, A. M.; SOUZA, D. R. S.; GODOY, M. F. **Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo**. Arq Ciênc Saúde, v. 14, n. 2, p. 107-112, 2007.

ZAPOROZHETS, O. A. et al. **Spectrophotometric determination of hydroxycinnamic acid and related compounds in *Echinacea* preparations**. Pharmaceutical Chemistry Journal. v. 37, n.12, p. 632-636, 2003.

ZAPOROZHETS, O. A. et al. **A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 52, n.1, p. 21-25, 2004.

ZAREI, A. et al. **Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats**. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2013.

ANEXOS:

ANEXO A: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 09/2014, intitulado “Avaliação da atividade hipolipidêmica de formulação contendo *Calendula officinalis* em ratos wistar dislipidêmicos”, coordenado pela professora Tânia Toledo de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 18/02/2014, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 09/2014, named “Evaluation of hypolipidemic activity formulation containing *Calendula officinalis* in dyslipidemic rats wistar”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 18, 2014 valid for 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO B: CARTA DE RETIFICAÇÕES ENVIADA AO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA AGRÍCOLA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3039 -E-mail: bqa@ufv.br

A coordenação do Comissão de Ética no Uso Animal (**CEUA**):

Viçosa, 25 de junho de 2014

Tendo em vista a escassez de recursos financeiros para a execução fiel do projeto **09/2014** aprovado pelo CEUA em **18/02/2014**, informo ao Comitê de Ética (CEUA/UFV) que foi necessário alterar a dieta indutora de dislipidemia utilizada neste trabalho, intitulado “**Avaliação da atividade hipolipidêmica de formulação contendo *Calendula officinalis* em ratos Wistar dislipidêmicos**”. Inicialmente, foi proposta a utilização de dieta hiperlipídica padronizada industrialmente (Rhosther[®]), no entanto, como não houve recursos financeiros para a compra da mesma, estamos utilizando a “dieta de cafeteria”, conforme descrição ao final deste documento. Este dieta, assim como a que foi inicialmente proposta, é capaz, também, de induzir a dislipidemia em modelos experimentais. Por alterarmos esta dieta, houve a necessidade de aumentar o tempo de indução da dislipidemia de 20 para 45 dias, mas esta alteração, assim como a mudança da dieta, não compromete o objetivo da pesquisa, assim como o número e bem estar dos animais.

Considerando que o impacto final deste trabalho será avaliado através da dosagem de parâmetros bioquímicos, houve ainda a necessidade de alterarmos o anestésico a ser utilizado na eutanásia dos animais. Os anestésicos inicialmente propostos (quetamina e xilazina) podem gerar níveis não verdadeiros de parâmetros bioquímicos, no entanto, o isoflurano, conforme descrito no artigo “*Hepatic Effects of Halothane, Isoflurane or Sevoflurane Anaesthesia in Dogs*”, é uma anestesia segura

e, além disso, não irá gerar alterações irreais na dosagem dos parâmetros bioquímicos de interesse. Todos os procedimentos da eutanásia serão acompanhados por um veterinário responsável.

Composição da dieta de cafeteria (g/1000g de dieta)

Ingredientes	Quantidade (g)
Patê de presunto	223
Batata frita palha	111
Bacon	111
Mortadela	111
Biscoito doce maisena	111
Achocolatado em pó sabor chocolate	111
Leite integral em pó	111
Ração comercial	111

Mestranda: Gleide Gatti Fontes

ANEXO C: RESULTADO DAS ANÁLISES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

	(G1) Controle (Ração comercial) Sem tratamento	(G2) Controle (Dieta Cafeteria) Sem tratamento	(G3) Dieta Cafeteria + Atorvastatina	(G4) Dieta Cafeteria + Veículo	(G5) Dieta Cafeteria+ Formulação C. O. 50mg/Kg	Percentual de variação (G5) em relação ao grupo 2	(G6) Dieta Cafeteria+ Formulação C. O. 100mg/Kg	Percentual de variação (G6) em relação ao grupo 2	(G7) Dieta Cafeteria+ Formulação C. O. 150mg/Kg	Percentual de variação (G7) em relação ao grupo 2
Glicose	148,6 ± 11,80	199,4 ± 52,93	166,6 ± 10,16	182,6 ± 32,93	183,0 ± 10,84	- 8,2%	170,2 ± 22,70	-14,6%	152,0 ± 14,98	-23,8%
Colesterol Total	61,4 ± 6,80	60,4 ± 8,26	62,2 ± 6,89	56,0 ± 10,79	50,8 ± 2,28	- 15,9%	52,6 ± 6,66	-12,9%	46,4 ± 4,67 ^a	-23,2%
HDL	24,6 ± 2,40	17,6 ± 1,14 ^b	20,0 ± 2,00	18,8 ± 3,03	20,2 ± 1,30	14,8%	22,2 ± 1,92 ^c	26,1%	20,0 ± 3,08	13,6%
LDL	21,72 ± 5,63	21,76 ± 8,24	26,52 ± 7,09	21,04 ± 6,57	13,8 ± 2,33 ^d	-36,6%	9,28 ± 6,59 ^{ef}	-57,4%	13,72 ± 4,17 ^g	-36,9%
Triglicerídeos	85,8 ± 16,79	109,8 ± 22,38	88,0 ± 22,77	81,6 ± 17,76	72,8 ± 19,83	-33,7%	87,0 ± 30,08	-20,8%	72,0 ± 15,31	-34,4%
VLDL	17,16 ± 3,76	21,96 ± 4,48	17,6 ± 4,55	16,32 ± 3,55	14,56 ± 3,97	-33,7%	21,44 ± 4,34	-2,4%	14,40 ± 3,06	-34,4%
Relação LDL/HDL	0,95 ± 0,19	1,13 ± 0,45	1,09 ± 0,20	1,08 ± 0,29	0,74 ± 0,17	-34,5%	0,46 ± 0,28 ^{hi}	-59,3%	0,75 ± 0,20	-33,6%
Bilirrubina Total	0,074 ± 0,005 ^{jk}	0,122 ± 0,016	0,110 ± 0,019	0,128 ± 0,030	0,114 ± 0,009	-6,6%	0,100 ± 0,039	-18,0%	0,132 ± 0,015	8,2%
TGO/AST	89,4 ± 8,17	92,8 ± 4,92	104,6 ± 41,26 ^{mno}	63,4 ± 5,77	63,0 ± 6,89	-32,1%	52,6 ± 18,49	-43,3%	63,8 ± 8,04	-31,3%
TGP/ALT	53,4 ± 2,19	43,4 ± 2,30	43,6 ± 7,64	48,8 ± 8,04	40,6 ± 6,43	-6,5%	41,2 ± 4,32	-5,0%	37,2 ± 5,17	-14,3%
Ácido Úrico	1,02 ± 0,16	1,04 ± 0,60	1,12 ± 0,58	0,84 ± 0,26	0,74 ± 0,13	-28,9%	0,68 ± 0,30	-34,6%	0,60 ± 0,12	-42,3%
Creatinina	0,48 ± 0,023	0,60 ± 0,067 ^p	0,54 ± 0,029	0,54 ± 0,020	0,52 ± 0,040	-13,3%	0,51 ± 0,103	-15,0%	0,53 ± 0,036	-11,7%

Resultados: Média (mg/dL) ± DP. Para AST e ALT: Média (U/L) ± DP. ANOVA com pós teste de Tukey (p < 0,05), (n=5)

- a (p < 0,05; comparado com G1 e G3)
- b (p < 0,05; comparado com G1)
- c (p < 0,05; comparado com G2)
- d (p < 0,05; comparado com G3)
- e (p < 0,01; comparado com G3)
- f (p < 0,05; comparado com G2)
- g (p < 0,05; comparado com G3)
- h (p < 0,05; comparado com G3 e G4)
- i (p < 0,01; comparado com G2)
- j (p < 0,05; comparado com G2)
- k (p < 0,05; comparado com G4)
- l (p < 0,01; comparado com G7)
- m (p < 0,05; comparado com G5)
- n (p < 0,01; comparado com G6)
- o (p < 0,05; comparado com G7)
- p (p < 0,05; comparado com G1)