



Sabrina da Silva Soares

Perfil Químico e Farmacológico de *Crataegus almaatensis*: uma
Planta Medicinal Asiática.

Dissertação para obtenção ao grau de Mestre em Farmacologia Aplicada sob a
orientação da Professora Doutora Dulce Ferreira Cotrim e do Professor Doutor Fabio Boylan
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sabrina da Silva Soares

Perfil Químico e Farmacológico de *Crataegus almaatensis*: uma Planta Medicinal Asiática.

Tese de Mestrado em Farmacologia Aplicada, orientada pela Professora Doutora Maria Dulce Ferreira Cotrim e pelo Professor Doutor Fabio Boylan e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018

*“And who shows greater reverence for mystery,
the scientist who devotes himself to discovering it step by step,
always ready to submit to facts,
and always aware that even his boldest achievement
will never be more than a stepping-stone for those who come after him,
or the mystic who is free to maintain anything
because he need not fear any test?”*

Karl Popper

Agradecimentos

À orientadora Doutora Maria Dulce Cotrim, minha orientadora, pela pronta disponibilidade, pelo incentivo, pelos ensinamentos e conselhos, pela constante presença e suporte e pelo exemplo de dedicação e amor à profissão que foram essências a concretização deste trabalho.

Ao co-orientador Doutor Fabio Boylan, pela disponibilidade, pela oportunidade de aprendizado, pelo apoio e exigência no desenvolvimento e concretização deste trabalho, incentivando o intercâmbio de alunos entre diferentes instituições de ensino, que foi extremamente engrandecedor para o meu aprendizado profissional e pessoal durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e toda a equipa técnico-científica, em especial ao Doutor Diogo André Afonso da Fonseca, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos de enorme contribuição para o presente trabalho. Incluo aqui meu mais sincero agradecimento a toda a equipa do Centro de Cirurgia Cardiotorácica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela colaboração disponibilidade na colheita e entrega das amostras, de grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica e Farmacologia, Panos Institute, Trinity College of Dublin, em especial à equipa técnico-científica e pesquisadores, especialmente ao Doutor Felipe Hugo Alencar Fernandes, pelo exemplo de dedicação e empenho, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e pela amizade ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, e todos os membros da equipatécnico-científica, em especial à Professora Doutora Patrícia Dias Fernandes, à aluna de Doutorado Thais Biondino Sardella e ao técnico e aluno de doutorado Alan Minho, pelo suporte, ensinamentos e cometimento ao trabalho proposto, primordiais à realização deste trabalho. Incluo aqui também meu sincero agradecimento ao Instituto Vital Brasil, pela cedência dos murganhos utilizados no desenvolvimento dos ensaios clínicos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e todos os Professores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todo o ensinamento

que foi a base necessária para a concretização deste trabalho, em especial a Professora Doutora Sueli Reckziegel, pela amizade e incentivo sempre, determinante na concretização deste projeto.

Aos amigos pessoais e colegas de trabalho do grupo Fitzer`s Catering e Grupo Gillen, que sempre compreenderam a minha pouca disponibilidade e sempre incentivaram o meu crescimento pessoal.

Aos meus amigos queridos, que sempre acreditaram mais do que eu no meu próprio potencial.

Às minhas irmãs e maiores orgulhos Letícia Soares e Vanessa Soares, pelo amor incondicional e incentivo constante, que compreenderam a minha ausência e se alegraram diante das minhas pequenas conquistas ao longo deste trabalho.

À minha tia Jussara Rodrigues Soares, mãe amorosa sempre presente e força constante a me incentivar.

Aos meus pais, por serem meu eterno exemplo de generosidade, retidão e dedicação.

A todos,

A minha mais sincera gratidão.

Sumário

Abreviaturas	±
Lista de Figuras	X=
Lista de Tabelas	XIJ
Resumo	":XJ
Abstract	":XJ =
I. Fundamentação teórica	I
Objetivos	8
II. Materiais e Métodos	9
I. PARTE I – DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE CA	
I.1. Material Vegetal e Extração	10
I.2. Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	10
I.3. Determinação do Sistema de Solventes para Cromatografia de Contracorrente de Alta Velocidade	11
I.4. Separação por cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC)	12
I.5. Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex LH-20.....	13
I.6. Cromatografia de camada delgada por placas preparativas (PTLC)	14
I.7. Ressonância magnética nuclear (NMR)	14
I.8. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	15
2. PARTE II – ANÁLISE FARMACOLÓGICA	
2.1. Animais	17
2.2. Preparação das soluções de administração.....	17
2.3. Modelo humano de reatividade vascular: artéria mamária interna (HIMA)	18
2.4. Modelo de dor aguda induzida por formalina	19
2.5. Modelo da placa quente	&\$
2.6. Migração celular induzida por carragenina em bolsa de ar subcutâneo (SAP)	20

2.6.1.	Contagem total de leucócitos	21
2.6.2.	Dosagem de Citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10).....	21
2.6.3.	Quantificação da produção de monóxido de azoto (NO).....	21
2.6.4.	Quantificação de proteínas	22
2.7.	Modelo do campo aberto	22
2.8.	Modelo do rotarod.....	22
2.9.	Análise estatística	23
III.	Resultados e Discussão	24
I.	PARTE I – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	
1.1.	HSCCC e TLC	25
1.2.	Separação em gel Sephadex LH-20 e PTLC.....	28
1.3.	NMR e HPLC.....	30
2.	PARTE II – ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	
2.1.	Efeito na reatividade da HIMA.....	43
2.2.	Efeito em modelos de nocicepção	47
2.2.1.	Modelo de dor aguda induzida por formalina	47
2.2.2.	Modelo da placa quente	51
2.3.	Efeito em modelo de inflamação.....	53
2.3.1.	Contagem Total de Leucócitos	53
2.3.2.	Dosagem de Citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10).....	54
2.3.3.	Quantificação de proteínas e NO	55
2.4.	Efeitos em modelos de sedação.....	56
2.4.1.	Modelo do campo aberto.....	57
2.4.2.	Modelo do rotarod.....	57
IV.	Conclusões e Considerações Finais	59
V.	Apêndice	62
VI.	Bibliografia	67

Abreviaturas

As seguintes abreviaturas foram usadas ao longo do texto (em ordem alfabética):

A

AINE's	Antiinflamatórios não-esteróides
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AUC	Área sob a curva

B

BSA	Albumina sérica bovina
-----	------------------------

C

Ca ²⁺	Cálcio
Ca ²⁺ ATPase	Bomba de cálcio
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloreto de cálcio di-hidratado
CAET	<i>Crataegus almaatensis</i> /extrato total
CAFA	<i>Crataegus almaatensis</i> /fração aquosa
¹³ C	Carbono 13
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase

D

DMSO	Dimetilsulfóxido
------	------------------

F

F	Fração
---	--------

H

¹ H	Hidrogénio I
H ₃ PO ₄ ·1N	Ácido Fosfórico
HEMWat	Hexano: Acetato de Etilo: Metanol: Água
HIMA	Artéria mamária interna humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HSCCC	Cromatografia de contra-corrente de alta velocidade

I

IFN-γ	Interferão γ
IL	Interleucina
iNOS	Síntase indutível de monóxido de azoto

K

K ⁺	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico

L

LPS	Lipopolissacarídeo de membrana
-----	--------------------------------

M

mbar	Milibar
MeOD	Metanol deuterado
µg/ml	Microgramas/mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramas
mg/g	Miligramas por grama
mg/Kg	Miligramas por kilograma
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
mL	Mililitros
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
mmol/L	Milimolar por litro
mN	Milnewtons

N

NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanómetros
NMR	Ressonância magnética nuclear
NO	Monóxido de azoto

O

O ₂	Oxigénio
OPC's	Procianidinas oligoméricas

P

ppm	Partes por milhão
PTLC	Cromatografia preparativa em camada delgada

R

R_f	Fator de retenção
rpm	Rotações por minuto

S

SAP	Bolha de ar subcutânea
SD	Desvio padrão
SEM	Erro padrão da média
sf	Subfração
SSs	Sistemas de Solventes

T

TCD	Trinity College Dublin
TLC	Cromatografia de camada delgada
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

U

UV	Ultravioleta
----	--------------

Lista de Figuras

I. Introdução

Figura I.1	<i>Crataegus almaatensis</i> Pojark.....	2
Figura I.2	Estrutura básica de flavonóides (Shashank e Pandey, 2013).....	3

II. Materiais e Métodos

Figura II.1	Determinação do Sistema de Solventes para HSCCC	12
Figura II.2	Sistema de HSCCC	13
Figura II.3	Esquema experimental de determinação do perfil fitoquímico	16

III. Resultados e Discussão

Figura III.1	Placas de TLC após HSCCC reveladas em luz UV (A) e no revelador de ácido sulfúrico (B). Detalhe para as frações FI, FII e FIII correspondentes às substâncias isoladas.....	27
Figura III.2	Placa de TLC resumo após junções das novas frações (FI a FV) reveladas em luz UV (A) e no revelador de ácido sulfúrico (B)	27
Figura III.3	Purificação da FIV em coluna de sephadex (A), separação das subfrações sfil (B) e sflll (C) e observação da placa de TLC após revelação com ácido sulfúrico (D).....	29
Figura III.4	PTLC da FI: Visualização da placa preparativa em UV 365 nm (A) e 254nm (B) e revelação da lateral da placa com ácido sulfúrico (C) permitindo a demarcação de duas bandas distintas.....	30
Figura III.5	Sequência de separação das substâncias isoladas do extrato de <i>C. almaatensis</i> utilizando HSCCC, Sephadex e PTLC	30
Figura III.6	Espectro de NMR de ¹ H da quercitrina (MeOD, 400Mhz). Em A, espectro completo. Em B, ampliação do espectro entre 5,1 e 7,4 ppm.....	31
Figura III.7	Espectro de NMR do ¹³ C da quercitrina (MeOD, 125 Mhz)	32
Figura III.8	Estrutura química da quercitrina.....	32
Figura III.9	Espectro de NMR de ¹ H do hiperósido (MeOD, 400 Mhz). Em A, espectro completo. Em B, ampliação do espectro entre 4,39 e 7,65 ppm.....	34
Figura III.10	Espectro de NMR do ¹³ C do hiperósido (MeOD, 125 Mhz)	34
Figura III.11	Estrutura química do hiperósido	35
Figura III.12	Espectro de NMR do ¹ H (MeOD, 400 MHz) da afzelina isolada do extrato etanólico de CA.....	37
Figura III.13	Estrutura química da afzelina.....	37

Figura III.14	Afzelina: Cromatograma do HPLC gradiente e curva de calibração	40
Figura III.15	HPLC da quercitrina: Cromatograma e curva de calibração	40
Figura III.16	HPLC do hiperósido: Cromatograma e curva de calibração	41
Figura III.17	HPLC do extrato total (1250µg/ml).....	41

PARTE 2

Figura III.18	Curva de relaxamento aos extratos CAET e CAFA.....	43
Figura III.19	Curvas de concentração-resposta cumulativas à noradrenalina na ausência (controlo) e presença dos extratos CAET e CAFA em diferentes concentrações de incubação.....	44
Figura III.20	Curvas CR aos extratos CAET e CAFA.....	45
Figura III.21	Efeito de CAET e CAFA em veículo óleo VO no tempo de lambadura da pata em murganhos	48
Figura III.22	Efeito de CAFA/óleo e CAFA/água VO no tempo de lambadura da pata em murganhos.....	49
Figura III.23	Efeito de CAET, CAFA, afzelina, quercitrina e hiperósido no tempo de lambadura da pata em murganhos.....	50
Figura III.24	Efeito de CAET e CAFA no tempo reação a placa quente em murganhos	51
Figura III.25	Efeito de afzelina, quercitrina e hiperósido no tempo reação a placa quente em murganhos	52
Figura III.26	Efeito de CAET e CAFA na migração celular do lavado da SAP, no lavado de medula óssea e no sangue.....	53
Figura III.27	Efeito de CAET e CAFA na dosagem de IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ no lavado da SAP	54
Figura III.28	Efeito de CAET e CAFA na quantificação de proteína e NO no lavado da SAP.....	56
Figura III.29	Efeito de CAET e CAFO no número de linhas cruzadas	57
Figura III.30	Efeito de CAET e CAFO no tempo da primera queda e número de quedas no rotarod.....	58

Lista de Tabelas

Tabela I	Deslocamento químico da quercitrina (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H e do ^{13}C em comparação com os valores encontrado na literatura.....	33
Tabela II	Deslocamento químico do hiperósido (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H e do ^{13}C em comparação com os valores encontrados na literatura	36
Tabela III	Deslocamento químico da afzelina (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H em comparação com os valores encontrados na literatura	38
Tabela IV	HPLC do CAET (1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$): Quantificação dos flavonóides isolados do extrato etanólico <i>das folhas de C. almaatensis</i>	42
Tabela V	Efeito máximo e potência dos extratos CAET e CAFA nas diferentes concentrações de incubação nos anéis arteriais da HIMA.....	45
Tabela VI	Efeito máximo dos extratos CAET e CAFA na curva CR dos anéis arteriais da HIMA.....	46

Resumo

O presente estudo teve como objetivo primeiramente a caracterização fitoquímica de *Crateagus almaatensis* Pojark (CA), espécie endêmica do Casaquistão utilizando cromatografia contra corrente de alta velocidade (HSCCC). As substâncias isoladas foram posteriormente identificadas por técnicas espectrométricas e investigadas para os potenciais efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cardiovasculares. Inicialmente, a fração aquosa foi separada do extrato etanólico das folhas de CA. Depois disso, a fração foi submetida à HSCCC utilizando o sistema de solventes bifásico HEMWat na proporção 1:4:1:4, permitindo assim o isolamento de duas substâncias. A ressonância magnética nuclear (NMR) do ^1H e do ^{13}C (metanol deuterado- MeOD, 400/125MHz) permitiu a caracterização química das substâncias como *quercetina 3-O-ramnósido* (quercitrina) e *quercetina 3-O- β -galactósido* (hiperósido). Posterior tratamento de uma das frações obtidas do HSCCC por coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 e cromatografia de camada delgada com placas preparativas possibilitou o isolamento de uma terceira substância, identificada como *caempferol 3-O- α -L-ramnósido* (NMR do ^1H em MeOD). A quantificação das substâncias isoladas foi realizada por cromatografia com fase líquida de alta eficiência utilizando um sistema de gradiente de água acidificada com ácido ortofosfórico a 0,25% e metanol como fase móvel, obtendo os seguintes resultados: 0,94% de afzelina, 4,02% de quercitrina e 4,02% 1,82% de hiperósido. O extrato total (CAET) e a fase aquosa do extrato total (CAFA) nas doses de 10, 30 e 100mg/Kg, juntamente com as substâncias isoladas nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/Kg foram avaliados em ensaios *in vivo* quanto à atividade antinociceptiva (modelo de dor aguda induzida por formalina e placa quente), atividade sedativa (avaliação locomotora espontânea no campo aberto e forçada no rotarod), atividade anti-inflamatória (migração celular induzida por carragenina em bolsa de ar subcutâneo- SAP) e atividade vascular (modelo humano de reatividade vascular: artéria mamária interna- HIMA). Não se observou atividade antinociceptiva e sedativa a partir dos extratos e substâncias isoladas de CA nas doses utilizadas neste estudo. CAFA na dose de 100mg/Kg i.p. diminuiu significativamente a contagem de leucócitos totais nos lavados da SAP e de medula óssea e diminuiu a liberação de IL-1 β no lavado da SAP. CAET nas concentrações de 0,014 e 0,14mg/ml no banho das artérias determinou um aumento significativo na contração máxima à noradrenalina. A curva concentração-resposta de CAFA (0,007 a 0,7mg/ml) apresentou inibição da contração da HIMA à noradrenalina. O potencial antiinflamatório e vascular demonstrado no presente estudo fundamenta a realização de trabalhos futuros com os extratos desta espécie, a fim de substanciar o uso medicinal da planta.

Abstract

The present study first aimed to achieve the phytochemical characterization of the endemic Kazakh species *Crateagus almaatensis* Pojark. (CA) by using high speed counter current chromatography (HSCCC). The separation and later identification of the compounds was further achieved, which allowed the investigation of a potential analgesic, anti-inflammatory and cardiovascular activities for them as well as the extracts. Initially, the aqueous fraction was separated from the leaves ethanol extract of CA. Thereafter, the fraction was submitted to HSCCC using the biphasic solvent system HEMWat (1:4:1:4), thus allowing for the isolation of two compounds. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance-NMR of the (Deuterated Methanol- MeOD, 400 / 125MHz) allowed the chemical characterization of quercetin 3-O-rhamnoside (quercitrin) and quercetin 3-O- β -galactoside (hyperoside). By Sephadex LH-20 Chromatography (methanol) and Preparative Plate Thin Layer Chromatography (Acetic Acid: Methanol: Water 3:1:1 mobile phase) a third compound could be separated from one of the previous HSCCC fractions and it was identified as kaempferol 3-O- α -L-rhamnoside (^1H -NMR in MeOD). The isolated compounds were quantified by high performance liquid chromatography using 0.25% orthophosphoric acid in water and methanol as solvents in a gradient system, achieving the following result: 0.94% of afzelin, 4.02% of quercitrin and 1.82% of hyperoside. The crude extract (CAET) and the crude extract aqueous fraction (CAFA) at the doses of 10, 30 and 100mg/Kg, together with the isolated compounds at the doses of 0.3, 1 and 3mg/Kg, intraperitoneally administered (i.p.), were evaluated *in vivo* for their antinociceptive activity (acute pain induced by formalin and hot plate), sedative activity (spontaneous locomotion performance in the open field and forced locomotion performance on the rotarod), anti-inflammatory activity (cell migration carragenin induced in subcutaneous air punch- SAP) and vasoactive activity (human internal mammary artery- HIMA contractility). It was not possible to show antinociceptive and sedative activity for CA extracts and its isolated compounds in the doses used in this study. CAFA at the dose of 100 mg/Kg i.p. significantly decreased the total leukocyte count in the SAP and bone marrow wash samples. CAFA at the dose of 100mg/kg also decreased the IL-1 β release in the SAP wash. CAET at the concentrations of 0.014 and 0.14 mg/ml in the organ bath significantly increased the maximum contractility response of HIMA to noradrenaline. The CAFA concentration-response curve (0.007 to 0.7mg/ml) showed a significant inhibition of the HIMA constriction to noradrenaline. The anti-inflammatory and vascular therapeutic potential demonstrated in the present study serves as a base for future works with this species, in order to substantiate the medicinal use of this plant.

I. Fundamentação teórica

***Crataegus almaatensis* (CA)**

O género *Crataegus spp.*, subfamília Maloideae, família Rosacea, popularmente conhecido como “Hawtorn”, é nativo de zonas temperadas e comumente encontrado na Europa, Ásia e América do Norte (Edwards *et al.*, 2012). *Crataegus almaatensis* Pojark é uma espécie originária das montanhas de Almaty e endêmica no Casaquistão, que possui folhas verdes brilhantes, flores brancas e frutos vermelhos, muito semelhante às espécies oficiais *C. monogynna* e *C. laevigata* (Figura I.1).



Figura I.2: *Crataegus almaatensis* Pojark. (Disponível em: <http://yqba6omca0.pqbl/en/2014/08/crataegus-almaatensis-pojark-boyary-shnik-almaatinskij/>)

Mais de 20 espécies de *Crataegus spp.* são atualmente utilizadas como medicamentos ou como base para a produção de fármacos. Os extratos de *C. laevigata* and *C. monogynna* são largamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares por toda a Europa e devido a sua eficácia e segurança, estas espécies aparecem listadas na farmacopeia de diversos países, incluindo a Alemanha, a França e a Inglaterra (Rastogi, Pandey e Rawat, 2016). No que concerne à atividade cardiovascular, produtos a base de *Crataegus spp.* são atualmente utilizados como alternativa no tratamento de hipertensão arterial, angina, arritmia e doença cardíaca congestiva leve (Edwards *et al.*, 2012).

Crataegus também é utilizada por sua atividade antiinflamatória e esta aparece relacionada ao extrato total, a fração orgânica do extrato total e à sua fração rica em triterpenos (Wang, J., Xiong e Feng, 2013). Os componentes polifenólicos e sua capacidade antioxidante são os principais responsáveis pela atividade terapêutica de *Crataegus spp.* (Peng *et al.*, 2016) (Kumar *et al.*, 2012). Os bio-flavonóides presentes na planta estão associados a atividade cardiovascular, nomeadamente protocianidinas oligoméricas (OPC's), vitexina, quercetina e hiperósido (Rastogi *et al.*, 2016). Vitexina é citada por Edwards *et al.*

(2012) como uma das substâncias maioritariamente isoladas das espécies de *Crataegus spp.* e está associada a diversas atividades farmacológicas, dentre elas atividade antinociceptiva, anticonvulsivante, antitumoral, calmante e antiinflamatória (Rosa *et al.*, 2016).

Não apenas bioflavonóides, mas diversas outras substâncias químicas são comumente encontradas em *Crataegus spp.* (ver apêndice 1) e estas apresentam diferentes atividades farmacológicas (ver apêndice 2), nomeadamente taninos, vitamina C, amins cardiotónicas (feniletilamina, tiramina, isobutilamina, O-metoxi-etilfenilamina, colina e acetilcolina), derivados purínicos (adenina, guanina, adenosina, ácido cafeico, amidalina), triterpenos (ácido ursólico), entre outros (Kumar *et al.*, 2012).

Os flavonóides compõem um extenso grupo de substâncias polifenólicas, que possuem uma estrutura benzo- γ -pirona e está comumente presente em plantas. Quimicamente os flavonóides são compostos por um esqueleto de quinze carbonos em dois anéis benzénicos A e B, ligados a um anel pirano heterocíclico C (Figura 1.2). Eles podem ser divididos numa grande variedade de classes, como flavonas, flavonóis (inclui-se aqui kaempferol e quercetina), flavononas, entre outras.

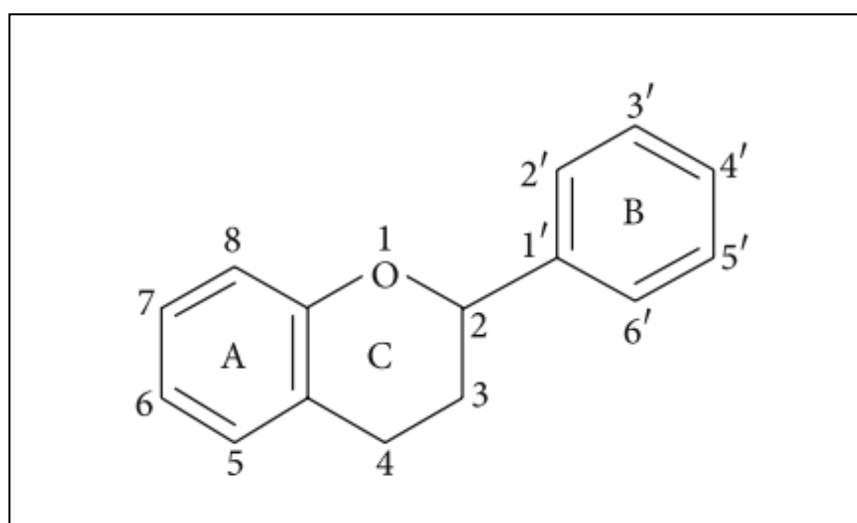


Figura 1.2: Estrutura básica de flavonóides (Shashank e Pandey, 2013).

As várias classes de flavonóides diferem entre si através do grau de oxidação e padrão de substituição do anel C, enquanto as substâncias individuais dentro de uma mesma classe diferem entre si pelo padrão de substituição dos anéis A e B. Os flavonóides podem ocorrer como derivados agliconas, glicosilados ou metilados. Quando são formados glicosídeos, a ligação glicosídica normalmente ocorre nas posições 3 ou 7 e o carboidrato

pode ser L-ramnose, D-glicose, glicoramnose, galactose ou arabnose. Os flavonóides são normalmente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 2, 3', 4' e 5'.

Uma das teorias utilizadas para justificar a biossíntese dessas substâncias é que os flavonóides são produzidos pelas plantas em resposta a infecção microbiana. Outra teoria sugere que produtos naturais são sintetizados por plantas devido a um potencial redox de proteção das próprias plantas contra o stress oxidativo (Gottlieb, 1998). A atividade farmacológica de flavonóides é dependente da classe estrutural, grau de hidroxilação, substituições, conjugações e grau de polimerização da molécula (Shashank e Pandey, 2013).

Doenças cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (CVD) são caracterizadas por alterações estruturais e funcionais no coração e nos vasos sanguíneos. De entre as CVD incluem-se a doença cardíaca coronária, hipertensão arterial, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, doença cardíaca congênita e falência cardíaca. Globalmente mais pessoas morrem de doenças cardiovasculares do que de qualquer outra causa (Rastogi *et al.*, 2016). A obesidade, hipertensão arterial, altos níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), baixos níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), tabagismo e diabetes estão entre os fatores de risco cardiovascular mais importantes envolvidos no desenvolvimento das CVD (Sobhani *et al.*, 2017).

Devido aos diversos efeitos que exercem ao nível do sistema cardiovascular, está amplamente aceite o efeito vasoprotetor dos polifenóis (flavonóides, taninos, lignanas, entre outros. Alguns estudos mostram que polifenóis de origens diferentes, apresentaram efeitos distintos na redução de espécies reativas do oxigénio (ROS), melhoria da função endotelial, efeitos antihipertensores, remodelamento vascular, modulação no eixo renina-angiotensina-aldosterona (RAA), aumento das HDL e redução das LDL (Siti, Kamisah e Kamsiah, 2015).

Atualmente, os extratos de *Crataegus spp.* são utilizados principalmente no tratamento de doenças cardíacas congestivas leves. Extratos com o uso tradicional demonstraram aumentar a força de contração do miocárdio, aumentar o fluxo coronário e aumentar a utilização do oxigénio pelos cardiomiócitos. Além dos efeitos cardiotónicos mencionados, os extratos de *Crataegus spp.* também demonstraram um efeito de cardioproteção em modelos *in vivo* e *in vitro* de lesão de isquémia e reperfusão, o qual

parece ser quase que exclusivamente devido à presença de procianidinas oligoméricas (OPC's) e seus alto potencial antioxidante, estímulo da produção de monóxido de azoto e inibição da elastase neutrofílica humana (HNE). Uma vez que a reperfusão de um tecido isquêmico está diretamente relacionada com a produção de radicais livres do oxigênio (ROS) e com a acumulação de granulócitos polimorfonucleares, sugere-se adicionalmente que OPC's contribuam para a proteção do tecido contra lesão de isquemia e reperfusão (Veveris, Koch e Chatterjee, 2004).

Procianidinas são um subgrupo de substâncias polifenólicas, compostos por monómeros de flavan-3-ols (-)epicatequinas e (+)catequinas ligadas entre si por ligações do tipo covalente (Novakovic *et al.*, 2017). Muitas são as variações nos monómeros que compõem as procianidinas, e no gênero *Crataegus spp.* estima-se que haja uma quantidade aproximada de 3% de procianidinas oligo and poliméricas do tipo B e fenilpropano-procianidinas. As procianidinas do tipo B são a mais comuns na natureza e na dieta humana (Hellenbrand *et al.*, 2015).

Dor e Inflamação

A dor é um dos sintomas decorrentes do processo inflamatório e as abordagens terapêuticas para o alívio da dor baseiam-se basicamente em fármacos antiinflamatórios não esteróides e opióides. Apesar de muito eficazes, os opióides podem determinar a ocorrência de variados efeitos adversos, nomeadamente úlceras, vômitos, prurido, tolerância, alucinações, depressão respiratória e obstipação (Guilhon *et al.*, 2015). Os anti-inflamatórios não esteróides (AINE's), por sua vez, são uma das principais causas de morbidade relacionada com medicamentos, especialmente em idosos e doentes com comorbilidades.

A maioria dos efeitos adversos está relacionada com a inibição generalizada dos principais alvos dos AINE's: ciclooxigenases I e II. Essas enzimas não estão envolvidas apenas na patogênese da dor e da inflamação, mas também são necessárias no trato gastrointestinal para proteção da mucosa e motilidade intestinal e nos rins para integridade funcional. Além das úlceras gastrointestinais e insuficiência renal, o uso prolongado de AINE's pode aumentar o risco cardiovascular, determinar reações alérgicas, lesão hepática e alterações no sistema nervoso central (Wehling, 2014).

Os efeitos adversos inevitáveis dessas classes de fármacos fundamentam a busca contínua pela síntese de novos e eficientes analgésicos que apresentem poucos ou não apresentem efeitos adversos para o alívio da dor (Giorno *et al.*, 2015). Diversos, compostos a base de plantas têm sido descritos como tendo propriedades analgésicas significativas com muito poucos efeitos adversos, sendo utilizados como alternativa terapêutica para tratar nocicepção (Wehling, 2014).

A inflamação é um processo dinâmico de resposta à lesão tecidual e invasão do organismo por patógenos. Os danos celulares ou patógenos são inicialmente reconhecidos por macrófagos, em seguida por mastócitos, leucócitos e neutrófilos que são recrutados para o local de lesão. Essas células libertam diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, monóxido de azoto (NO), quimiocinas, leucotrienos, aminas vasoativas e prostaglandinas que amplificam resposta imune, causando febre, rubor, edema e dor.

As citocinas são libertadas por macrófagos com o objetivo de reparar o dano local e, quando ligadas a receptores acoplados à proteína G (GPCRs), levam à expressão de selectinas e integrinas. Fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (ILs) e interferon- γ são exemplos de citocinas libertadas por mastócitos. A histamina é adicionalmente libertada pelos mastócitos, NO também é libertado e as prostaglandinas e leucotrienos são produzidos pelas células endoteliais actuando em conjunto para um aumento na permeabilidade vascular (Newton e Dixit, 2012).

O TNF- α e a IL-1 β especificamente desempenham um papel na indução de outros mediadores pró- anti-inflamatórios (como quimiocinas e NO) e a IL-10 possivelmente com efeito contrário, exercendo um controlo no recrutamento de neutrófilos ao foco inflamatório (Rosa *et al.*, 2016). Os neutrófilos circulantes são então atraídos por quimiocinas produzidas por células residentes do tecido e ligam-se aos receptores dessas células. Neutrófilos ativados transmigram através do endotélio para o tecido inflamado e causam a degranulação e geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), que por sua vez funcionam como fator de sinalização intracelular, amplificando assim a resposta inflamatória (Chovatiya e Medzhitov, 2014).

Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC)

Atualmente, mais de 25% das prescrições farmacêuticas são derivadas de plantas, como por exemplo, adrenalina a partir de *Ephedra sinica*, digoxina por *Digitalis purpurea*,

salicina (base da aspirina) por *Salix alba* e reserpina por *Rauwolfia serpentina* entre outras (Rastogi *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2012). Mesmo com os avanços observados nos últimos anos, ainda é muito longo o processo de desenvolvimento de um produto farmacêutico ou produto de interesse económico a partir de um extrato ou fração de uma planta (Funari *et al.*, 2013).

A cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) é uma técnica de partição líquido-líquido onde não há ligação irreversível da amostra à fase estacionária, permitindo uma separação quase completa dos componentes individuais num curto intervalo de tempo (Cao *et al.*, 2012). Ainda assim, dos métodos analíticos disponíveis, nenhum é capaz de alcançar o objetivo ambicioso que consiste em separar e quantificar todos os metabolitos presentes numa determinada amostra. A escolha das técnicas analíticas e instrumentos a serem utilizados é crucial e vai variar de acordo com o tipo de abordagem experimental a ser adotada e as propriedades químicas distintas das substâncias a serem analisadas.

Em equipamentos modernos de HSCCC, a coluna pode rodar sobre um eixo gerando equilíbrio hidrostático entre as duas fases líquidas imiscíveis (fase estacionária e fase móvel) ou pode rodar de acordo com um movimento planetário (com dois eixos de rotação), gerando um equilíbrio hidrodinâmico das duas fases. Equipamentos de HSCCC que permitem o equilíbrio hidrodinâmico das duas fases são largamente utilizados para o fracionamento de produtos naturais (Leitão *et al.*, 2017).

A técnica de HSCCC é de longe a técnica mais utilizada para isolar flavonóides, sendo descrita em 89% dos artigos analisados, onde foram isolados mais de 300 flavonóides de mais de 100 espécies diferentes de plantas usando 40 diferentes SSs (Neves Costa, Das e Leitão, 2010). Dentre as vantagens da técnica de HSCCC cita-se a possibilidade de separação das substâncias em um curto espaço de tempo, com o uso de uma grande variedade de solventes (Sannomiya *et al.*, 2004). Outra importante vantagem da técnica de HSCCC está no facto de ser uma técnica de partição livre de suporte, eliminado o inconveniente da adsorção irreversível da amostra ao suporte sólido e permitindo, assim, uma máxima recuperação das substâncias isoladas (Shan *et al.*, 2013).

A seleção do sistema de solventes é a primeira e a etapa mais importante na separação de substâncias através de HSCCC (Sannomiya *et al.*, 2004). No presente estudo, objetivamos encontrar um sistema de solventes eficiente na separação de flavonóides contidos no extrato etanólico de *C. almaataensis* a partir de um método baseado em TLC,

também chamado método GUESS, largamente difundido em isolamento de produtos naturais em laboratório (Friesen *et al.*, 2015).

Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização fitoquímica da espécie *C. almaatensis*, isolando e identificando os flavonóides presentes na planta, dessa forma avaliando o seu potencial terapêutico comparativamente com as espécies oficiais, já largamente utilizadas no tratamento das mais diversas patologias conforme citado anteriormente.

Com o objetivo de aumentar capacidade de identificação dos metabolitos, propõe-se nesse trabalho otimizar a separação utilizando a fração aquosa de *C. almaatensis* e associar HSCCC às técnicas já amplamente utilizadas de ressonância magnética nuclear (NMR) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para promover a separação identificação e quantificação dos componentes isolados.

Além disso, objetivou-se neste estudo determinar a atividade farmacológica em diferentes modelos *in vivo* de nocicepção, inflamação, sedação e *in vitro* de vasoatividade, elucidando o perfil terapêutico da espécie estudada, contribuindo assim com as atuais iniciativas do governo da República Asiática do Casaquistão em promover a produção industrial de produtos farmacêuticos de alta qualidade e modernizar o sistema de saúde do país, no que concerne aos investimentos na melhoria dos padrões de qualidade e segurança dos produtos medicinais.

II. Materiais e Métodos

I. PARTE I – DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DE CA

I.1. Material Vegetal e Extração

As folhas de *Crataegus almaataensis* Pojark foram coletadas em setembro de 2015, nas montanhas de Medeo, região de Almaty, no Cazaquistão. A identificação da planta foi realizada pelo Instituto de Botânica e Fitointrodução de Almaty, no Cazaquistão, pela Diretora do Laboratório de Flora de Plantas Altas, aluna de doutoramento em Ciências Biológicas, G. Kudabayeva. A identificação foi posteriormente confirmada pelo Diretor Geral e Doutor em Ciências Biológicas Dr G. Sitpayeva (referência 01-04 /456 de 10.11.2015).

As folhas foram secas à temperatura ambiente durante uma semana. O extrato utilizado no estudo foi previamente preparado no laboratório de Biochemical Sciences, Panoz Institute, Trinity College Dublin (TCD) através do método de extração por Soxhlex utilizando etanol como solvente adquirido em Hazardous Materials Facility, Trinity College Dublin (TCD). A extração pelo método Soxhlet consiste basicamente em aquecer o solvente na base do aparato, vaporizando-o através do filtro contendo a amostra macerada. O solvente então condensa ao atingir o ápice, retornando por um sifão à base do aparato para ser novamente aquecido (Nn, 2015)

O etanol foi evaporado do extrato total à medida que os ciclos de cromatografia de contracorrente de alta velocidade (HSCCC) foram sendo realizados (100mL por vez). Na evaporação do extrato foi utilizado um evaporador rotativo IKA composto por IKA HB 10 controlo, IKA RV 10 controlo e uma bomba Fischer Scientific® a 40°C (55rpm) e uma pressão inicial de 220mbar, reduzida a aproximadamente 100mbar após início da evaporação.

I.2. Cromatografia de camada delgada (TLC)

Foram utilizadas placas de TLC de alumínio 20x20 adquiridas da Sigma-Aldrich®. Para determinação da fase móvel ideal para a eluição das amostras obtidas por HSCCC foram testados diferentes sistemas de solventes, nomeadamente: clorofórmio: metanol na proporção de 9:1, clorofórmio: metanol: água ultrapura na proporção de 6,5:3,5:1, acetato de etilo: ácido acético: água nas proporções de 1:1:1 e 6:2:2. A fase móvel de acetato de etilo: ácido acético: água na proporção de 6:2:2 apresentou o melhor padrão de eluição das amostras, mantendo-se esta fase móvel nas primeiras placas de TLC realizadas. Após determinado momento, decidiu-se reduzir a polaridade da fase móvel, obtendo a partir disso um padrão de eluição ótimo com a fase móvel de acetato de etilo: ácido acético: água na

proporção de 6:1:1. As placas de TLC foram eluídas em uma câmara de fluxo laminar vertical fechada e após eluição, foram aquecidas a 200°C, visualizadas à luz UV (254nm) e reveladas com ácido sulfúrico (metanol 1%). O ácido acético foi adquirido da Sigma-Aldrich®, sendo os demais solventes adquiridos a partir de Hazardous Materials Facility, TCD.

1.3. Determinação do sistema de solventes para cromatografia contra corrente de alta velocidade

Para determinar as fases móvel e estacionária do HSCCC que permitissem uma separação ideal dos componentes da planta nas fases orgânica e aquosa do sistema, foram testadas diferentes proporções do sistema de solventes (SSs) HEMWat, formado pelos solventes hexano, acetato de etilo, metanol e água ultrapura. Os solventes foram adquiridos em Hazardous Materials Facility, TCD e a água ultrapura obtida a partir de um equipamento Purelab option-Q ELGA.

No processo de determinação da proporção ideal do sistema de solventes, 20 mL do extrato etanólico evaporado foi dividido em diferentes frascos contendo o sistema de solventes HEMWat previamente preparado nas proporções: 1:1:1:1 (SS1), 1:2:1:2 (SS2), 1:3:1:3 (SS3) e 1:4:1:4 (SS4). Sendo o SS1 1mL de hexano: 1mL de acetato de etilo: 1mL de metanol: 1mL de água ultrapura; o SS2 1mL de hexano: 2mL de acetato de etilo: 1mL de metanol: 2mL de água ultrapura; o SS3 0,5mL de hexano: 1,5mL de acetato de etilo: 0,5mL de metanol: 1,5mL de água ultrapura; e o SS4 0,5mL de hexano: 2mL de acetato de etilo: 0,5mL de metanol: 2mL de água ultrapura.

Após a separação do extrato em duas fases imiscíveis, inferior e superior, ou aquosa e orgânica, respectivamente, foram preparadas placas de TLC para visualização à luz UV do padrão de eluição das fases em cada proporção do sistema de solventes a ser testada. Cada fase inferior e superior foi separada e aplicada em placas de TLC. A fase móvel utilizada consistiu em acetato de etilo ácido acético: água ultrapura na proporção de 6:1:1. As placas foram visualizadas à luz UV e reveladas com ácido sulfúrico. O SS4 na proporção 1:4:1:4 permitiu uma eluição mais homogênea com melhor distribuição da amostra em ambas as fases orgânica e aquosa, conforme observado na Figura 1 sendo esta a proporção escolhida para a realização dos ciclos sucessivos de HSCCC.

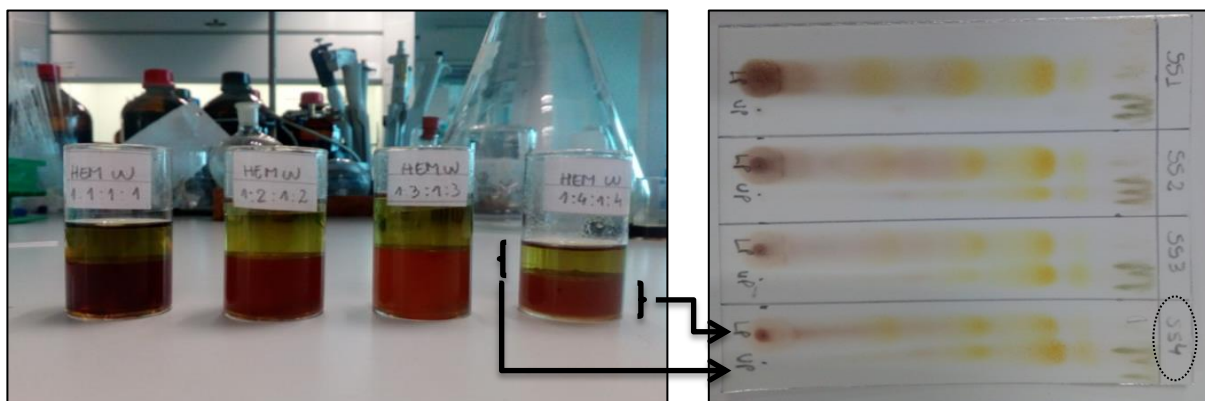


Figura II.1: Determinação do Sistema de Solventes para HSCCC. No detalhe, a eluição em placa de TLC das fases inferior e superior no SS4.

1.4. Separação por cromatografia de contra corrente de alta velocidade (HSCCC)

Para a realização da HSCCC foi utilizado um equipamento Quattro HT-Prep (AECS-Bridgend, United Kingdom) equipado com duas bobinas contendo duas espirais em multi-camadas de politetrafluoroetileno cada acoplado a uma bomba ECP2000 (ECOM) e um degaseificador Waters In-line Degasser AF. O sistema de solventes de escolha para HSCCC foi o hexano-acetato de etilo-metanol-água HEMWat na proporção 1:4:1:4 conforme descrito anteriormente. Os solventes imiscíveis do SS4, em um volume total de 800mL, sendo 80mL hexano: 320 mL acetato de etilo: 80 mL metanol: 320 mL de água ultrapura, previamente misturados, separados em fase inferior e superior e sonicados compuseram as fases estacionária e móvel, respectivamente, a serem bombeadas no HSCCC.

Para cada ciclo de HSCCC, 100mL de extrato etanólico foram evaporados e redissolvidos em 10mL da fase estacionária (inferior aquosa) e 10mL da fase móvel (superior orgânica) do SS4, previamente preparadas, com auxílio de um sonicador Brandasonic. O extrato dissolvido foi então filtrado duplamente, em filtro de papel circular de 55mm e filtro de seringa de 13mm da Whatman, e separado em fases inferior e superior. Apenas a fase inferior ou fase aquosa da amostra dissolvida, num volume total de 7mL foi utilizado nos sucessivos ciclos de HSCCC. A fase superior do extrato dissolvido foi evaporada e armazenada para estudos posteriores.

A coluna de HSCCC (136mL) foi preenchida primeiramente com a fase estacionária totalizando um volume de 150mL bombeados a uma velocidade de 4mL/min, em seguida o equipamento foi ligado e após 5 minutos, ao atingir uma rotação de 865rpm, a fase móvel foi bombeada para o sistema a uma rotação de 2,0 ml/min até que fosse observado o mesmo volume de fase estacionária e móvel no tubo coletor externo, indicando equilíbrio entre as fases no sistema. A amostra foi adicionada ao sistema depois de atingido o estado

de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária, e bombeada na mesma velocidade de 2,0 ml/min. No tubo 50 a rotação foi parada e a fase inferior aquosa, fase estacionária, foi bombeada no lugar da fase superior orgânica, fase móvel, para efetuar a extrusão da coluna. Foram colhidos manualmente 80 tubos de 4mL cada para posterior análise por TLC.

Após sucessivos ciclos de HSCCC as amostras colhidas foram agrupadas em cinco frações de acordo com o padrão de eluição e valor do fator de retenção (R_f) observado nas placas de TLC. Objetivando-se a purificação das frações, algumas delas foram submetidas à passagem por cromatografia por exclusão molecular utilizando-se Sephadex LH-20. A passagem de duas das frações pela coluna de Sephadex LH-20 não resultou em completa purificação. Nesse caso, para obtenção das substâncias puras a TLC em camada preparativa (PTLC) foi utilizada como última etapa de purificação.

Um total de 16 corridas de HSCCC, seguidas de passagem por coluna de Sephadex LH-20 e por PTLC foi necessário para a obtenção de material em quantidade suficiente para posterior análise por ressonância magnética nuclear (NMR) e teste de atividade farmacológica.

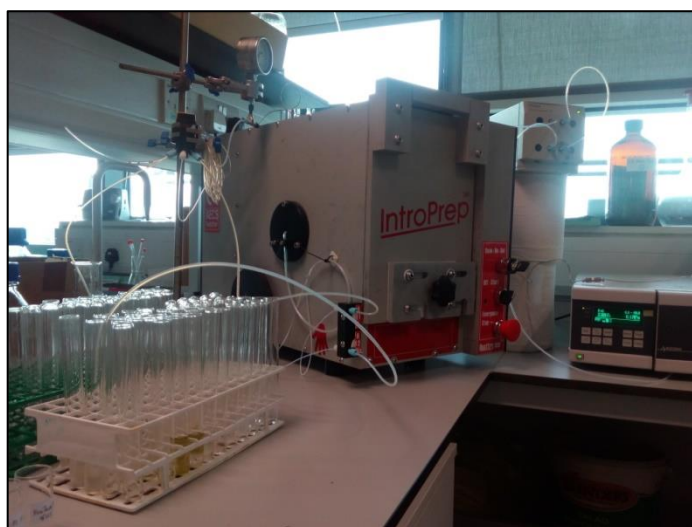


Figura II.2: Sistema de HSCCC.

1.5. Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex LH-20

Uma coluna QUICKfit 24/29 de 500mL, preenchida por Sephadex LH-20 obtido da Sigma-Aldrich®, eluída com metanol a uma velocidade média de 0,5mL/min foi utilizada para completa purificação das frações I, IV e V. Cada fração foi submetida um diferente número de passagens pela coluna de Sephadex LH-20, variando de acordo com o peso final obtido a partir dos sucessivos ciclos de HSCCC. Para cada análise por exclusão

molecular, foram colhidos 50 tubos contendo aproximadamente 10mL cada, que foram posteriormente evaporados e analisados por TLC.

1.6. Cromatografia de camada delgada com placas preparativas (PTLC)

A passagem da fração FI pela coluna de Sephadex LH-20 não resultou em completa purificação, sendo necessária a posterior realização de PTLC. Foram utilizadas placas de sílica gel 50 de 20x20cm da UNIPLATE, obtidas da Analtech. Para eluição das placas preparativas foi utilizado o mesmo sistema de solventes das placas de TLC, ácido acético: metanol: água, no entanto a proporção de 3:1:1, em um volume total de 20mL, que mostrou-se mais efetivo na eluição das frações. As placas foram eluídas numa câmara de fluxo laminar vertical fechada e visualizadas à luz UV (254 e 365 nm), para demarcação e raspagem da sílica das bandas de eluição. Cada banda obtida pela raspagem sílica da placa de TLC foi agitada em metanol por 1h para solubilização da substância, em seguida filtrada em papel de filtro circular de 55mm da Whatman, evaporada e analisada por TLC.

1.7. Ressonância magnética nuclear (NMR)

A elucidação da estrutura química das moléculas isoladas foi realizada por ressonância magnética nuclear utilizando um equipamento Agilent Technologies 400NMR. Os espectros do hidrogênio e do carbono foram registrados em um sistema de espectrometria de NMR BRUKER TOPSPIN 2.1 ($^1\text{H-NMR}$: 400 e 600MHz e $^{13}\text{C-NMR}$: 125MHz) usando o padrão Bruker de sequência de pulso. Medidas bidimensionais (H-H COSY, HMBC, HMQC) foram obtidas no mesmo instrumento com as sequências de pulso usuais. Os picos foram visualizados a partir de um software ACD/NMR Processor Academic Edition. Todos os espectros foram medidos a 25°C, em metanol deuterado (MeOD) utilizando Tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os sinais químicos obtidos (em ppm) para as substâncias isoladas aparecem descritos abaixo.

Substância I (fig. III.8): pó amarelo- **Quercetina 3-O-ramnósido (Quercitrina)**; (209mg); $R_f \sim 0,81$ (ác. acético:metanol:água; 6:1:1); $^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz) δ ppm: 12,67 (1H, s, OH-5); 10,83-9,31(3H, s, OH), 7,27 (1H, s, $J = 2\text{Hz}$, H-6'); 7,22 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-2'); 6,84 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-5'); 6,36 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-8); 6,18 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-6); 5,23 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-1''); 4,92-3,09 (4H, açúcares); 0,79 (3H, d, $J = 4\text{Hz}$, H-6''). $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, MeOD): 178,22 (C-4); 164,65 (C- 7); 161,76 (C-5); 157,78 (C-4'), 156,91 (C-9); 148,89 (C-2); 145,66 (C-3'); 134,66 (C-3); 121,58 (C-1'); 121,19 (C- 6'); 116,11

(C-2'); 115,93 (C-5'); 104,54 (C-10); 102,28 (C-1''); 99,15 (C-6); 94,09 (C-8); 71,62 (C-4''); 71,06 (C-3''); 70,80 (C-5''); 70,52 (C-2''); 17,97 (C-6'').

Substância 2 (fig. III.11): pó amarelo- **Quercetina 3-O- β -galactósido (Hiperósido)**; (88,5mg); $R_f \sim 0,49$ (ác. acético:metanol:água; 6:1:1); $^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz) δ ppm: 12,60 (1H, s, OH-5); 10,83-9,11(3H, s, OH), 7,62 (1H, dd, $J = 8\text{Hz}/2\text{Hz}$, H-6'); 7,50 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-2'); 6,78 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-5'); 6,37 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-8); 6,17 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-6); 5,34 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-1''); 5,09-3,14 (4H, açúcares). $^{13}\text{C NMR}$ (125MHz, MeOD): 177,95 (C-4); 164,60 (C-7); 156,68 (C-9); 145,30 (C-3'); 133,92 (C-3); 122,49 (C-1'); 121,55 (C-6'); 116,38 (C-2'); 115,65 (C-5'); 104,37 (C-10); 76,31 (C-3''); 73,63 (C-5''), 71,66 (C-2''); 68,38 (C-4''); 60,59 (C-6'').

Substância 3 (fig. III.13): cristal amarelo- **Caempferol 3-O- α -L-ramnósido (Afzelina)**; (37,2 mg); $R_f \sim 0,88$ (ác. acético:metanol:água; 6:1:1); $^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz) δ : 7,74 (2H, d, $J = 8\text{ Hz}$, H2', H6'); 6,92 (2H, d, $J = 8\text{ Hz}$, H3', H5'); 6,33 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-8); 6,17 (1H, d, $J = 2\text{Hz}$, H-6); 5,37 (2H, s, $J = 2\text{ Hz}$, H-1); 4,5-3 (4H, açúcares); 0,91 (3H, t, $J = 8\text{ Hz}$, H-6).

1.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Um módulo de separação Waters 2695 acoplado a um detetor duplo de absorvância λ 2487 e um software Waters 717 plus foi utilizado para realização de HPLC. Utilizou-se uma Kromasil 100-5C18 de 250 x 4,6mm. Sete miligramas e meio de cada flavonóide purificado foram utilizados na preparação de soluções de referência nas seguintes concentrações: 1250 $\mu\text{g/ml}$, 625 $\mu\text{g/ml}$, 312,5 $\mu\text{g/ml}$, 156,25 $\mu\text{g/ml}$, 79,12 $\mu\text{g/ml}$, 39,06 $\mu\text{g/ml}$ e 19,53 $\mu\text{g/ml}$, juntamente com 1250 $\mu\text{g/ml}$ do extrato total (Sakipova *et al.*, 2017). Todas as amostras foram diluídas em metanol e água graduados para HPLC na proporção de 1:1 e filtradas antes de serem injetadas no aparelho. As amostras foram analisadas em triplicato ($n = 3$) e a curva de calibração contruída. A taxa de fluxo foi de 1ml/min e o volume de injeção foi de 5 μL . Os solventes utilizados como fase móvel foram 0,25% de ácido ortofosfórico em água graduada para HPLC, (solvente A) e metanol graduado para HPLC, (solvente B), num sistema gradiente de 40% B por 5 minutos, 55% B de 5 a 10 minutos, 65% B de 10 a 15 minutos, 50% B de 15 a 20 minutos e 30% B de 25 a 30 minutos. A detecção foi realizada usando comprimentos de onda de 254nm e 280nm. A água graduada para HPLC foi obtida a partir de um sistema de tratamento de água desionizada da PureLab Option e o metanol graduado para HPLC obtido da Sigma-Aldrich®.

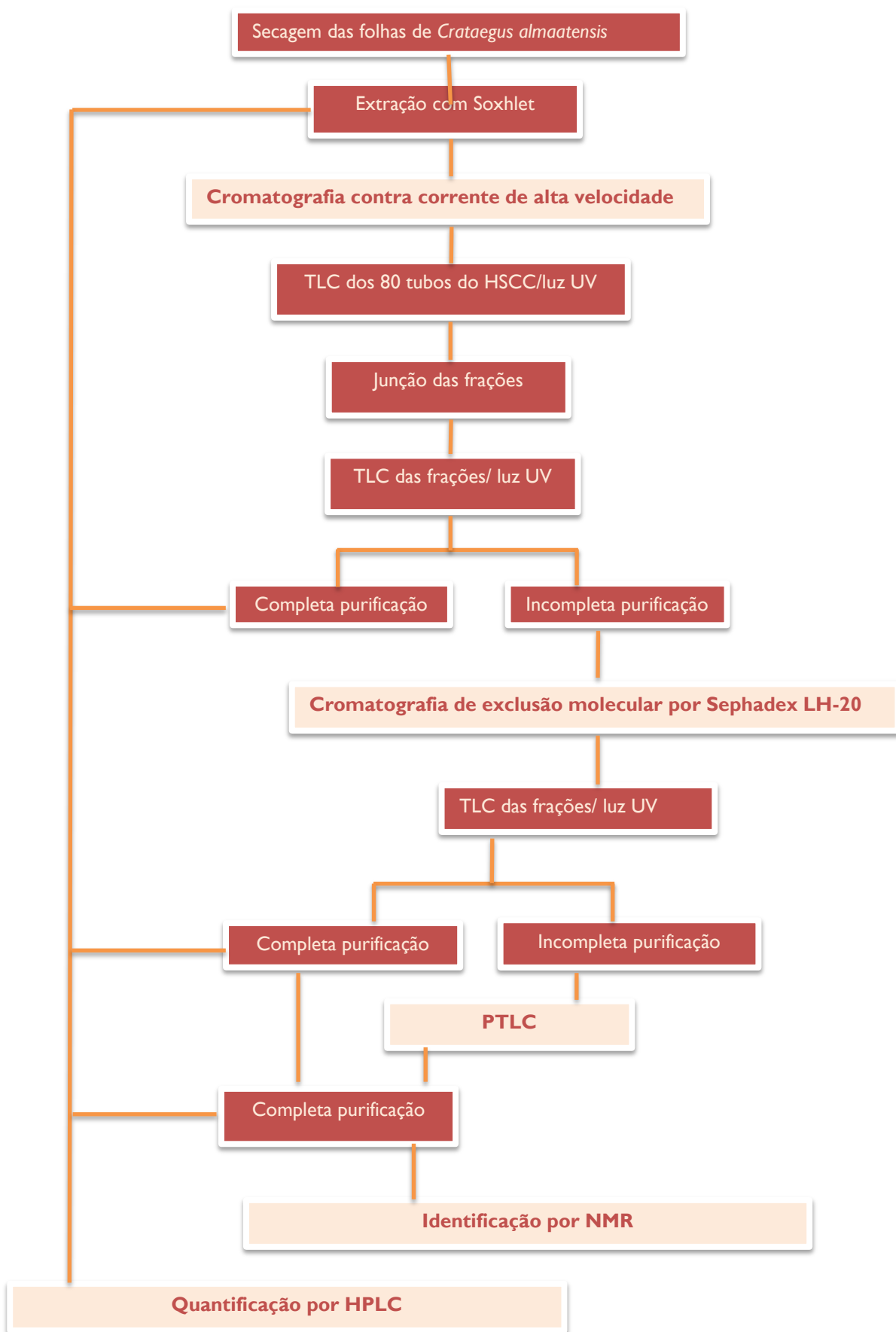


Figura II.3. Esquema experimental de determinação do perfil fitoquímico.

2. PARTE II – ANÁLISE FARMACOLÓGICA

2.1. Animais

Nos ensaios com animais foram utilizados murganhos Swiss Webster, machos e fêmeas (25-40 gramas, 8-10 semanas), doados pelo Biotério do Instituto Vital Brazil (Niterói-RJ). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, com temperatura ambiente controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% a 80% de umidade), em estante microisolada e caixas forradas com maravalha, com livre acesso (*ad libitum*) a ração e água em ciclos de luz e escuridão de 12h. Os ensaios foram realizados em ambiente silencioso, de forma a assim reduzir o stress aos animais. Foram respeitadas as normas para manipulação de animais conforme o guia de cuidados de animais de laboratório e o guia ético para investigações de dor experimental em animais conscientes. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ e Comité de Ética para Pesquisa Animal, registados sob o número DFBCICB015-04/16.

2.2. Preparação das soluções de administração

Foram preparadas soluções stock do extrato total de *C. almaatensis*, denominado CAET, da fase aquosa do extrato total, denominada CAFA, e das substâncias isoladas quercitrina, hiperósido e afzelina nas concentrações de 100mg/ml dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C . Para administração durante os ensaios os animais foram pesados e separados em grupos de 5-7 murganhos de acordo com o peso. A partir do peso dos animais, foram calculadas as doses a serem administradas, sendo 100mg/Kg, 30mg/Kg e 10mg/Kg para os extratos e 3mg/Kg, 1mg/Kg e 0,3mg/Kg para as substâncias isoladas. As doses calculadas foram administradas aos animais por via oral ou intraperitoneal, no volume total de 100 μL , utilizando-se óleo vegetal estéril ou água ultrapura como veículo, 1 hora ou 30 minutos antes da realização dos ensaios.

Um possível efeito tóxico ou analgésico do DMSO foi completamente descartado no presente trabalho, uma vez que o volume máximo de DMSO administrado foi 4 μl para um murganho de 40g na maior dose (100mg/Kg), 250 vezes menor que o volume necessário para obter um efeito analgésico com DMSO (Giorno *et al.*, 2015).

2.3. Modelo humano de reatividade vascular: artéria mamária interna (HIMA)

Os segmentos de artéria mamária interna humana foram colhidos a partir de cirurgias de revascularização coronária, realizadas no Centro de Cirurgia Cardiorácica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Os segmentos distais descartados da cirurgia foram colocados em solução fria de tampão bicarbonato de Krebs-Henseleit (em mmol/L: NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄·7H₂O 0,57; CaCl₂·2H₂O 1,90; KH₂PO₄ 0,90; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,1), previamente ajustado a pH de 7,4 e arejado com carbogénio (95% O₂/5% CO₂). No Laboratório de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, procedeu-se ao isolamento dos segmentos arteriais com remoção dos tecidos perivasculares, nomeadamente tecido adiposo, conjuntivo e muscular, sendo depois seccionados em anéis de 3mm, suspensos em banhos de órgãos de 10mL com solução de Krebs-Henseleit previamente arejada com carbogénio e ajustada a pH 7,4 e ligados a eléctrodos de força conectados ao sistema de aquisição de dados PowerLab (AD Instruments®). Após lavagem dos anéis, a tensão foi ajustada a uma tensão ótima de estabilização a qual correspondeu ao estado de equilíbrio atingido após a aplicação de uma força passiva de 2g (equivalente a 19,6milinewtons ou mN). Seguidamente, os anéis foram estabilizados por um período de 2 horas, tendo sido efetuadas lavagens periódicas.

Após o período de estabilização, a viabilidade das preparações foi avaliada com uma estimulação única com 60mM de cloreto de potássio (KCl) a qual foi repetida no final do ensaio para confirmar a manutenção da viabilidade dos anéis arteriais.

A atividade intrínseca dos extratos CAET e CAFA foi avaliada através da realização de curvas cumulativas de concentração-resposta, com as concentrações de 0,007mg/mL a 0,7mg/mL. Neste ensaio, os resultados foram expressos em valores de tensão absoluta do anel (em mN). Adicionalmente, foram realizadas curvas cumulativas de concentração-resposta de relaxamento após pré-contracção com noradrenalina (100 µM) nos mesmos intervalos de concentrações para ambos os extratos. Para este ensaio, os resultados foram expressos em percentagem de relaxamento relativamente à contracção máxima induzida pela noradrenalina.

A interação dos extratos com o sistema adrenérgico da artéria mamária interna humana foi avaliada realizando curvas cumulativas de concentração-resposta à noradrenalina. Uma primeira curva à noradrenalina foi realizada em todos os anéis na ausência de qualquer extrato. Após relaxamento e estabilização dos anéis, foi realizada a incubação com diferentes concentrações dos extratos CAET e CAFA (0,014mg/mL, 0,028mg/mL e 0,14mg/mL) por um período de 30 minutos, após o qual foi realizada a segunda curva à noradrenalina.

As duas curvas à noradrenalina foram registadas respeitando-se um intervalo de 1h entre elas para evitar taquifilaxia. Neste ensaio, os resultados foram expressos em percentagem relativamente à contração máxima obtida na primeira curva à noradrenalina, em cada anel arterial (curva controlo), considerando que segmentos adjacentes de um mesmo vaso possam ter diferentes padrões de reatividade (Silva *et al.*, 2016).

2.4. Modelo de dor aguda induzida por formalina

Uma solução de 2,5% de formalina (Formaldeído 37%) a um volume total de 20µL foi injetada na região plantar do membro posterior direito dos murganhos mediante leve contenção, 1 hora após administração oral e 30 minutos após administração intraperitoneal dos tratamentos com os extratos, as substâncias isoladas ou o veículo (água ultrapura). Seguidamente, os animais foram posicionados individualmente em câmara de vidro dividida em 6 câmaras menores de 10x10cm. A duração do tempo, em segundos, que os animais permaneciam lambendo a pata após a injeção de formalina foi então gravada para posterior análise em dois períodos distintos, fase inicial de dor neurogénica- 0 a 5 minutos após a injeção e fase tardia de dor inflamatória- 15-30 minutos após injeção (Giorno *et al.*, 2015).

Baseado na completa dissolução do extrato total, a primeira etapa do ensaio foi realizada utilizando-se óleo vegetal estéril como veículo de administração por via oral. Os animais foram separados em grupo de 5-7 animais, com peso médio entre 25-35g, nos quais foi administrado um volume total de 100µL do CAET e CAFA, nas doses de 10, 30 e 100mg/Kg, 1h antes da injeção de formalina na pata.

Para comparar o efeito da dissolução no veículo escolhido sobre os resultados, o protocolo experimental foi ampliado com a inclusão de um grupo tratado com CAFA na dose de 100mg/Kg utilizando-se água ultrapura como veículo e administrando-se nos animais os mesmos 100µL de volume total por via oral. Com o objetivo de excluir o efeito da via de administração sobre os resultados, repetiu-se o ensaio, utilizando água ultrapura como veículo e administrando-se um volume de 100µL dos extratos CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg e das substâncias isoladas afzelina, quercitrina e hiperósido na dose de 3mg/Kg, dessa vez por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de formalina na pata. Nos animais dos grupos controlo foram administrados 100µL dos diferentes veículos, seguindo o mesmo tempo e via de administração dos grupos tratados correspondentes.

2.5. Modelo da placa quente

O ensaio foi conduzido baseado no modelo da placa quente adaptado previamente descrito em *Sobrinho et al.* (Sobrinho et al., 2017). Para o modelo da placa quente foi utilizado um equipamento Insight, adquirido em SP- Brasil, a uma temperatura de $55 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais foram posicionados na placa quente, sendo registado o tempo de reação (considerando-se aqui lambertura da pata do membro posterior, retirada da pata ou pulo). O registo foi realizado em intervalos de 30 minutos, sendo dois registos realizados a 60 e 30 minutos antes do tratamento com os extratos e substâncias isoladas testadas e cinco registos realizados aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a administração do tratamento. A linha de base considerada como reação individual a temperatura foi obtida a partir da média dos dois primeiros registos a 60 e 30 minutos antes do tratamento por via intraperitoneal. Os grupos controlo foram tratados com veículo (água ultrapura) por via intraperitoneal e morfina na dose de 2,5mg/Kg.

2.6. Migração celular induzida por carragenina em bolsa de ar subcutâneo (SAP)

Uma bolsa de ar subcutânea foi feita no dorso dos animais após a injeção de 8mL de ar estéril. Após 4 dias, uma nova injeção de 10 mL foi feita para a manutenção da cavidade. No 6º dia, os animais receberam uma injeção de 1 mL de carragenina (1%) na SAP formada e 24 horas após foram anestesiados com hidrato cloral 1% anteriormente publicado em *Raymundo et al.* (Raymundo et al., 2011).

Os animais foram previamente tratados com o extrato total e com a fase aquosa do extrato na dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina. O grupo controlo foi formado por animais tratados com o veículo no mesmo esquema de administração dos grupos tratados. O grupo controlo negativo foi composto por animais que receberam injeção de 1mL de salina estéril na SAP.

Após a eutanásia, a SAP foi lavada com 1mL de salina estéril. Todo o exsudato foi colhido e quantificado, sendo retirada uma alíquota para contagem total de leucócitos. O restante do exsudato colhido foi centrifugado a 1200rpm por 10min e o sobrenadante foi retirado e congelado à -20°C para dosagens posteriores.

Seguidamente, procedeu-se à remoção do fémur, ao corte de ambas as extremidades e à lavagem da medula com 1mL de salina estéril. O lavado medular colhido foi utilizado para contagem total e diferencial dos leucócitos, sendo também efetuadas colheitas de sangue para realização de hemograma.

2.6.1. Contagem total de leucócitos

A contagem total de leucócitos nas amostras de sangue, medula e lavado subcutâneo foram realizadas em contador automático pocH-100iV Diff (Sysmex) hematology analyzer.

2.6.2. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10)

A quantificação das citocinas foi realizada no exsudato colhido da BAS. Os níveis das citocinas foram determinados utilizando-se kits específicos de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante BD Biosciences. Imunoplaquetas de 96 poços foram incubadas de um dia para o outro, a 4°C, com anticorpo de captura diluído no tampão diluente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com tampão de bloqueio. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem e foram adicionados os sobrenadantes coletados na SAP ou o padrão específico de citocina recombinante (preparado no tampão de bloqueio). Após a adição das amostras e da curva padrão, as placas foram incubadas de um dia para o outro a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo de detecção conjugado com a enzima. Após a lavagem das placas, procedeu-se à adição da solução de substrato e à incubação durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim foram adicionados 100 μ L de H₃PO₄1N como solução de paragem. A absorvância foi medida a 450nm utilizando-se um leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) e as concentrações das citocinas foram calculadas através da curva padrão de citocinas.

2.6.3. Quantificação da produção de monóxido de azoto (NO)

A quantificação da produção de NO foi determinada a partir da concentração de nitrato (seu metabolito estável) no sobrenadante do exsudato da BAS, usando a técnica da conversão de nitrato em nitrito (Bartholomew, 1984) adaptada por Raymundo *et al.* (Raymundo *et al.*, 2011), seguida pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Primeiramente, o sobrenadante do exsudato foi desproteínizado, em seguida, a 150 μ L da amostra adicionou-se 15 μ L de fosfato de sódio (0,5M; pH 7,2), 15 μ L de formato de amônio (2,4 M; pH 7,2) e 10 μ L da bactéria. Após incubação das amostras durante 2 horas a 37°C, foi realizada centrifugação a 1000rpm durante 10 minutos. Um volume de 100 μ L do sobrenadante foi misturado com

igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida em água e 0,1% naftiletenodiamina em 10% H_3PO_4) por 10 minutos. A absorvância foi medida no comprimento de onda de 540nm. A concentração de nitrato foi expressa em micromolar (μM) e calculada a partir de uma curva padrão de nitrato de sódio, previamente realizada.

2.6.4. Quantificação de proteínas

Foi realizada quantificação de proteínas pelo método de BCA usando um kit de dosagem de proteína BCATM (Thermo Fischer Scientific, Inc.). Uma alíquota de 5 μL de exsudato ou sangue foi misturada com o reagente BCA (195 μL , reagentes A: carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1M e B: sulfato de cobre 4%, na proporção 50:1) e incubados a 37°C, por 30 min. A absorvância foi medida em leitor de microplaca a 562nm. A concentração de proteínas foi expressa em $\mu g/mL$ e calculada utilizando uma curva padrão de albumina.

2.7. Modelo do campo aberto

Para realização do modelo do campo aberto os murganhos foram separados em três grupos de 4 a 5 animais cada, sendo um grupo controle e dois grupos tratados com os extratos CAET e CAFA. Os animais foram posicionados individualmente em caixas de 50x40cm com o fundo marcado em quadrados de 5cm². Cada animal foi gravado por um período de 5 minutos a 15, 30, 60, 120 e 210 minutos após a administração dos extratos, na dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal, ou veículo água ultrapura no caso do grupo controle. O número de linhas cruzadas foi posteriormente avaliado e o efeito sedativo foi quantificado como a redução da média do número de linhas cruzadas em relação ao grupo controle (Guilhon *et al.*, 2015).

2.8. Modelo do rotarod

A avaliação de falta de coordenação motora foi realizada através do modelo do Rotarod com um equipamento fabricado por AVS Projetos Especiais, Brasil. Os animais foram submetidos a um dia de treino a uma velocidade de rotação constante de 12rpm, por um tempo máximo de 5 minutos, em quatro tentativas, com um intervalo de 10 minutos entre cada uma das tentativas. Após 24h, os animais foram separados em três grupos de 5 animais,

sendo um grupo controle e dois grupos tratados com os extratos CAET e CAFA. O tempo da primeira queda e o número de quedas foi gravado para cada grupo avaliado nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 210 minutos após a administração dos extratos, na dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal, ou veículo (água ultrapura) no caso do grupo controle. A falta de coordenação motora foi quantificada como a redução da média de tempo da primeira queda e o aumento na média do número de quedas em comparação ao grupo controle (Guilhon et al., 2015).

2.9. Análise estatística

Nos estudos *in vivo* foram utilizados entre 5 e 7 animais por grupo. Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão (S.D.) para o modelo de dor aguda induzida por formalina, migração celular induzida por carragenina em bolsa de ar subcutâneo, modelo do campo aberto e rotarod. O efeito antinocicetivo no modelo da placa quente foi quantificado como área sob a curva, expresso em média \pm erro padrão da média (SEM) em comparação aos grupos controle. Os resultados obtidos a partir do modelo humano de reatividade da HIMA são apresentados como média \pm SEM (* $p < 0,05$ vs. controle). A significância estatística entre os grupos foi calculada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Os valores de p menores que 0,05 (* $p < 0,05$) e menores que 0,01 (** $p < 0,01$) foram usados como nível de significância. Foi utilizado GraphPad Prism® versão 5.1 para a análise estatística de todos os ensaios.

III. Resultados e Discussão

PARTE I- ANÁLISE FITOQUÍMICA

I.1. HSCCC e TLC

Estudos preliminares em isolamento e quantificação foram realizados para *C. almaatensis* no laboratório de Química da Escola de Farmácia no Biochemical Sciences Institute, TCD, onde, com o objetivo de identificar os principais constituintes das flores, folhas e frutos, foram utilizadas técnicas de HSCCC e HPLC. Dois principais flavonóides foram isolados e identificados como hiperósido e quercitrina, os quais apresentam uma distribuição diferencial consoante a parte da planta como demonstrado por estudos de quantificação em que foi encontrada uma maior quantidade de hiperósido nas flores ($19,79 \pm 0,36 \text{mg/g}$) e quercitrina nas folhas ($51,00 \pm 0,92 \text{mg/g}$).

Edwards et al. (2012) cita que os flavonóis glicosilados se encontram primordialmente nas flores enquanto os derivados de flavonas (e seus congêneres) e os polímeros como catequinas e epicatequinas, dos quais derivam as procianidinas de especial interesse no atual estudo, estão presentes em maior quantidade nas folhas (Edwards et al., 2012). Apesar de o flavonóide hiperósido aparentemente representar o padrão de qualidade da espécie, e o trabalho desenvolvido ter encontrado uma maior concentração do flavonóide nas flores, optou-se por dar continuidade ao estudo utilizando as folhas de *C. almaatensis*. Além disso, a quantidade de hiperósido isolado das folhas no presente estudo foi superior ao obtido no trabalho preliminar citado.

As folhas foram secas em uma sala bem arejada, à temperatura ambiente. Apesar de a secagem ao ar livre requerer mais tempo em relação a outras técnicas envolvendo alta temperatura, permite que compostos termosensíveis sejam preservados (Nn, 2015). O extrato foi previamente preparado pelo método Soxhlet para extração utilizando etanol como solvente conforme descrito anteriormente. O método Soxhlet requer uma menor quantidade de solventes em comparação ao método de maceração, mas ainda é considerado um método poluente comparado a métodos de extração mais avançados. Ainda assim, Soxhlet é o mais difundido entre os diferentes métodos de extração de fitoconstituintes comumente utilizados (Okoduwa et al., 2016).

Na tentativa de obter uma maior quantidade de flavonóides isolados a partir de *C. almaatensis*, optou-se por utilizar apenas a fase aquosa do extrato total para realização dos sucessivos ciclos de HSCCC, o que permitiu o isolamento dos dois flavonóides isolados

previamente a partir do extrato total por HSCCC e de um flavonóide adicional, representando uma otimização na técnica anterior de isolamento dos flavonóides, tendo sido este processo reproduzido ao longo dos 16 ciclos de HSCCC realizados.

HEMWat, composto pelos solventes hexano, acetato de etilo, metanol e água, foi o SSs de escolha para o estudo, uma vez que está descrito como sendo o sistema de solventes de escolha para uso em HSCCC e como sendo extremamente versátil na separação de constituintes de misturas complexas, devido a sua habilidade de distribuir as substâncias de média a alta polaridade nas suas respectivas fases orgânica e aquosa (Leitão et al., 2017). Os solventes pertencentes ao SSs HEWWat são os mais utilizados na separação de produtos naturais por HSCCC, provavelmente devido a sua capacidade de formar uma biofase estável, com uma razão volumétrica de quase 1:1, e grande capacidade de separação de substâncias fenólicas (Friesen et al., 2015). Além disso, a presença de uma fração glicosilada confere aos flavonóides um aumento na polaridade, sendo indicada a efetividade do SSs HEWWat apenas nas suas mais altas polaridades (entre 1:2:1:2 e 1:6:1:6) conforme utilizado no presente estudo (Figura II.1) (Neves Costa, Das e Leitão, 2010).

Após a definição do sistema de solventes, outros parâmetros operacionais, de forma interdependente, podem interferir no processo de separação desejado, incluindo a velocidade de rotação, a taxa de fluxo e a temperatura. Em sistemas hidrodinâmicos, a resolução aumenta à medida que a carga de amostra e o fluxo diminuem e a rotação aumenta. No presente trabalho, uma carga de aproximadamente 4,4mg da amostra por mL de coluna foi utilizada, respeitando o intervalo de 0,5-5mg/mL de coluna descrito como ideal a atingir uma adequada resolução em HSCCC de produtos naturais. Um estudo desenvolvido para outra espécie de *Crataegus spp.* utilizando EbuWat como SSs, observou como sendo parâmetros ótimos, uma temperatura de 25°C, uma taxa de fluxo de 1,5mL/min a uma rotação de 850rpm para uma coluna hidrodinâmica de 280mL (Friesen et al., 2015). No presente estudo, um fluxo de 2mL/min e uma rotação de 865rpm foram aplicados para o SSs HEWWat em uma coluna de 136mL. A temperatura não foi controlada durante o ensaio, desenvolvido a temperatura ambiente, sem levar em consideração alterações de arrefecimento do equipamento. Além disso, talvez tivesse sido proveitoso durante a seleção do SSs para HSCCC a comparação entre HEWWat e EbuWat, descrito por Neves Costa, Das e Leitão como eficaz no isolamento de flavonóides glicosilados (Neves Costa, Das e Leitão, 2010).

No primeiro ciclo de HSCCC foram colhidos manualmente 80 tubos contendo 4mL cada, a partir dos quais foi possível inicialmente identificar, através de TLC e visualização em luz UV, diferentes bandas de eluição que determinaram uma junção inicial

dos tubos em 12 frações (Figura III.1), sendo FI (tubos 1-10), FII (tubos 11-18), FIII (tubos 19-28), FIV (tubos 29-39), FV (tubos 40-49), FVI (50-52), FVII (tubos 53-58), FVIII (tubos 59-61), FIX (tubos 62-68), FX (tubos 69-70), FXI (tubos 71-76) e FXII (tubos 77-80).

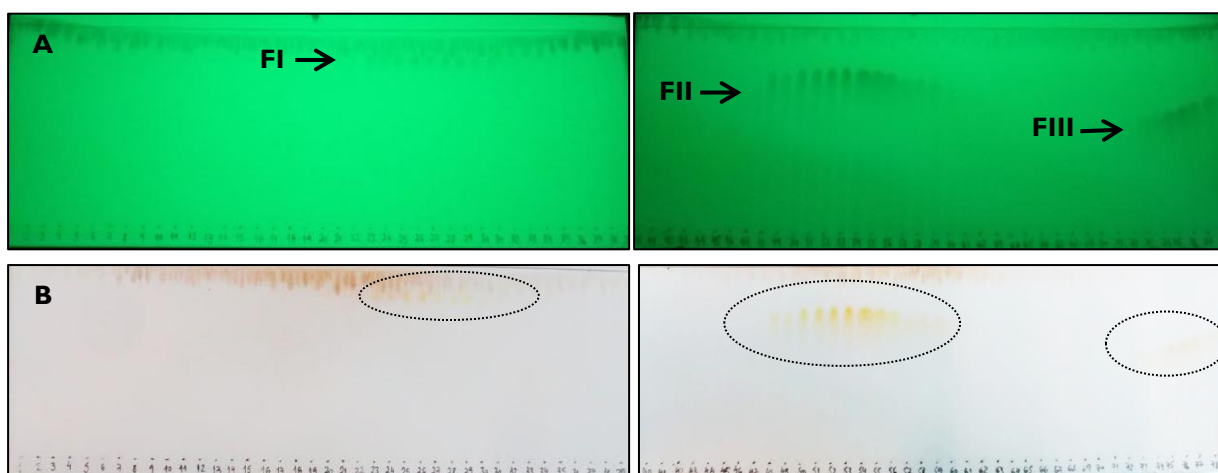


Figura III.1: Placas de TLC após HSCCC reveladas em luz UV (A) e no revelador de ácido sulfúrico (B). Detalhe para as frações FI, FII e FIII correspondentes às substâncias isoladas.

Os sucessivos ciclos de HSCCC seguidos de placas de TLC das junções permitiram o rearranjo das frações iniciais em cinco frações (fig. III.2), sendo FI (tubos 19-39), FII (tubos 40-61), FIII (tubos 62-76), FIV (tubos 77-80) e FV (resíduo da fase aquosa do extrato após a colheita dos 80 tubos) com padrão de eluição e valores de R_f similares entre si.

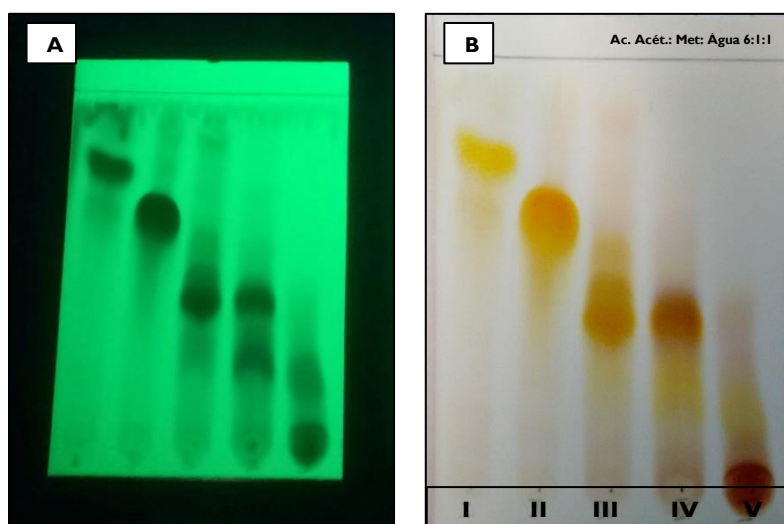


Figura III.2: Placa de TLC resumo após junções das novas frações (FI a FV) reveladas em luz UV (A) e no revelador de ácido sulfúrico (B).

No final de 16 ciclos de HSCCC, as frações obtidas necessitavam ser purificadas. O uso de recristalização em metanol com subsequente remoção do sobrenadante e

evaporação permitiu a purificação das frações FII e FIII. De acordo com os valores do fator de retenção (R_f) obtidos a partir das placas de TLC das substâncias isoladas das frações FII ($R_f \sim 0,81$) e FIII ($R_f \sim 0,49$) foi possível concluir trataram-se das mesmas substâncias isoladas anteriormente em trabalhos preliminares para *C. almaatensis*. Os dados de espectrometria de ressonância magnética nuclear do ^1H e do ^{13}C permitiram identificar as substâncias isoladas como quercetina 3-O-ramnósido ou quercitrina e quercetina 3-O-galactósido ou hiperósido, respectivamente. A purificação por recristalização em metanol das restantes frações não foi possível de ser realizada, necessitando a aplicação de técnicas adicionais de filtração em gel de Sephadex LH-20 e PTLC para ser atingida a purificação completa. Muitas vezes uma única técnica de separação não é suficiente para obter o isolamento de uma substância pura proveniente de uma mistura complexa de substâncias com diferentes polaridades e quantidades (Zhou *et al.*, 2015).

1.2. Filtração em gel de Sephadex LH-20 e PTLC

O uso da técnica cromatográfica de Sephadex LH-20 em combinação com a técnica de HSCCC, está descrito como capaz de promover uma maior purificação de polifenóis previamente isolados por HSCCC, quando comparado ao uso das técnicas separadamente (Yang, C., Li e Wan, 2008). As frações FI, FIV e FV foram submetidas a repetidas passagens por coluna de Sephadex LH-20 seguidas de aplicação em placas de TLC e visualização à luz UV. A cromatografia de Sephadex LH-20 permitiu a purificação das substâncias isoladas a partir das frações FIV e FV.

A purificação da FIV em coluna de Sephadex LH-20 permitiu a separação em 4 subfrações: sfl (tubos 1-13), sflI (tubos 14-17), sflII (18-24) e sflIV (tubos 25-50). A placa de TLC das subfrações da FIV permitiu a identificação de duas bandas de eluição distintas nas subfrações sflI e sflII (fig. III.3). No entanto, o R_f da sflII ($R_f \sim 0,46$) apresentava-se idêntico ao R_f da fração FII, indicando o possível isolamento de apenas uma substância adicional a partir da sflI ($R_f \sim 0,23$). As seguintes passagens da FV pela coluna de Sephadex LH-20 permitiram isolar uma substância promissora ($R_f \sim 0,4$) distinto das restantes substâncias a partir da sflII (tubos 15-20).

No entanto, as substâncias isoladas a partir da sflII da FV bem como as substâncias isoladas a partir das sflI e sflII da IV não puderam ser estruturalmente elucidadas por NMR, sendo excluídas de posteriores ensaios farmacológicos.

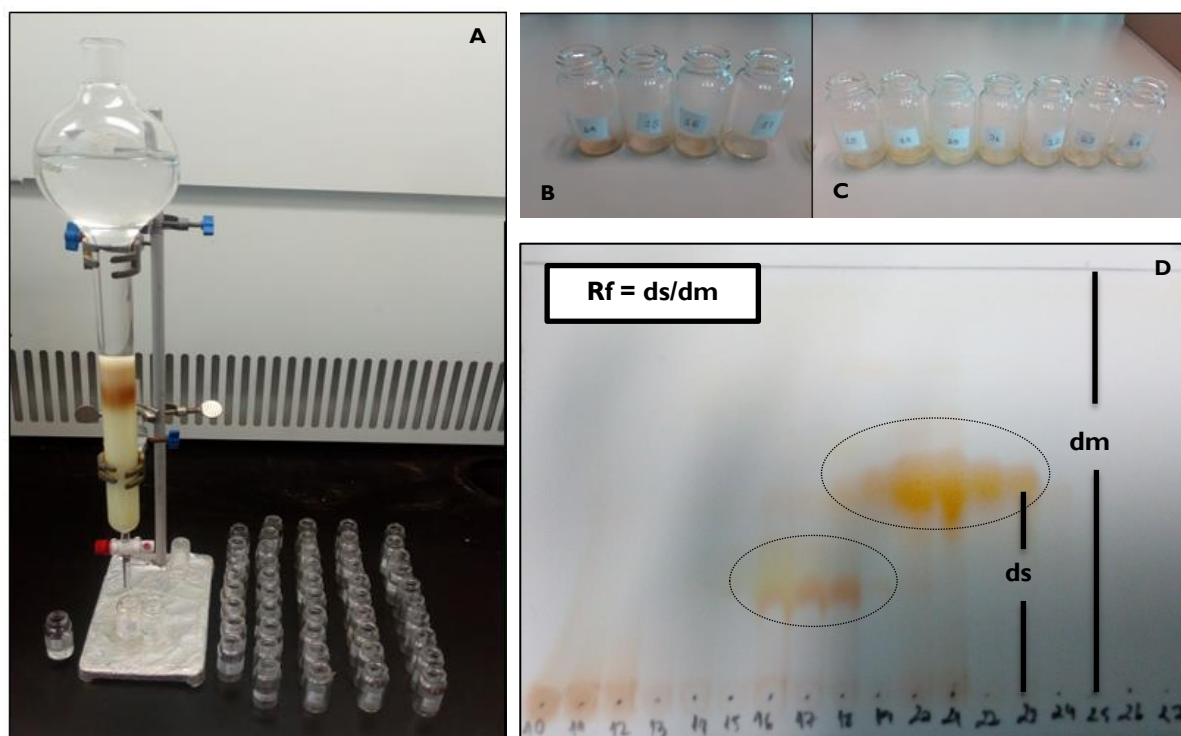


Figura III.3: Purificação da FIV em coluna de sephadex (A), separação das subfrações sflI (B) e sflII (C) e observação da placa de TLC após revelação com ácido sulfúrico (D).

No caso da substância isolada a partir da FI, ao final das sucessivas passagens por coluna de Sephadex LH-20 não foi possível obter a purificação da fração, que foi removida inalterada na subfração sflI (tubos 18-23), sendo ainda necessária a associação da técnica de cromatografia de camada delgada por placas preparativas para que se obtivesse a completa purificação da substância, posteriormente identificada como afzelina através de NMR. A técnica de PTLC tem o propósito de isolar substâncias puras a serem posteriormente analisadas através de diferentes técnicas cromatográficas e espectrométrica e investigadas quanto às suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas e/ou biológicas. Muitas vezes pode ser necessário repetir o PTLC para obter adequada pureza de uma substância para futura análise de elucidação estrutural (Rabel e Sherma, 2017). Conforme observado na aplicação da PTLC à purificação da afzelina, foi necessário repetir o PTLC sucessivas vezes, para que se obtivesse a substância pura e em quantidade suficiente para análise por NMR, viabilizando assim a sua elucidação estrutural.

A cromatografia de placas preparativas da sflII permitindo a separação em duas bandas distintas próximas uma da outra na porção superior da placa conforme fig. III.4. A placa de TLC obtida a partir das bandas raspadas da placa preparativa permitiu a isolamento

de duas substâncias com R_f bem definido, sendo uma substância distinta das demais substâncias até então isoladas ($R_f \sim 0,88$) e outra com R_f semelhante ao da FII ($R_f \sim 0,46$).

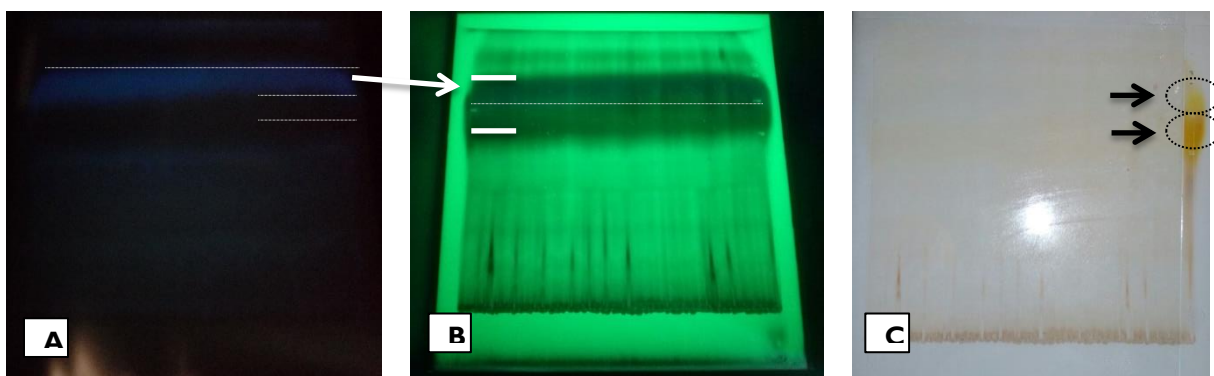


Figura III.4: PTLC da FI: Visualização da placa preparativa em UV 365 nm (A) e 254nm (B) e revelação da lateral da placa com ácido sulfúrico (C) permitindo a demarcação de duas bandas distintas.

No final do processo de purificação das frações, foi possível obter um total de 37,2mg do flavonóide isolado da FI (afzelina), 209mg do flavonóide isolado da FII (quercitrina) e 60,5mg da substância isolada da FIII (hiperosídeo) demonstrado no esquema abaixo (Figura III.5).

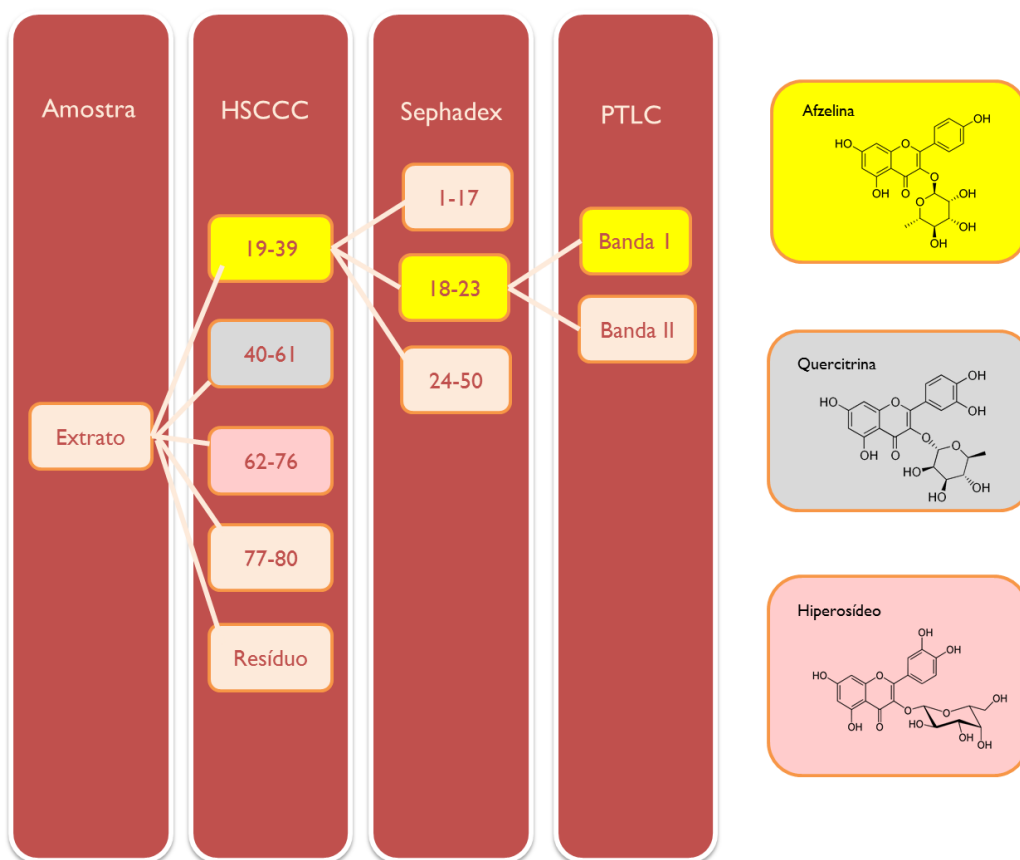


Figura III.5: Sequência de separação das substâncias isoladas do extrato de *C. almaatensis* utilizando HSCCC, Sephadex e PTLC.

I.3. NMR e HPLC

A subfração sflI ($R_f \sim 0,23$) isolada da FIV bem como a substância isolada da FV ($R_f \sim 0,46$) por sucessivas passagens pela coluna de Sephadex LH-20 não puderam ser identificadas por ressonância magnética nuclear de ^1H como flavonóides ou substâncias de interesse para o estudo conforme mencionado anteriormente.

A análise dos dados espectrais de NMR do ^1H e do ^{13}C da substância isolada da FII por HSCCC (fig. III.6 e III.7) e purificada a partir de recristalização em metanol permitiram a elucidação estrutural da molécula identificada como quercetina 3-O-ramnósido (quercitrina) (fig. III.8).

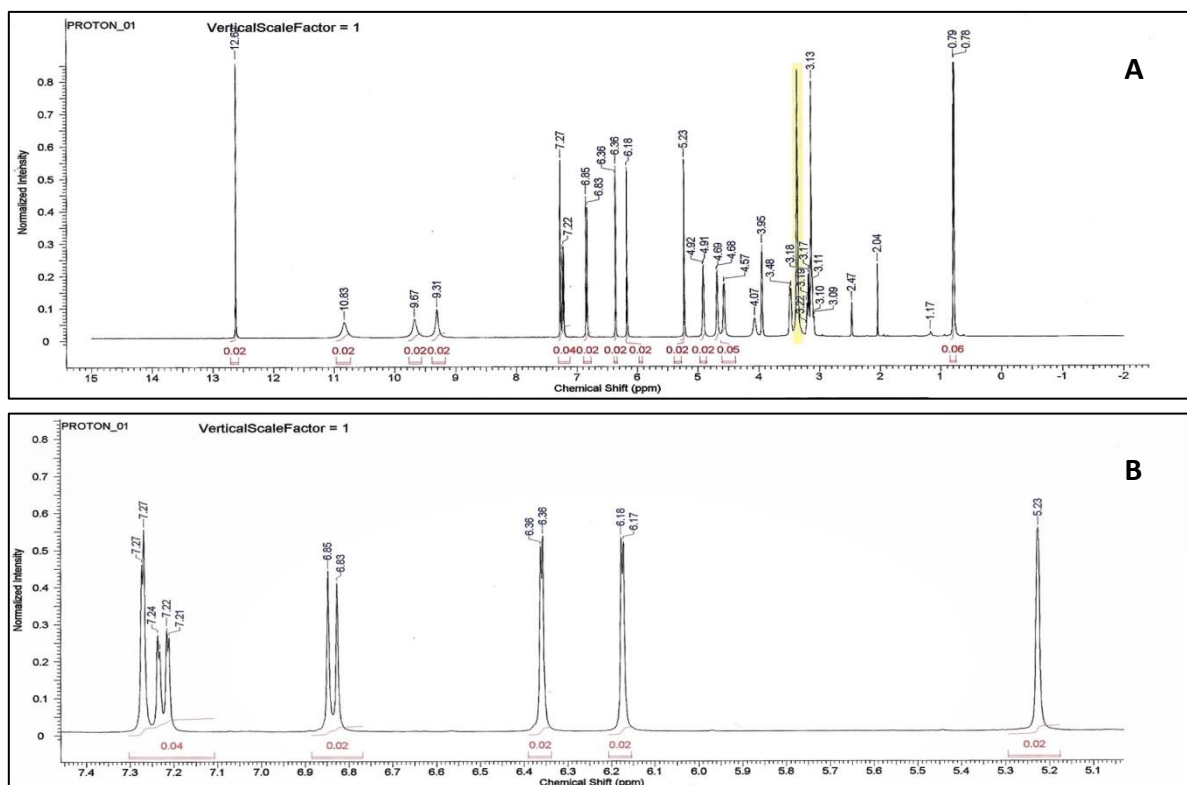


Figura III.6: Espectro de NMR de ^1H da quercitrina (CDCl_3 , 400 Mhz). Em A, espectro completo.

Em B, ampliação do espectro entre 5,1 e 7,4 ppm.

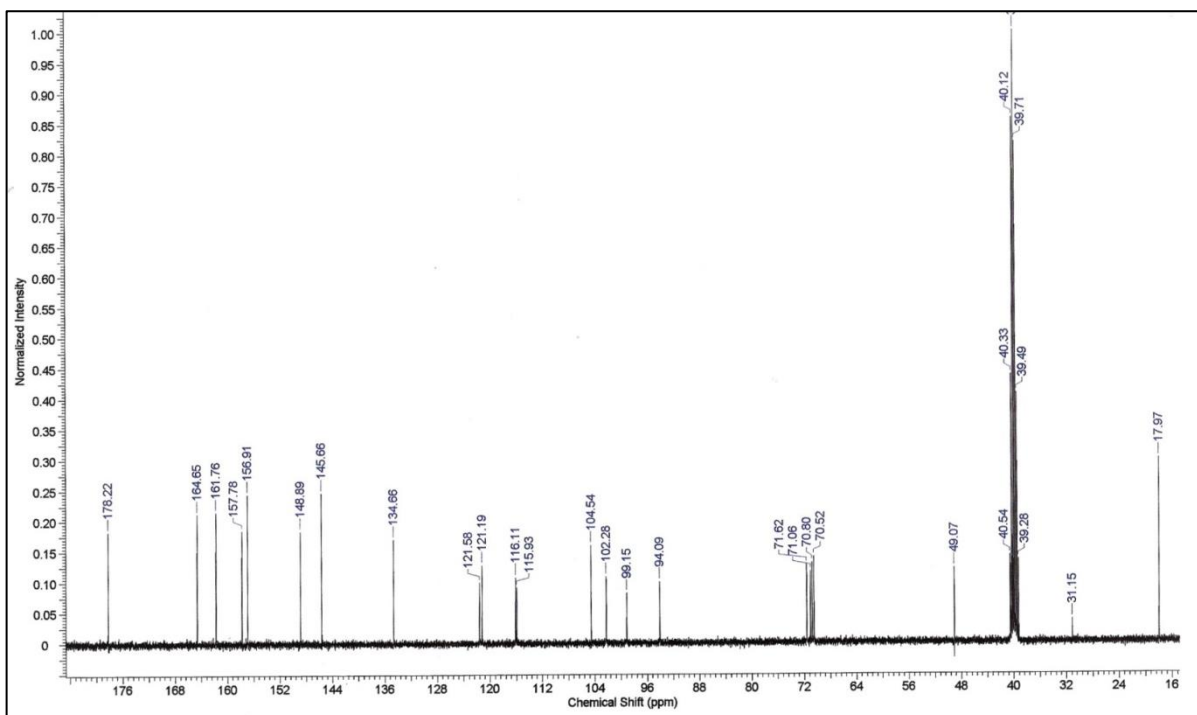


Figura III.7: Espectro de NMR do ^{13}C da quercitrina (MeOD, 125 Mhz).

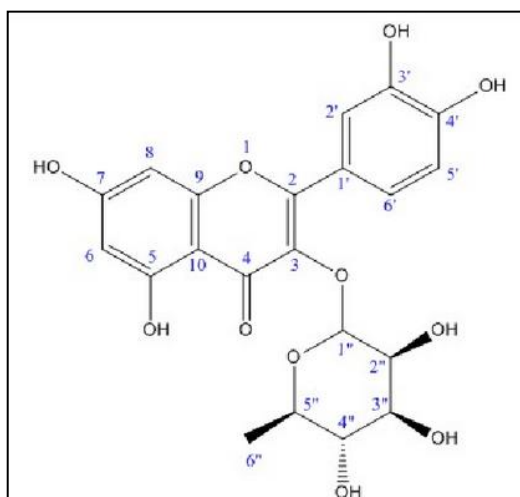


Figura III.8: Estrutura química da quercitrina.

O espectro apresentou quatro singletos entre δ 9,0 a 13 ppm, característicos do grupo hidroxilo, destacando-se o sinal 12,67 (5-OH); cinco sinais de deslocamento na região de hidrogénios aromáticos (δ 6,0 a 7,5 ppm), sendo um duplo dubleto e quatro dubletos, característicos do esqueleto flavonol. Dentre eles destacam-se os sinais 7,27 (H2'), 7,22 (H6') e 6,84 (H5'). Esses sinais sugerem um acoplamento do tipo meta do H6' com o H2' e orto do H6' com o H5' no anel B. Os sinais múltiplos entre 3 e 4,9 ppm estão relacionados aos quatro hidrogénios das unidades de açúcar na molécula. O sinal a $\delta = 5,23$ representa o hidrogénio anomérico da ramnose.

O NMR do ^{13}C apresentou um sinal de carbono em mostrou $\delta = 17,97$, correspondente ao carbono metílico da ramnose. Os deslocamentos químicos observados entre 70,52 e 102,58ppm, são possivelmente referentes a unidade sacarídica da quercitrina formada por ramnose.

O estudo comparativo demonstrou serem os sinais de deslocamento químicos obtidos pelo NMR do ^1H e do ^{13}C da quercetrina isolada da *C. almaatensis* compatíveis com valores obtidos em estudos anteriores conforme Tabela I.

Tabela I: Deslocamento químico da quercitrina (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H e do ^{13}C em comparação com os valores encontrados na literatura.

Posição	<i>Experimental</i>		<i>Literatura*</i>	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
6''	0,79	17,97	0,86-0,97	16,3-17,8
2''	-	70,52	4,11-4,26	70,6-72,8
5''	-	70,80	3,21-3,43	70,5-72,0
3''	-	71,06	3,70-3,76	70,7-72,5
4''	-	71,62	3,32-3,34	71,9-73,4
8	6,36	94,09	6,29-6,37	93,4-95,3
6	6,18	99,15	6,13-6,20	96,5-100,6
1''	5,23	102,28	5,29-5,37	102,1-103,8
10		104,54		104,5-105,9
5'	6,84	115,93	6,86-6,94	115,0-117,3
2'	7,27	116,11	7,28- 7,35	115,6-116,9
6'	7,22	121,19	7,25-7,31	121,6-123,2
1'		121,58		121,6-123,1
3		134,66		134,9-136,2
3'		145,66		145,0-146,5
2		148,89		149,8-159,3
9		156,91		157,1-159,3
4'		157,78		148,3-159,3
5		161,76		161,7-163,2
7		164,65		164,4-167,2
4		178,22		178,2-179,7

*(Kim et al., 2004; Hanamura, Hagiwara e Kawagishi, 2005; Suedee, Tewtrakul e Panichayupakaranant, 2013; Aderogba et al., 2010; Park et al., 2014; Ahmad et al., 2016).

O espectro de NMR do ^1H e do ^{13}C da substância isolada a partir da FIII por HSCCC (Figuras III.9 e III.10) e purificada por recristalização em metanol, possibilitaram sua identificação substância como sendo quercetina 3-O- β -galactósido (hiperósido) (Figura

III.11).

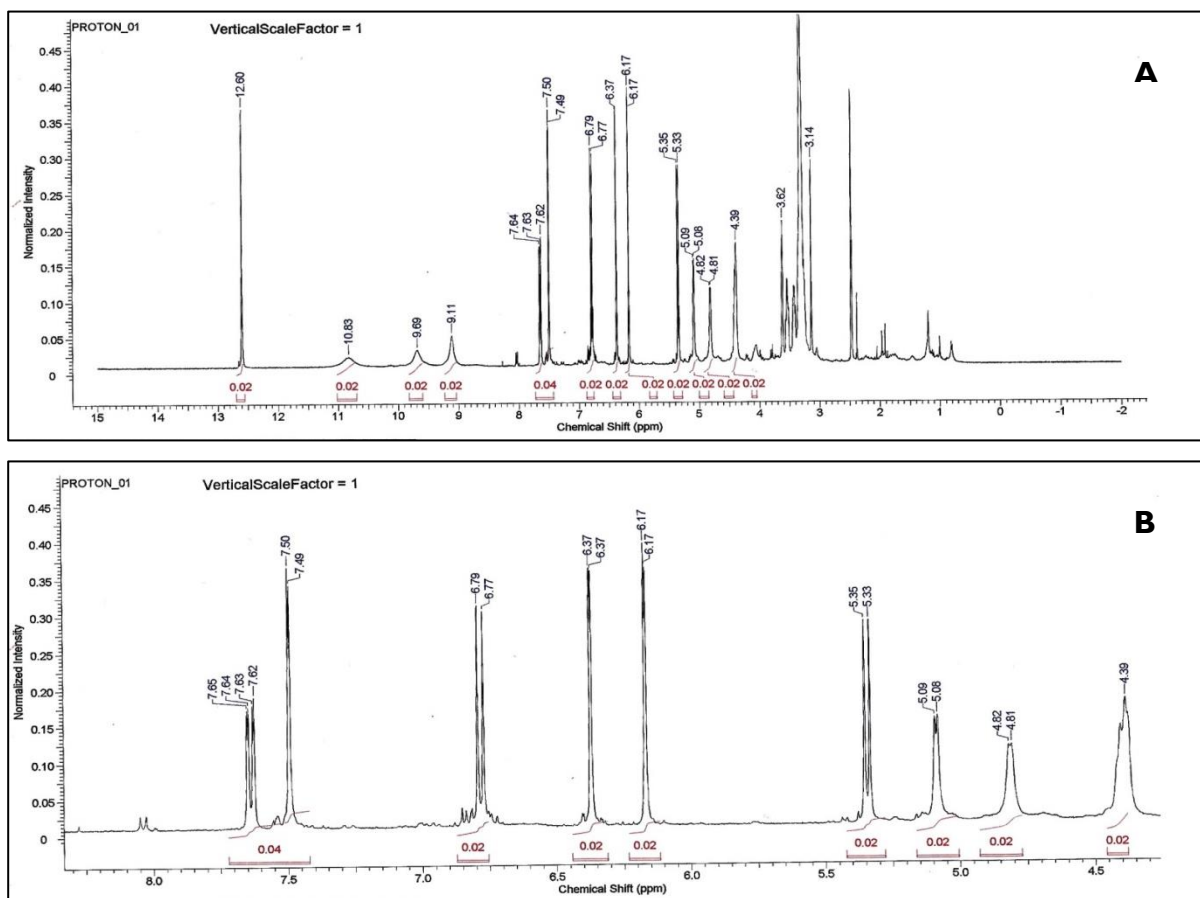


Figura III.9: Espectro de NMR de ^1H do hiperósido (CDCl_3 , 400 Mhz). Em A, espectro completo. Em B, ampliação do espectro entre 4,39 e 7,65 ppm.

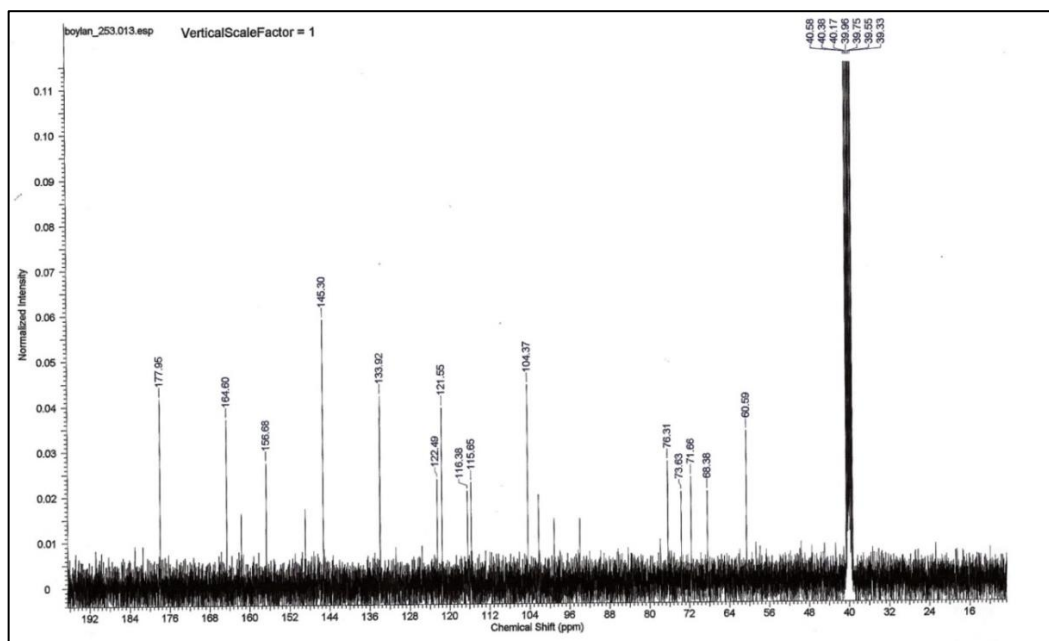


Figura III.10: Espectro de NMR do ^{13}C do hiperósido (MeOD , 125 Mhz)

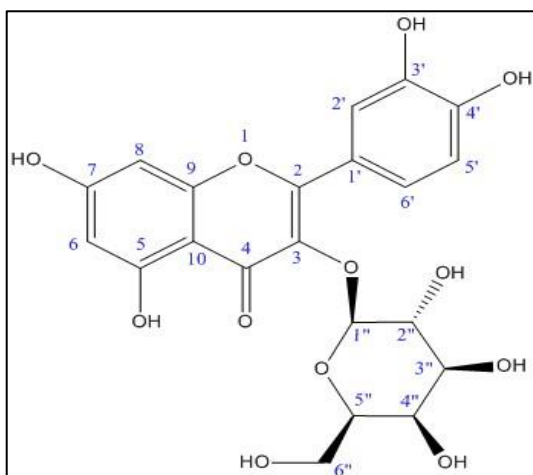


Figura III.11: Estrutura química do hiperósido.

Os dados espectrais mostram quatro singletos entre δ 9.0 a 13 ppm, característicos de grupo hidroxilo, com destaque para o sinal 12,60 (5-OH); São observados no espectro expandido cinco sinais de deslocamento característicos de hidrogénios aromáticos entre δ 6,0 a 7,65 ppm, sendo estes um duplo dubleto e quatro dubletos, característicos do esqueleto flavonol. Os sinais 7,62 (H6'), 7,50 (H2') e 6,78 (H5') são indicativos de acoplamento do tipo meta e orto no anel B. Os sinais entre 3 e 5,09 ppm referem-se aos hidrogénios da unidade de açúcar. Também foi possível observar o hidrogénio anomérico da galactose ($\delta = 5,08$ ppm).

Os deslocamentos químicos observados no NMR do ^{13}C entre 60,59 e 103ppm, são possivelmente referentes à unidade sacarídica do hiperósido.

O estudo comparativo possibilitou a confirmação da elucidação estrutural da substância isolada a partir da semelhança dos sinais espectrais obtidos pelo NMR do ^1H e do ^{13}C em metanol deuterado do hiperósido em comparação com valores obtidos previamente e apresentados na Tabela II.

Tabela II: Deslocamento químico do hiperósido (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H e do ^{13}C em comparação com os valores encontrados na literatura.

Posição	<i>Experimental</i>		<i>Literatura*</i>	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
6''		60,59	3,64-3,65	60,4-61,9
2''		71,66	3,49-3,82	71,3-77,3
5''		73,63	3,46-3,83	70,2-77,4
3''		76,31	3,52-3,56	73,4-75,6
4''		68,38	3,77-3,86	68,1-73,3
8	6,37		6,37-6,48	93,5-94,9
6	6,17		6,18-6,28	98,0-100,1
1''	5,34		5,01-5,26	102,3-105,2
10		104,37		103,9-105,7
5'	6,78	115,65	6,84-6,94	114,6-117,9
2'	7,50	116,38	7,82-8,04	115,3-117,9
6'	7,62	121,55	7,54-7,62	121,4-123,2
1'		122,49		121,3-123,3
3		133,92		133,7-135,7
3'		145,30		144,0-146,1
2				157,0-159,2
9		156,68		156,3-158,6
4'				148,3-150,1
5				161,0-163,2
7		164,60		164,1-166,7
4		177,95		177,6-179,7

*(Ahmad *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Renda *et al.*, 2018; Abedini *et al.*, 2013; Cota *et al.*, 2012).

Caempferol 3-O- α -L-ramnósido (afzelina) (fig. III.13) teve sua elucidação estrutural a partir dos dados espectrais de NMR do ^1H da substância isolada a partir da FI por HSCCC seguido de Sephadex de PTLC (Figura III.12).

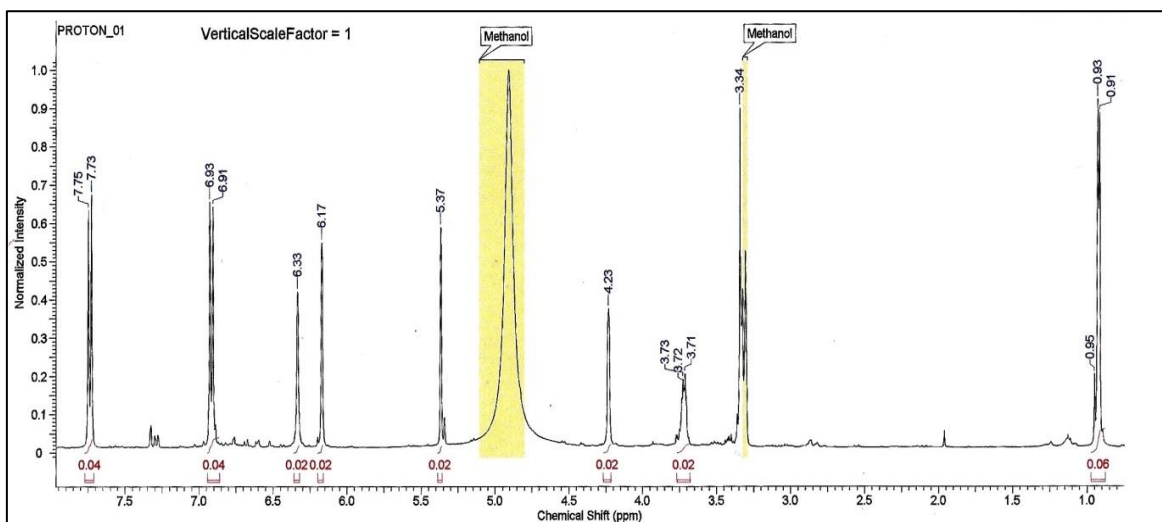


Figura III.12: Espectro de NMR do ^1H (MeOD, 400 MHz) da afzelina isolada do extrato etanólico de CA.

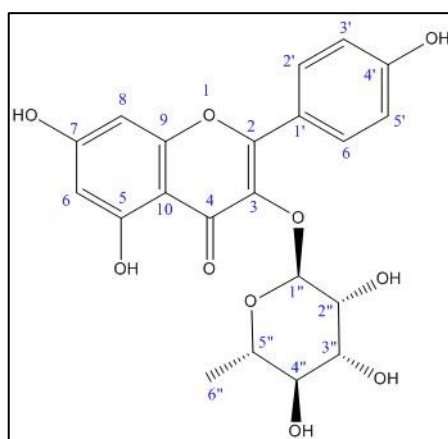


Figura III.13: Estrutura química da afzelina

O espectro da afzelina apresentou quatro sinais de deslocamento na região de hidrogénios aromáticos (δ 6,0 a 7,8 ppm), sendo dois singletos e dois dubletos, característicos do esqueleto flavonol. Dentre eles destacam-se os sinais 7,75 ($\text{H}^{2'}$), 7,73 ($\text{H}^{6'}$) e 6,91 ($\text{H}^{5'}$). Esses sinais sugerem um acoplamento do tipo meta e orto no anel B. Os sinais entre 3,5 e 5,5 ppm estão relacionados às unidades de açúcar na molécula. O sinal em $\delta = 0,91$ ppm é característico do grupo metil, em formato de dubleto da ramnose (Zapesochnya, 1982). Também foi identificado o hidrogénio anomérico da ramnose ($\delta = 4,3$ ppm). Não foi possível realizar o NMR do C pela pouca quantidade de material obtido e restrição de tempo para dar continuidade a este ensaio. Os valores de sinais espectrais do NMR do ^1H obtidos para afzelina estavam de acordo ou muito próximos aos valores previamente descritos na literatura para esta substância em metanol deuterado (Tabela III).

Tabela III: Deslocamento químico da afzelina (δ em ppm) obtido pelo NMR do ^1H em comparação com os valores encontrados na literatura.

Posição do Protão	Experimental	Literatura*
H-2'	7,75	7,73- 8,00
H-6'	7,73	7,73-8,00
H-3'	6,93	6,84-6,93
H-5'	6,91	6,84-6,93
H-8	6,33	6,36-6,4
H-6	6,17	6,15-6,20
H-1	5,37	5,29-5,38
H-2	4,23	4,20-4,22
H-3	3,71	3,71-3,98
H-4		3,32-3,60
H-5		3,33-3,47
H-6	0,91	0,84-0,92

*(Joo *et al.*, 2014; Lee, S. Y. *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2004 ; Lee, J. H. *et al.*, 2015; Yang, N. Y., Tao e Duan, 2010; Kim *et al.*, 2004).

De acordo com Edwards *et al.* (2012), os principais flavonoides encontrados no género *Crataegus* são do tipo flavonol-O-glicosilados e do tipo flavona-C-glicosilados, sendo que no presente trabalho todos os flavonóides isolados são do tipo flavonol-O-glicosilados. A produção específica de flavonóides depende de uma grande variedade de fatores, incluindo a genética da planta, condições ambientais e em que parte da planta a substância é formada (Edwards *et al.*, 2012).

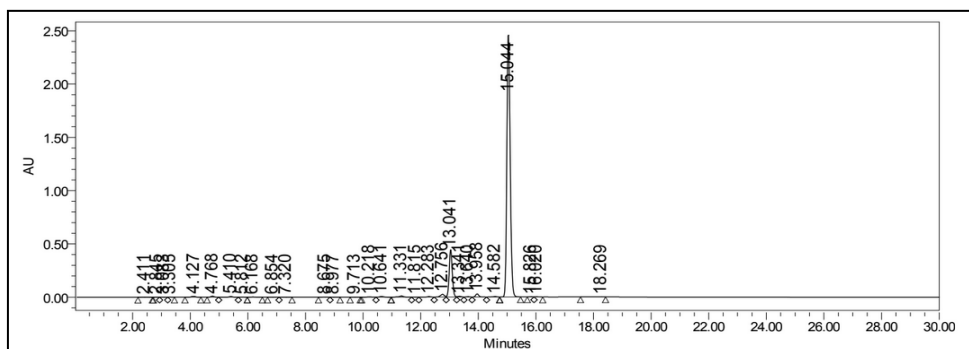
No que concerne a análise das substâncias fenólicas por HPLC, vários são os suportes e fases móveis disponíveis para diferentes extratos de plantas e alimentos. O uso de HPLC de colunas de fase reversa C18 são quase que exclusivamente utilizados para a separação destas substâncias. Acetonitrilo e metanol são os solventes orgânicos mais utilizados e em muitos casos e a fase móvel é acidificada com um modificador como ácido acético, ácido fórmico ou ácido fosfórico (Dai e Mumper, 2010).

Metanol é frequentemente preferível a acetonitrila devido a possibilidade de utilizá-lo em altas porcentagens na fase móvel, o que protege a coluna de HPLC. A acidificação da fase móvel tem o objetivo de manter o pH do ensaio de HPLC em torno de 2-4, evitando a ionização das substâncias fenólicas, melhorando assim a resolução e reprodutibilidade das características de retenção. Quando diferentes compostos fenólicos

com estruturas químicas diferentes são analisados simultaneamente, é mandatório o uso de eluição gradiente (Stalikas, 2007).

Soluções de referência das diferentes substâncias isoladas foram preparadas e submetidas à análise de HPLC gradiente de fase reversa utilizando um coluna C18, mostrando um tempo de retenção aproximado de 15,2 minutos para a afzelina, 13,4 minutos para quercitrina e 11,7 minutos para o hiperósido e os cromatogramas podem ser visualizados abaixo. O menor tempo de retenção observado para o hiperósido está relacionado a sua maior hidroxilação, uma vez que a molécula apresenta-se hidoxilada nas posições 5 e 7 do anel benzeno A, 3' e 5' do anel benzeno B e possui uma galactose ligada ao esqueleto flavonol com mais quatro hidroxilos. A quercitrina segue o hiperósido com o segundo menos tempo de retenção, pois apresenta um hidroxilo a menos na ramnose da molécula e a afzelina, por sua vez, apresenta a mesma fração de açúcar da quercitrina e está hidoxilada apenas na posição 4' do anel B. Dentre os flavonóis, a hidroxilação reduz o tempo de retenção devido a um aumento na polaridade (Biesaga, 2011).

A construção das curvas de calibração foi baseada no método descrito e validado por Sakipova (2017) a partir da média da área sob a curva ($n=3$) das diferentes concentrações das substâncias isoladas (1250 $\mu\text{g/ml}$, 625 $\mu\text{g/ml}$, 312,5 $\mu\text{g/ml}$, 156,25 $\mu\text{g/ml}$, 78,13 $\mu\text{g/ml}$, 39,06 $\mu\text{g/ml}$ e 19,53 $\mu\text{g/ml}$) e utilizadas como solução de referência. Foram excluídas do presente trabalho as concentrações de 9,77 $\mu\text{g/ml}$ e 4,88 $\mu\text{g/ml}$ e as amostras analisadas em triplicata em vez de quadruplicada conforme descrito em Sakipova (2017). Todas as substâncias demonstraram boa linearidade com coeficientes de regressão $R^2 \geq 0,99$ (Biesaga, 2011). As curvas de calibração abaixo foram usadas para quantificação das substâncias no extrato total, utilizando o cromatograma do CAET a uma concentração de 1250 $\mu\text{g/ml}$.



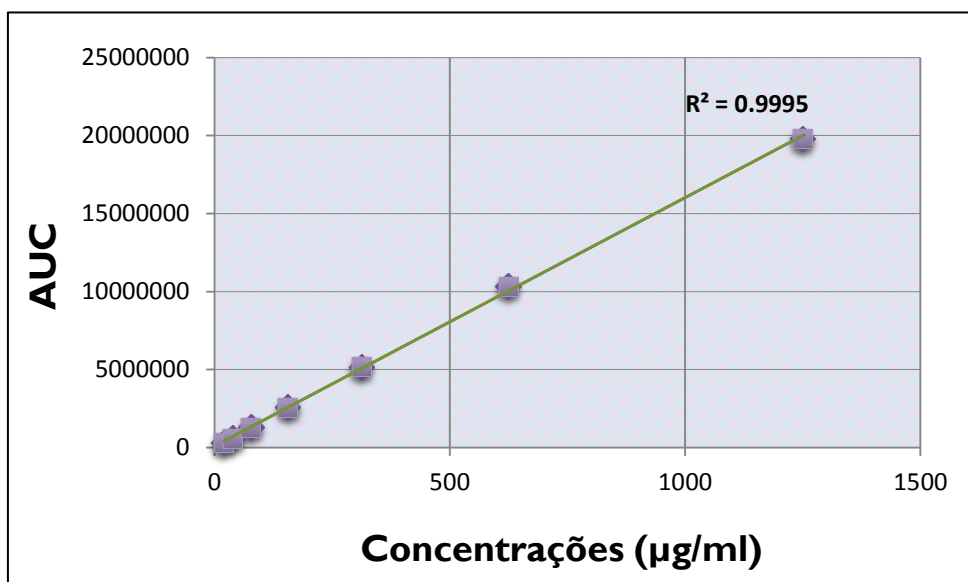


Figura III.14: Afzelina: Cromatograma do HPLC gradiente e curva de calibração.

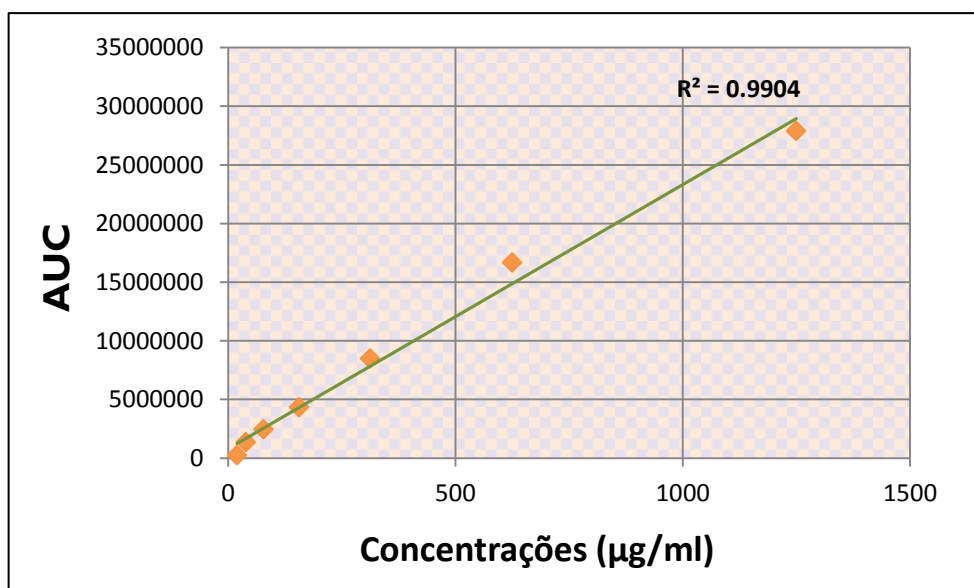
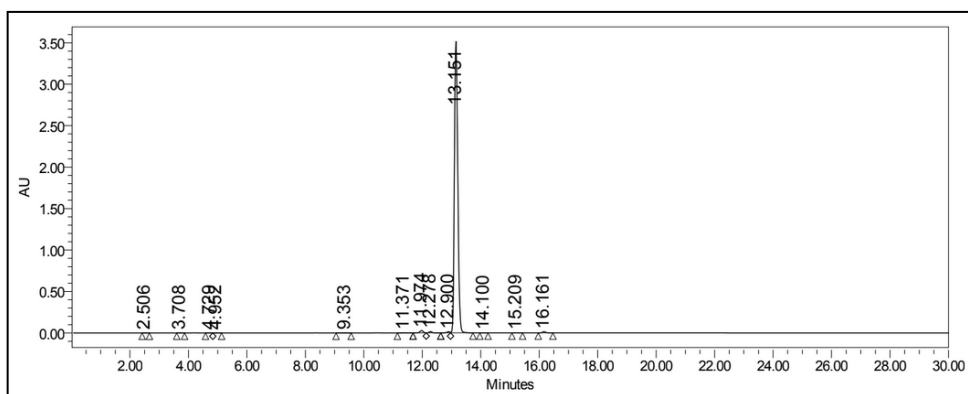


Figura III.15: HPLC da quercitrina: Cromatograma e curva de calibração.

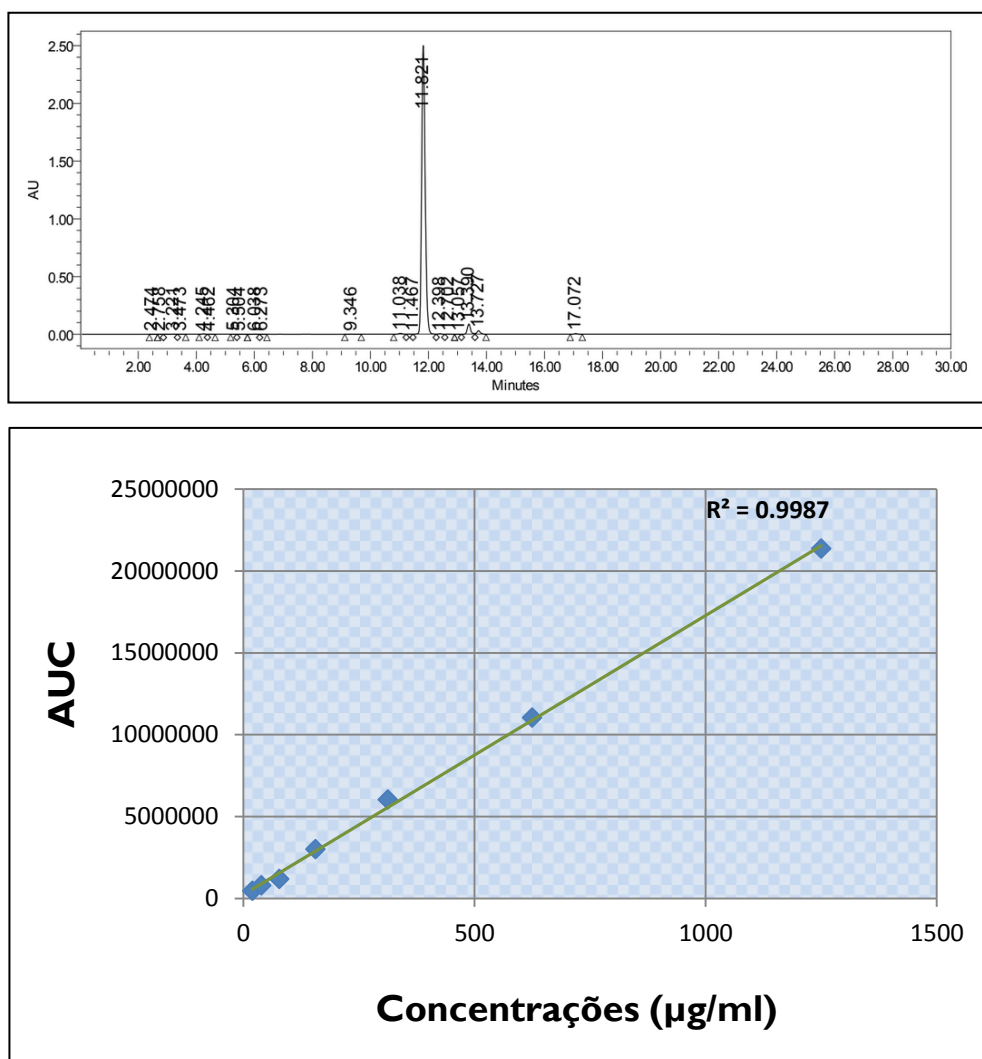


Figura III.16: HPLC do hiperósido: Cromatograma e curva de calibração.

A Figura III.17 abaixo mostra as áreas dos principais picos no HPLC do extrato total. Os picos 12,075, 13,766 e 15,823 representam as substâncias isoladas hiperósido, quercitrina e afzelina respectivamente.

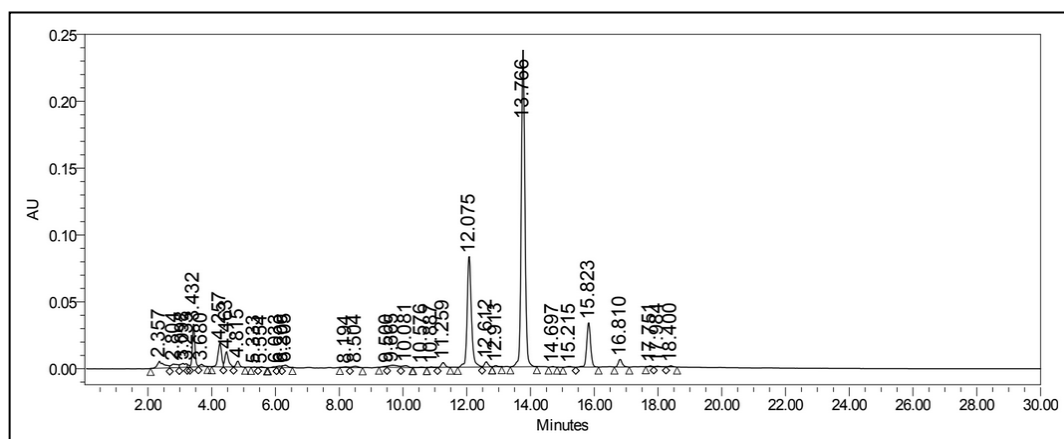


Figura III.17: HPLC do extrato total (1250µg/mL).

As curvas de calibração construídas a partir das substâncias isoladas permitiram quantificar os três flavonóides isolados utilizando a média da área sob a curva dos picos principais obtidos do HPLC do CAET à concentração de 1250µg/mL, sendo obtidas as concentrações de 9,4mg de afzelina/g CAET, 40,02mg de quercitrina/g de CAET e 18,2mg de hiperósido/g de CAET, o que representa um total de 0,94%, 4,02% e 1,82%, respectivamente.

Tabela IV: HPLC do CAET (1250µg/mL): Quantificação dos flavonóides isolados do extrato etanólico das folhas de *C. almaatensis*.

Flavonoides	∑ AUC	Quantidade (µg/ml)	Concentração (mg/g)
Afzelina	278584	11,75	9,4
Quercitrina	1876842	50,24	40,02
Hiperósido	602991	22,72	18,2

Algumas Farmacopeias citam diferentes espécies e percentagens mínimas aceites para a quantidade de flavonóides em medicamentos a base de *Crataegus sp.* Independentemente do tipo de espécies aceites, a farmacopéia chinesa de 2005 cita uma quantidade não inferior a 7,0% para flavonóides totais e 0,050% para hiperósido nas folhas do género. As Farmacopeias Europeia (2004) e Americana (1995 e 2011) aceitam uma mais ampla variedade de espécies numa quantidade não inferior a 1,5% de flavonóides totais nas folhas (Edwards *et al.*, 2012). Dados de quinze diferentes espécies de *Crataegus sp.* mostram uma quantidade máxima de hiperósido de 3,06mg/g nas frutas de *C. maximowiczii*, 3,076mg/g nas flores de *C. monogyna* e 9,53mg/g nas folhas de *C. pinnatifida*, todas quantidades inferiores em relação a encontrada no presente trabalho. A revisão não menciona quercitrina e afzelina com sendo compostos maioritários comumente isolados em *Crataegus sp.* nem tão pouco fornece quantidades dos compostos isolados (Edwards *et al.*, 2012).

Sugere-se a partir dos dados acima citados que a avaliação em termos de padrão de qualidade do género *Crataegus sp.*, no que concerne a composição de flavonóides, esteja baseada principalmente na quantidade de flavonóides totais. Um total de 6,78% de flavonóides foram isolados e identificados a partir do presente trabalho, sendo esse valor muito superior ao mínimo exigido pelos padrões de qualidade da maioria das farmacopéias citadas. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem ser a espécie *C. almaatensis* passível de ser incluída na farmacopéia do Casaquistão e utilizada em fitoterapia.

PARTE 2- RESULTADOS DOS ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

2.1 Efeito em reatividade da HIMA

O extrato CAFA 0,007 a 0,7mg/mL, demonstrou inibição da contração da HIMA após uma pré-contração com administração única de noradrenalina 10^{-3} M num volume de $200\mu\text{L}$. Apesar da Figura III.18 demonstrar relaxamento com concentrações crescentes de CAET à noradrenalina, o número de experiências (n) é insuficiente, não permitindo tirar conclusões do resultado obtido. Além disso, esse resultado diverge dos demais resultados observados para o mesmo extrato.

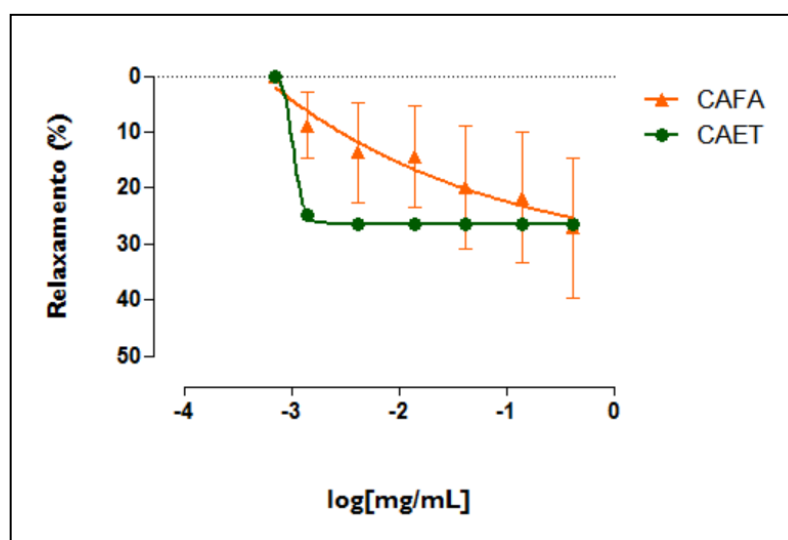


Figura III.18: Curva de relaxamento aos extratos CAET (n=1) e CAFA (n=4).

Em ensaio utilizando ratos anestesiados e isquemia induzida do miocárdio, diferentes extratos de *C. meyeri* foram administrados, sendo observado um efeito antiarrítmico e anti-hipertensivo mais acentuado a partir do extrato hidroalcoólico, onde estavam presentes a maior concentração de flavonóides, saponinas e procianidinas (Garjani *et al.*, 2000). Outro trabalho utilizando procianidina tipo B2 demonstrou intensa vasodilatação dependente do endotélio dos anéis da HIMA, demonstrando aumento na síntese e secreção de NO pelas células endoteliais e parcialmente por prostaciclina (através da via adenosina monofosfato- cAMP, envolvendo a ativação de diferentes canais de K^+ (que regulam contração e tônus vascular). Além disso, o envolvimento de procianidinas na modulação da liberação de Ca^{2+} intracelular e recaptção Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, provavelmente participa do relaxamento NO-dependente da HIMA (Novakovic *et al.*, 2017; Wang, J., Xiong e Feng, 2013).

Considerando a alta quantidade de OPC's normalmente presente em outras espécies de *Crataegus spp.* segundo Edwards *et al.* (2012), supõe-se que essas substâncias estejam presentes também no extrato CAFA e o efeito intrínseco de relaxamento da HIMA esteja possivelmente relacionado com a concentração de flavonóides e procianidinas no extrato. OPC's são compostos solúveis em solventes altamente polares, e seria necessária uma diferente seleção de sistema de solventes para que se tivesse alcançado a separação desses compostos no presente ensaio. Além disso, esses compostos são normalmente isolados por cromatografia na forma monômeros flavan-3-ols ou oligômeros de baixo peso molecular que compõem as procianidinas (Hellenbrand *et al.*, 2015).

Apesar de os resultados da SAP, no que concerne a quantificação de NO mediante administração da CAFA na dose de 100mg/Kg, não terem demonstrado um aumento na produção de NO, isso pode ser devido à administração única 1h antes da eutanásia e colheita de lavado nos animais tratados. Veveris, Koch e Chatterjee (2004) demonstraram que os efeitos de NO em somente foram observados quando o extrato de *Crataegus spp.* WSI442 foi administrado por uma semana conforme citado anteriormente (Veveris *et al.*, 2004).

A quando da incubação de CAFA nas concentrações de 0,014 e 0,14mg/mL durante 30 minutos, o extrato não apresentou efeito significativo sobre a contração máxima à noradrenalina (Figura III.19). A curva de concentração-resposta ao extrato CAFA nas concentrações de 0,007 a 0,7mg/mL, por sua vez, não mostrou atividade intrínseca de contração da HIMA quando administrada em doses crescentes ao banho das artérias conforme observado na Figura III.20 estando de acordo com os demais resultados obtidos para CAFA nesse estudo e com a literatura consultada.

No entanto, quando administrado o extrato total ao banho das artérias, nas concentrações 0,014 e 0,14mg/mL, foi observado um aumento estatisticamente significativo na contração máxima a noradrenalina após 30 minutos de incubação dos anéis arteriais.

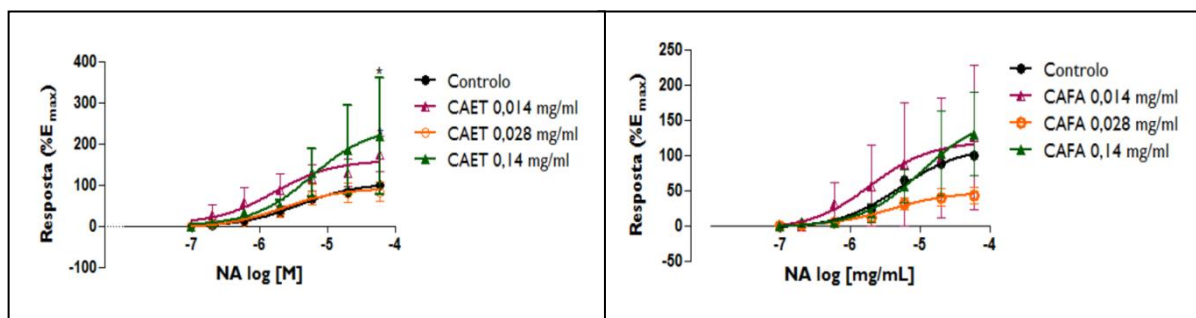


Figura III.19: Curvas de concentração-resposta cumulativas à noradrenalina na ausência (controle) e presença dos extratos CAET e CAFA em diferentes concentrações de incubação.

Tabela V: Efeito máximo e potência dos extratos CAET e CAFA nas diferentes concentrações de incubação nos anéis arteriais da HIMA.

Extrato	Concentração (mg/mL)	% E _{max}	pEC ₅₀ (-log[M])	a/n
CAET	Controlo	100,00 ± 0,00	5,42±0,11	11/4
	0,014	175,45±42,56*	5,79±0,42	4/4
	0,028	83,60±23,10	5,67±0,33	3/3
	0,14	219,52±141,52*	5,24±0,61	4/4
CAFA	Controlo	100,00 ± 0,00	5,30 ± 0,08	7/4
	0,014	125,65 ± 102,12	5,72 ± 0,89	2/2
	0,028	43,41 ± 11,59	5,42 ± 0,27	2/1
	0,14	130,21 ± 58,65	4,98 ± 0,48	3/3

Valores apresentados em média ± SEM. A letra a representa o número de anéis arteriais e n representa o número de doentes.

Além disso, a curva de concentração-resposta ao extrato CAET nas concentrações cumulativas crescentes de 0,007 a 0,7mg/mL, mostrou atividade intrínseca de contração da HIMA, conforme observado na Figura III.20.

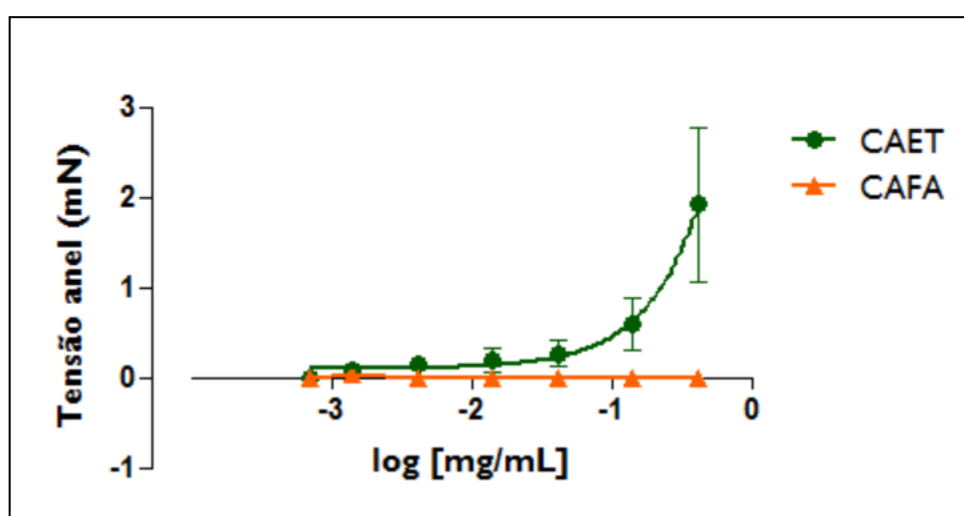


Figura III.20: Curvas CR aos extratos CAET e CAFA.

Tabela VI: Efeito máximo dos extratos CAET e CAFA na curva CR dos anéis arteriais da HIMA.

Composto	E _{max} (mN)	pEC ₅₀ (-log[M])	a/n
CAET	1,92 ± 0,86	-	7/4
CAFA	0,00 ± 0,00	-	3/2

Valores apresentados em média ± SEM. A letra a representa o número de anéis arteriais e n representa o número de doentes.

Um trabalho desenvolvido paralelamente com o objetivo de caracterizar a fase orgânica do extrato de *C. almaatensis* obteve maioritariamente a separação de compostos triperpenóides, nomeadamente ácido ursólico. Ácido ursólico é um composto triterpenóide, e seus efeitos estão relacionados a uma atividade antiproliferativa em células tumorais (Abbasi *et al.*, 2017), anti-inflamatória por inibição da COX-2 e vasorelaxante relacionada a libertação de NO dessa forma não justificando o efeito obtido por CAET (Wo, Skapska e Marszalek, 2015). Não se pode excluir a possibilidade de alguma outra substância não isolada da fase orgânica do extrato de CAET, e presente no extrato total, mas ao mesmo tempo ausente em CAFA, ser a responsável pelo efeito vasoconstritor observado.

Um estudo utilizando extrato de *Vitis vinifera*, demonstrou que o efeito das procianidinas na vasoconstrição desaparece em segmentos de HIMA desendotelizados, demonstrando que o efeito das procianidinas é dependente do endotélio. No entanto, o estudo não observou um aumento da contração máxima à noradrenalina nos segmentos desendotelizados (Aldini *et al.*, 2003). Durante a manipulação dos segmentos no ensaio pode ter havido lesão do endotélio, mas conforme descrito por Aldini *et al.*, 2 (2003), isso não explica um aumento significativo na contração da HIMA.

Novakovic *et al.* (2017) demonstrou que o efeito das procianidinas depende da concentração, sendo mediado por canais de potássio dependentes de Ca^{2+} (K_{CA}), nomeadamente os canais K_{CA} de condutância intermédia (IK_{CA}), e por proteínas de membrana transportadoras de cálcio, especificamente a ATPase de Ca^{2+} . Os canais IK_{CA} presentes no endotélio vascular, abrem na presença de altas concentrações de procianidinas produzindo relaxamento, que não acontece em baixas concentrações de procianidinas. A ATPase de Ca^{2+} por sua vez está associada a recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, e apenas altas concentrações de procianidinas parecem ativar a sua atividade de recaptação).

Considerando a grande variabilidade em termos de concentrações dessas substâncias em diferentes extratos e o fato de que a fração aquosa CAFA teria uma maior concentração de procianidinas pela sua composição de solventes polares (metanol/água), é possível supor uma menor concentração de OPC's no CAET. Consequentemente, uma menor concentração de procianidinas em CAET poderia estar relacionada à falta de efeito sobre IK_{CA} e ATPase de Ca^{2+} , determinando um aumento na concentração de Ca^{2+} , justificando a contração observada.

O estudo de Novakovic *et al.* (2017) foi desenvolvido utilizando procianidina B2 isolada. Os extratos de *C. almaatensis* atualmente mais estudados WS1442 (extrato 45% etanólico) e LI132 (extrato 70% metanólico) são extratos secos padronizados para uma quantidade de 18,75% de OPC's e 2,2% de flavonóides, respectivamente (Wang, J. *et al.*,

2013b). Como OPC's não foram isoladas neste trabalho, a concentração presente em ambos os extratos é desconhecida.

Assim, não se pode afirmar ao certo quais as vias envolvidas no aumento do tónus vascular da HIMA pelo CAET, e por esse motivo, o mecanismo responsável pelo efeito vasoconstritor intrínseco e um aumento na contração máxima a noradrenalina pelo extrato total necessita de mais estudos para ser esclarecido.

2.2. Efeito em modelos de nocicepção

2.2.1. Modelo de dor aguda induzida por formalina

No presente trabalho o comportamento de lambedura da pata induzida por formalina foi utilizado para quantificar nocicepção, uma vez que este comportamento associado à suspensão do membro em relação à base de apoio está classificado em 3, na escala de 0-3 de classificação da dor em ratos utilizando injeção de formalina na pata. Esse comportamento se distancia muito do comportamento natural de “grooming” das patas (Dubuisson e Dennis, 1977). Apesar da valiosa contribuição de Dubuisson e Dennis (1977) ao introduzir o teste da formalina, atualmente utilizado em todo o mundo para avaliar o efeito analgésico como modelo animal para dor inflamatória, os mecanismos envolvidos na sensibilização central e periférica envolvidos na resposta nociceptiva não foram completamente compreendidos (Parada *et al.*, 2001).

Parada (2001) demonstrou que a injeção de formalina na pata induz a libertação simultânea de histamina e serotonina dos grânulos mastocitários na primeira fase do teste. A segunda fase do teste de formalina tem sido extensivamente utilizada como um modelo comportamental de sensibilização central induzida por lesão. No entanto, o estímulo aferente parece não ser suficiente para manter a sensibilização central no corno dorsal da medula durante a segunda fase, sendo a libertação endógena simultânea de histamina e intrínsecamente associada a sensibilização central observada na fase 2 (Parada *et al.*, 2001). Além disso, diversos outros mediadores, como aminoácidos, prostaglandina E2, monóxido de azoto (NO) e substância P aumentam na medula espinhal durante a segunda fase de sensibilização central (Giorno *et al.*, 2015).

Os animais tratados com extrato total (CAET) e a fração aquosa do extrato total (CAFA) nas doses de 10, 30 e 100m/Kg, administradas por via oral, usando óleo vegetal estéril como veículo, não apresentaram redução significativa no tempo de lambedura de pata

em nenhuma das fases do ensaio (Fig. III.21), sendo a fase inicial (Fase I) de dor neurogênica e a fase tardia (Fase 2) de dor inflamatória conforme citado anteriormente.

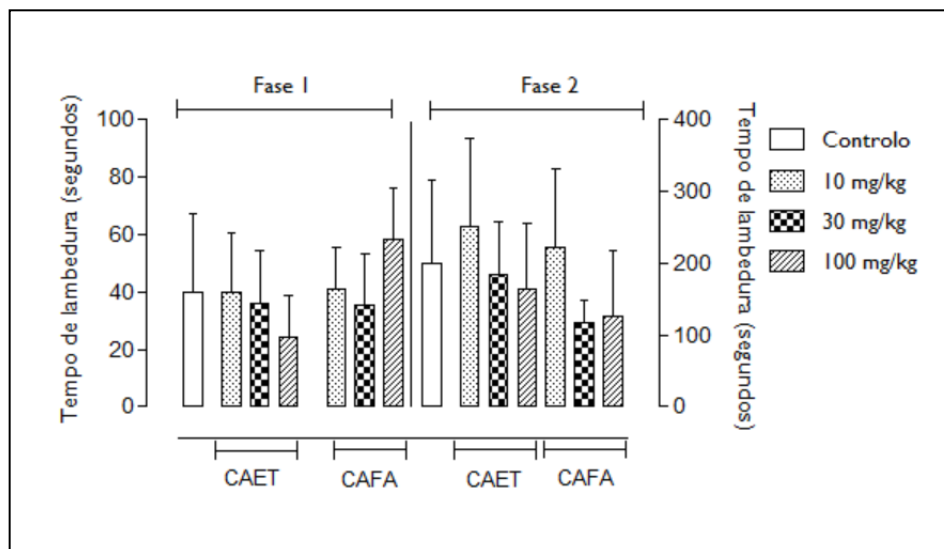


Figura III.21: Efeito de CAET e CAFA em veículo óleo VO no tempo de lambedura da pata em murganhos. Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$).

A solubilidade pode exercer um papel importante em termos de eficácia terapêutica dos flavonóides. A baixa solubilidade em água de agliconas em água e a baixo tempo de resistência no intestino combinados com uma pobre absorção ao mesmo tempo em que diminuem os riscos de intoxicação também representam um problema para sua aplicabilidade medicinal. (Shashank e Pandey, 2013).

Com o objetivo de excluir a má dissolução do extrato no veículo óleo estéril inicialmente utilizado como possível fator contribuinte para a não observação do efeito analgésico nos resultados obtidos, o ensaio foi alargado utilizando água ultrapura como veículo para a dissolução do CAFA, administrado por via oral na dose de 100mg/Kg. Não foi observada diferença significativa no tempo de lambedura de pata no grupo tratado com CAFA em água ultrapura quando comparado ao grupo controlo água ultrapura, ao grupo tratado com CAFA em óleo vegetal estéril e ao grupo controlo óleo vegetal estéril em nenhuma das fases do ensaio conforme Figura III.22 abaixo. Assim, foi excluído o efeito da dissolução sobre a ausência do efeito farmacológico.

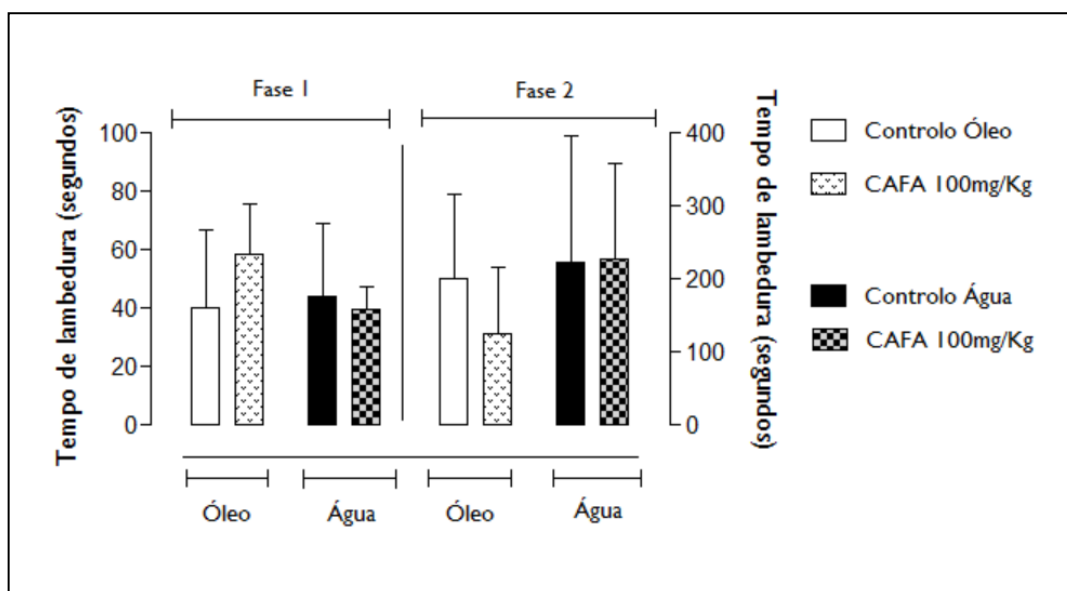


Figura III.22: Efeito de CAFA/óleo e CAFA/água VO no tempo de lambedura da pata em murganhos. Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$).

Varios são os fatores que podem influenciar a absorção dos flavonóides glicosilados uma vez que estes necessitam de conversão à forma de agliconas para serem absorvidos no intestino. Flavonóides glicosilados, como a quercetina são hidrofílicos e por esse motivo são absorvidos no intestino delgado através de transportadores do Na^+ dependentes de glicose (SGLT₁). Outro mecanismo sugere que os flavonóides glicosilados seriam hidrolisados e a aglicona liberada subsequentemente seria absorvida. A enzima responsável pela hidrólise é sustrato específica e os glicosídeos que não servem de substrato para esta enzima são hidrolisados pelas bactérias intestinais, degradando consequentemente a aglicona liberada. Além disso, flavonóides podem ainda sofrer hidrólise durante a absorção, devido ao ambiente ácido com baixo pH do estômago (Shashank e Pandey, 2013)

Um estudo avaliando o efeito do extrato *Bauhinia microstachya* tendo quercitrina isolada como composto maioritário demonstrou uma inibição significativa em ambas as fases do teste da formalina a partir da administração intraperitoneal de 30 e 100mg/Kg, com inibições de $73 \pm 7\%$ and $86 \pm 8\%$ para as fases neurogênica e inflamatória, respectivamente. O estudo mostra também um efeito significativo na inibição de resposta “whriting” induzida por ácido acético da quercitina administrada nas doses de 1 e 3mg/Kg por via intraperitoneal, demonstrando uma atividade analgésica contrariamente ao observado no presente estudo (Gadotti *et al.*, 2005).

Objetivando-se, nesse sentido, excluir o efeito de quebra da fração glicosilada dos flavonóides na passagem pelo estômago dos murganhos como possível interferente no efeito farmacológico esperado, os extratos CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg, bem como

os flavonóides isolados afzelina, quercitrina e hiperósido na dose de 3mg/Kg foram administrados por via intraperitoneal utilizando veículo água ultrapura 30 minutos antes da injeção de formalina na pata (fig. III.23). No entanto, não houve redução significativa no tempo de lambedura da pata em relação ao grupo controlo (água ultrapura intraperitonea) em nenhuma das fases do experimento, contrariamente ao obtido por Gadotti (2005).

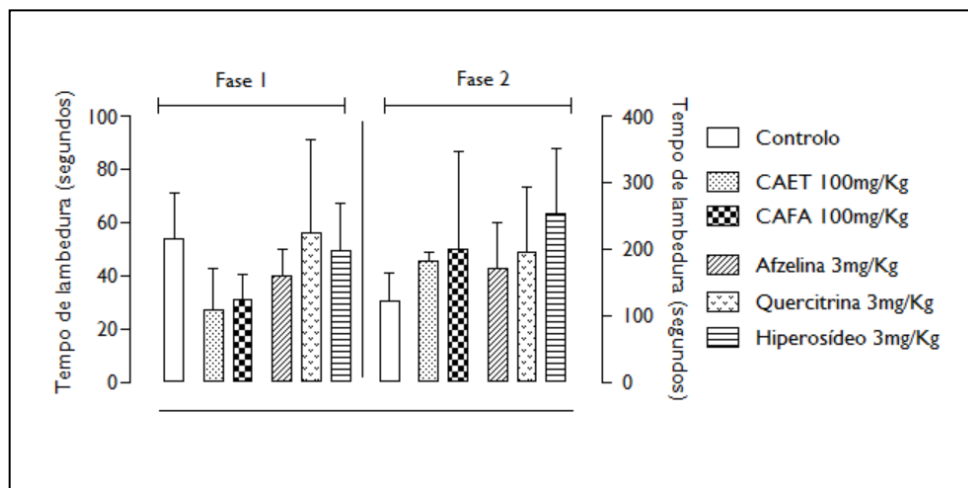


Figura III.23: Efeito de CAET, CAFA, afzelina, quercitrina e hiperósido no tempo de lambedura da pata em murganhos. Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$).

A caracterização fitoquímica desenvolvida para o extrato etanólico de *C. almaatensis* permitiu o isolamento e identificação dos flavonóides maioritários quercitrina, hiperósido e afzelina, conforme extensivamente descrito anteriormente. Um estudo utilizando extrato etanólico de *Zanthoxylum piperitum* na doses de 100mg/Kg administrada oralmente, a partir do qual quercitrina e afzelina foram isoladas como compostos maioritários, demonstrou redução no comportamento nociceptivo, com uma porcentagem de inibição máxima de 34% na fase I e 56% na fase 2 do teste da formalina. O autor demonstrou que o mecanismo de ação estaria associado à inibição na expressão de COX-2 iNOS, e KCNJ6 (uma proteína de membrana das células da microglia) (Hwang, K. A. et al., 2018).

Os resultados obtidos por Furtado et al. (2015) assemelham-se aos obtidos no presente estudo, não sendo observada diferença significativa no comportamento de lambedura da pata na primeira fase do teste a partir da administração de 200 e 400mg/Kg do extrato hidroalcolico de *Copaifera langsdorff* por via oral. No entanto, o autor obteve uma redução significativa no comportamento nociceptivo para a segunda fase do teste, com uma inibição máxima de 54%, indicando uma atividade anti-inflamatória periférica. *Copaifera langsdorff* apresenta quercitrina e afzelina como substâncias maioritárias, mas os flavonóides

não foram testados isoladamente, não podendo ser comprovada a sua contribuição para o efeito observado (Furtado *et al.*, 2015).

Miño *et al.* (2002) demonstrou um efeito semelhante ao obtido por Furtado *et al.* (2015), obtendo um efeito de redução do comportamento nociceptivo na segunda fase do teste da formalina para a dose de 800mg/Kg V.O. do extrato aquoso de *Balbisia calycina*, a partir do qual foi isolado hiperósido. O extrato testado apresentou-se inefetivo na dose de 40mg/Kg para ambas as fases do teste. O autor sugere que o mecanismo esteja associado a uma redução na excitação dos neurônios envolvidos na sensibilização tardia do corno dorsal, possivelmente envolvendo receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA), não relacionados ao sistema opióide (Miño *et al.*, 2002).

Com o objetivo de aplicar os 3R's (reducement, refinement e replacement) optou-se por não realizar mais ensaios com outras doses dos extratos e doses inferiores dos flavonóides como se havia planeado no início do trabalho experimental, considerando que não se obtiveram resultados significativos em nenhum dos grupos testados até esta fase do trabalho.

2.2.2. Modelo da placa quente

No modelo da placa quente, o extratos CAET e CAFA nas doses de 10, 30 e 100m/Kg, administrados por via intraperitoneal (veículo água ultrapura), não apresentaram diferença significativa no tempo de reação à placa quente, expresso em área sob a curva, em comparação ao grupo controlo veículo e ao grupo controlo morfina (fig. III.24).

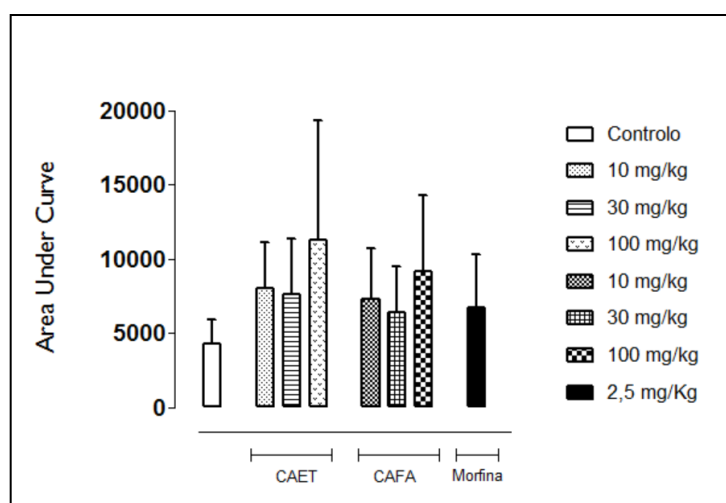


Figura III.24: Efeito de CAET e CAFA no tempo reação a placa quente em murganinhos. Resultados são apresentados em média \pm SEM (* $p < 0.05$).

Afelina, quercitrina e hiperósido nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0mg/Kg, administrados por via intraperitoneal, usando água ultrapura como veículo, não apresentaram diferença significativa no tempo de reação a placa quente, expresso em área sob a curva, em comparação ao grupo controlo veículo e ao grupo controlo morfina conforme Figura III.25 abaixo.

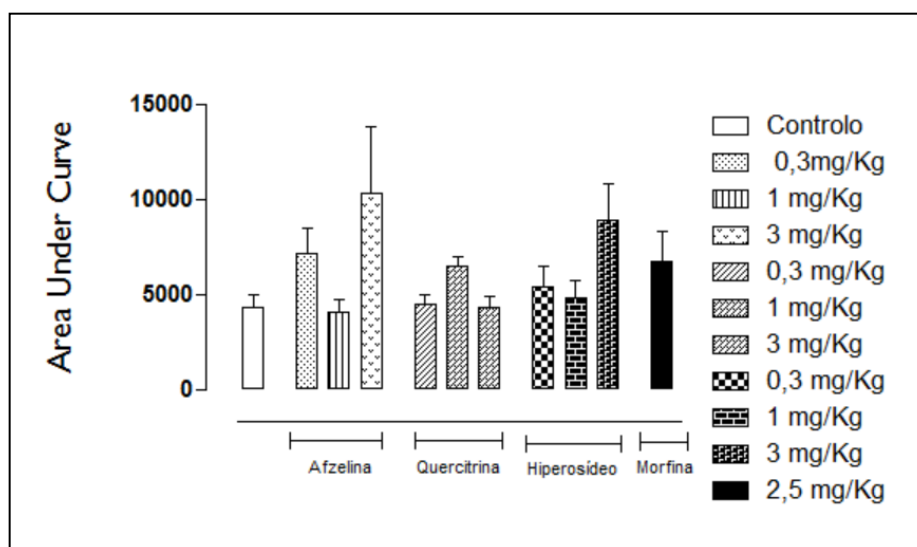


Figura III.25: Efeito de afzelina, quercitrina e hiperósido no tempo reação a placa quente em murganhos. Resultados são apresentados em média \pm SEM (* $p < 0.05$).

Os resultados obtidos estão de acordo com Furtado *et al.* (2015), que não observou aumento significativo na latência do teste da placa quente mediante administração de 200 e 400mg/Kg de *Copaifera langsdorffii*, concluindo a partir dos resultados na primeira fase do teste de formalina e da placa quente a ausência de efeito analgésico na espécie estudada, maioritariamente composta por afzelina e quercitrina. Uma possível explicação para a inatividade da quercitrina e afzelina poderia ser presença da fração de açúcar ligada ao carbono 3 do anel C, uma vez que as correspondentes agliconas quercetina e caempferol apresentam atividade analgésica e anti-inflamatória inibindo a libertação de IL6, IL8, TNF- α , histamina e triptase (Furtado *et al.*, 2015).

O extrato aquoso de *Balbisia calycina*, contendo hiperósido, também mostrou-se inefetivo em reduzir o tempo de latência da placa quente nas doses de 400 e 800mg/Kg administradas por via oral. No entanto, o controlo positivo morfina, na dose de 10mg/Kg significativamente aumentou o tempo de latência na placa quente contrariamente ao observado no presente estudo (Miño *et al.*, 2002). O presente estudo utilizou uma dose quatro vezes menor que a dose descrita por Miño *et al.* (2002), o que pode ter influenciado nos resultados obtidos.

2.3. Efeito em modelo de inflamação

2.3.1 Efeito na contagem total de leucócitos

Na amostra do lavado de medula óssea e do lavado da SAP, a contagem de leucócitos totais apresentou um aumento significativo em comparação com o grupo controlo carragenina e o grupo controlo solução salina. O grupo tratado com CAFA na dose de 100mg/Kg apresentou redução significativa na contagem de leucócitos totais em comparação ao grupo controlo carragenina. O grupo tratado com CAET na dose de 100mg/Kg não apresentou redução significativa na contagem de leucócitos totais. Não houve diferença significativa entre os grupos controlo solução salina e controlo carragenina, bem como entre os grupos tratados com CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg em comparação ao grupo controlo carragenina na contagem de leucócitos totais da amostra de sangue conforme Figura III.26.

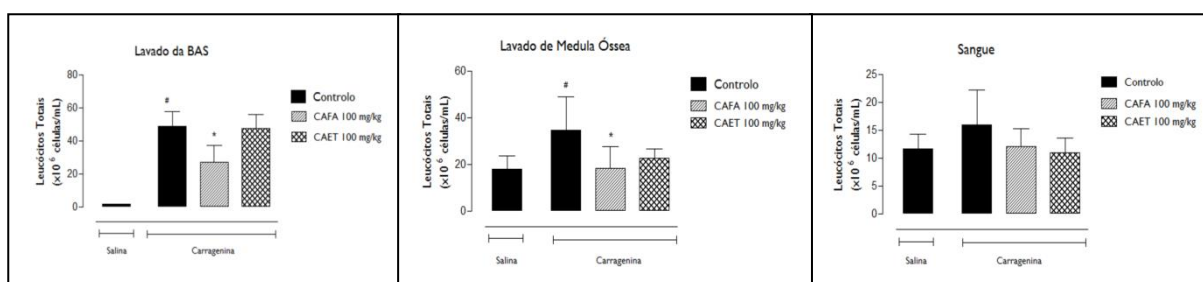


Figura III.26: Efeito de CAET e CAFA na migração celular do lavado da SAP, no lavado de medula óssea e no sangue. Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$).

Um estudo utilizando a fração hexanólica e rica em triperpenos de *C. monogyna* na dose de 40mg/Kg demonstrou um efeito de redução na migração celular de leucócitos em modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos (Furmace, 1997). Rosa et al. (2016) demonstrou um efeito significativo da vitexina na redução da migração de leucócitos em modelos de peritonite induzida em ratos e cita ainda o efeito da substância na redução da migração de leucócitos em modelos de inflamação pulmonar e pleuresia induzida (Rosa et al., 2016). Conforme mencionado anteriormente, vitexina é um dos componentes comumente isolados de espécies de *Crataegus spp.* Vitexina foi anteriormente isolada de um extrato etanólico das folhas de *Pereskia bleo* na fração de acetato de etilo (Guilhon et al., 2015) indicando a afinidade do flavonóide a solventes menos polares que o metanol. Durante a separação dos extrato em frações aquosa e orgânica, vitexina possivelmente estaria presente em maior concentração na fase orgânica mais polar de *C. almaatensis*.

2.3.2 Efeito na produção de citocinas (IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ).

Conforme a Figura III.26, pode ser observado aumento estatisticamente significativo na produção de IL-1 β e IL-10 no grupo controle que recebeu carragenina em comparação ao grupo controle que recebeu solução salina na cavidade. O grupo tratado com CAFA na dose de 100mg/Kg apresentou redução significativa na dosagem de IL-1 β em comparação grupo controle carragenina. O grupo tratado com CAET na dose de 100mg/Kg não apresentou redução significativa na dosagem de IL-1 β . Nos grupos tratados com CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg, por via intraperitoneal, não se observou diferença significativa na dosagem de IL-10 quando comparado ao grupo controle carragenina.

A ausência de diferença significativa entre o grupo controle negativo (salina) e controle positivo (carragenina) para as citocinas TNF- α e IFN- γ , possivelmente associada a um erro durante a execução do ensaio, dificulta qualquer conclusão a respeito do efeito dos extratos sobre TNF- α e IFN- γ . Ainda assim, cita-se aqui que nos grupos tratados com CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal, não se observou diferença significativa na dosagem TNF- α e IFN- γ quando comparados ao grupo controle carragenina.

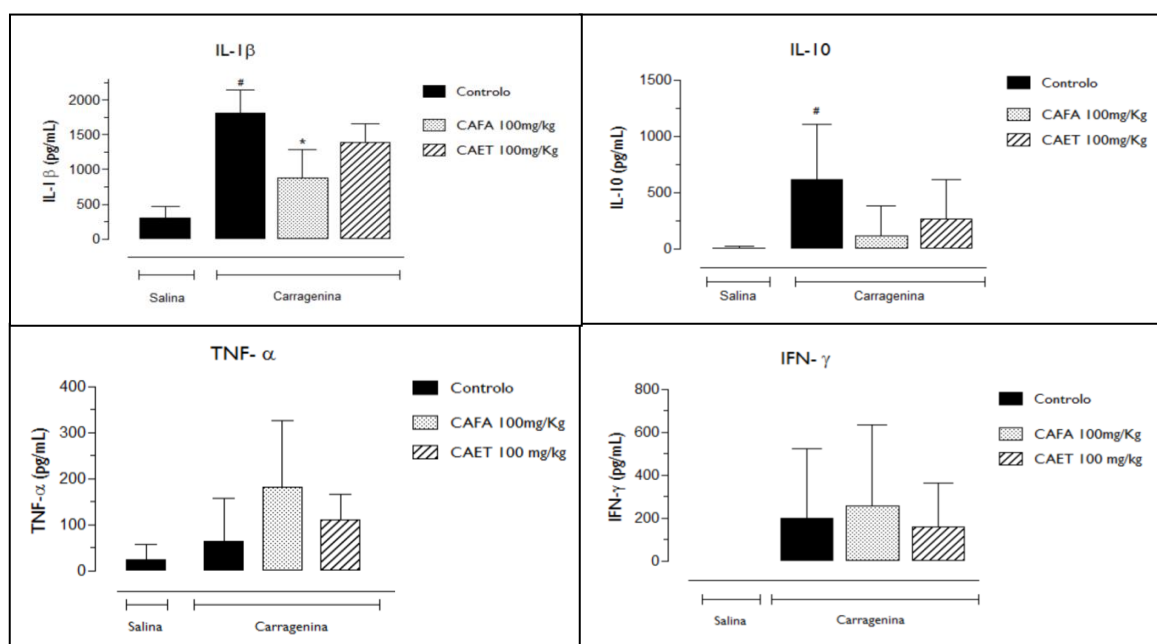


Figura III.27: Efeito de CAET e CAFA na dosagem de IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ no lavado da SAP. Resultados são apresentados em média \pm SD (* p < 0.05).

Os resultados obtidos neste estudo relativamente a IL-1 β são semelhantes aos obtidos por Wang, Xiong e Feng (2013), onde foi observado um efeito significativo de redução da libertação de COX-2, TNF- α e IL-1 β e IL6 em modelo *in vitro* de inflamação induzida por LPS, relacionando esses resultados a atividade antiinflamatória da fração aquosa do extrato de *Crataegus spp.* (Wang, J. *et al.*, 2013).

Em outro estudo utilizando um modelo de inflamação de artrite reumatóide *in vitro*, a substância pura isolada hiperósido demonstrou efeito significativo (concentração-dependente) na inibição da produção de TNF- α , IL6 e IL-1 β quando as células foram pré-incubadas 4h antes da indução da inflamação por lipopolissacarídeo (LPS). O efeito antiinflamatório foi atribuído a uma possível supressão da ativação da via NF- $\kappa\beta$, que regula a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas como TNF- α , IL6, IL-1 β , quimiocinas e moléculas de adesão celular (Jin *et al.*, 2016).

Furtado *et al.* (2015) testou o efeito do extrato de *Copaifera langsdorff* (30,60 e 120 μ g/ml) em macrófagos obtidos do lavado intraperitoneal de ratos submetidos a reação inflamatória induzida por LPS (*Escherichia coli*), não sendo observada uma redução significativa na produção TNF- α , IL6, IL-10. Conforme citado anteriormente, o extrato de *Copaifera langsdorff* possui afzelina e quercitrina como componentes maioritários (Furtado *et al.*, 2015).

Estes resultados são similares aos obtidos para IL10 neste ensaio. Rosa *et al.* (2016) no entanto demonstrou um aumento na dosagem de IL-10, acompanhada de uma redução na libertação de TNF- α e IL-1 β em modelo *in vitro* de inflamação induzida por LPS mediante administração de vitexina na dose de 100 μ g/mL (Rosa *et al.*, 2016). A não observação na redução dessas citocinas a partir do efeito da vitexina no presente estudo, provavelmente seja devida sua baixa concentração no CAET.

2.3.3 Efeito na produção de proteínas e NO

A quantificação de proteínas e NO na amostra do lavado da BAS apresentou um aumento significativo no grupo controlo carragenina quando comparado ao grupo controlo solução salina. Nos grupos tratados com CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal, não se observou diferença significativa na quantificação de proteínas e monóxido de azoto quando comparados ao grupo controlo carragenina (Figura III.28).

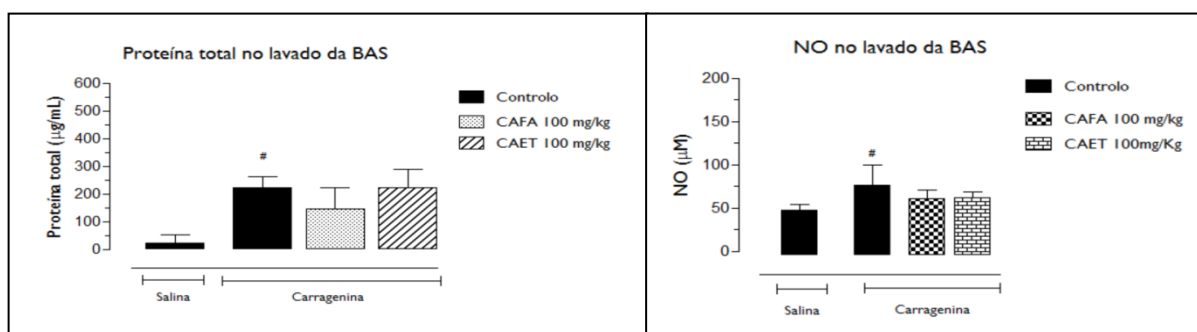


Figura III.28: Efeito de CAET e CAFA na quantificação de proteína e NO no lavado da SAP. Resultados são apresentados em média \pm SD ($*p < 0.05$).

Veveeris, Koch e Chatterjee (2004) demonstraram que os efeitos de NO na prevenção de hipotensão letal em modelos de reperfusão coronária foram observados quando o extrato de *Crataegus spp.* foi administrado diariamente durante sete dias e não puderam ser observados quando administrado em uma dose única 1-4 horas antes da oclusão coronária (Veveeris *et al.*, 2004). Neste ensaio, ambos os extratos foram administrados em uma única dose, por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina na bolsa de ar subcutânea e por esse motivo pode não ter sido possível observar um aumento sobre a produção de NO.

Furtado *et al.* (2015) observou uma redução significativa na produção de NO no modelo de inflamação induzida por LPS, quando o extrato *Copaifera langsdorff* foi administrado nas doses de 30, 60 e 120 µg/ml e não houve efeito de liberação de NO em células que não submetidas a indução de inflamação por LPS (Furtado *et al.*, 2015).

2.4. Efeito em modelos de sedação

Aterações comportamentais como incoordenação motora e sedação podem ser mal interpretadas como efeito analgésico e produzir falsos positivos (Giorno *et al.*, 2015). No presente estudo, a administração intraperitoneal dos extratos não causou comprometimento da função motora conforme avaliado tanto por locomoção forçada no rotarod como por locomoção espontânea no campo aberto conforme os resultados abaixo descritos.

2.4.1 Modelo do campo aberto

Os animais tratados com os extratos CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg não apresentaram mudanças comportamentais significativas quando comparados ao grupo controle (água ultrapura) na avaliação de desempenho de locomoção espontânea quantificada a partir do número de linhas cruzadas para os tempos analisados utilizando o modelo do campo aberto (Figura III.29).

O resultado obtido no presente estudo está de acordo com os resultados obtidos anteriormente por Furtado *et al.* (2015), onde não foram observadas alterações no desempenho locomotor de animais tratados com extrato hidroalcolico de *Copaifera langsdorff* nas doses de 30, 100, 300 e 1000mg/Kg, bem como as substâncias maioritárias quercitrina e afzelina nas doses de 3, 10, 30 e 100mg/Kg (Furtado *et al.*, 2015).

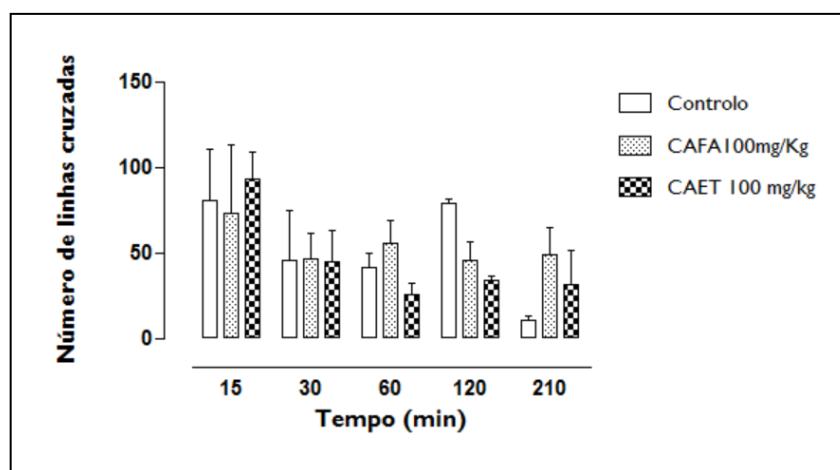


Figura III.29: Efeito de CAET e CAFO no número de linhas cruzadas.

Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$).

2.4.2 Modelo do rotarod

A administração dos extratos CAET e CAFA na dose de 100mg/Kg tampouco demonstrou mudança no padrão comportamental dos animais em comparação a grupo controle na avaliação de desempenho de locomoção forçada utilizando Rotarod quando quantificada a partir do tempo de primeira queda. Os animais tratados com o CAET na dose de 100mg/Kg apresentaram uma redução significativa no número total de quedas quando comparados ao grupo controle água ultrapura nos tempos de 30, 60 e 210 minutos. Os animais tratados com CAFA na dose de 100mg/Kg apresentaram uma redução significativa no número de quedas em relação ao grupo controle no tempo de 30 minutos.

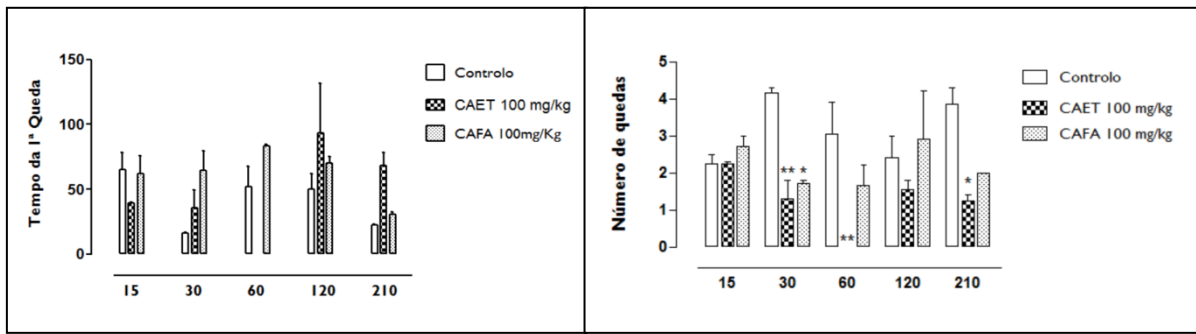


Figura III.30: Efeito de CAET e CAFO no tempo da primeira queda e número de quedas no rotarod. Resultados são apresentados em média \pm SD (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$).

De acordo com Giorno *et al.* (2015), diante de uma hipotética sedação seria esperado um aumento na incoordenação motora e consequentemente um aumento no número de quedas para os tempos avaliados nos animais tratados com os extratos, contrariamente ao observado no presente estudo. Nesse sentido, os resultados apresentados de redução do número total de quedas tem pouca ou nenhuma relevância no contexto em que o ensaio foi proposto.

IV. Conclusões e Considerações Finais

A presente dissertação foi desenvolvida no 2º Ano do Mestrado em Farmacologia Aplicada da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra. O trabalho realizado representa uma colaboração entre o Laboratório de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra; o Centro de Cirurgia Cardiotorácica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, do Laboratório de Química da Escola de Farmácia no Instituto de Biociências Médicas, no Trinity College Dublin; e do Laboratório da Dor e Inflamação da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Além do fato das doenças cardiovasculares representarem a principal causa de mortalidade no mundo, e apesar dos avanços já alcançados, o tratamento das DCV ainda enfrenta desafios importantes relativos a um grande número de reações adversas que limita seu uso prolongado e determina um alto índice de abandono da adesão à terapia.

Adicionalmente, a alta incidência de casos envolvendo processos inflamatórios persistentes e casos de dor inflamatória que podem culminar em quadros crônicos, combinada a alta ocorrência de efeitos colaterais dos AINE's e opióides comumente utilizados no tratamento da dor, justificam os estudos na busca de novos compostos, com alvos moleculares bem identificados e mais específicos para os diferentes quadros clínicos, com menor incidência de efeitos colaterais, com menor toxicidade para o indivíduo e menor custo.

O presente trabalho mostrou-se relevante pela otimização da técnica de isolamento dos flavonóides a partir da fração aquosa em comparação ao obtido anteriormente em trabalhos preliminares de separação das substâncias químicas a partir do extrato total. Possivelmente, utilizando diferentes sistemas de solventes mais ou menos polares, outras substâncias comprovadamente efetivas no tratamento da dor e de doenças cardiovasculares, como vitexina e procianidinas respectivamente poderiam ter sido isoladas a partir de *C. almaatensis* e futuros trabalhos podem ser conduzidos nesse sentido a fim de avaliar o potencial analgésico e cardiovascular da planta.

Os extratos de *C. almaatensis* não foram capazes de demonstrar atividade antinociceptiva no presente estudo, possivelmente em decorrência da baixa concentração dos componentes ativos no extrato total e de a seleção do sistema de solventes e da fração aquosa, em teoria, não conter os componentes associados a atividade analgésica como a vitexina e os triterpenóides. Ambas as substâncias anteriormente citadas são componente isoladas de diferentes espécies de *Crataegus spp.* a em frações menos polares do extrato total. Não foi possível demonstrar atividade sedativa dos extratos da planta nas doses administradas.

Um dos efeitos mais citados em relação atividade antiinflamatória de *Crataegus spp.* no aumento da produção de NO não pode ser observado no presente estudo e isso pode ser decorrente do fato de uma única dose do extrato total ter sido administrada aos animais no modelo de inflamação utilizado. Trabalhos anteriores demonstram que os efeitos de NO podem ser observados com um tratamento diário do extrato por sete dias. Outra possível causa para a não observação do efeito pode ser a fração glicosilada dos flavonóides isolados. Foi demonstrado que a aglicona dos flavonóides isolados apresentou resultados de aumento na redução da liberação de citocinas.

Ainda assim, a partir do extrato de *C. almaatensis* foi observada uma inibição na contagem total de leucócitos e na quantificação de IL-1 β , demonstrando o potencial antiinflamatório da planta.

A fração aquosa do extrato de *C. almaatensis* demonstrou atividade de inibição da contração da HIMA à noradrenalina, o que está em acordo com os resultados obtidos para outras espécies de *Crataegus spp.*. Acredita-se que esse efeito seja devido a presença de procianidinas nessa fração do extrato, ainda que estas substâncias não tenham sido isoladas no presente estudo. No entanto, são necessários mais estudos para a caracterização da atividade vascular dado que o tempo disponível para a execução foi muito curto e, portanto, o número de experiências muito reduzido.

Conclui-se que mais trabalhos necessitam ser conduzidos a fim de elucidar as atividades farmacológicas de *C. almaatensis* no que concerne a atividade analgésica, possivelmente explorando diferentes frações do extrato. *C. almaatensis* foi capaz de demonstrar atividade antiinflamatória de redução de IL-1 β e relaxamento vascular. A potencial atividade antiinflamatória e vascular demonstrada neste estudo fundamenta a realização de trabalhos futuros com os extratos desta espécie, a fim de confirmar a atividade farmacológica da planta.

V. Apêndice

Apêndice I

Substâncias bioativas no gênero *Crataegus* spp. (Kumar et al., 2012).

Species	Chemical constituents	Compound name	References
<i>C. monogyna</i>	Phenolic compounds, di-C-glycosides	proanthocyanidin (1), vitexine-2-O-rhamnoside (3), hyperoside (4), anthocyanin, chlorogenic acid (5), epicatechin, apigenin-6,8-di-C-glycosides	Orhan et al., 2007; Bahorun, et al., 2003; Nikolov & Vodenicharov, 2003
<i>C. aronia</i>	Phenolics	oligomeric proanthocyanidin, flavanoids (vitexine-2-O-rhamnoside (3), hyperoside (4))	Orhan et al., 2007
<i>C. pseudoheterophylla</i>	Phenolics	oligomeric proanthocyanidin, flavanoids (vitexine-2-O-rhamnoside (3), hyperoside (4))	Orhan et al., 2007
<i>C. pinnatifida</i>	Flavanoid glycoside, furanoflavonoids, triterpenic acid, flavonoid ketohexosefuranosides, biphenyl glucoside	pinnatifin C (6), pinnatifin D (7), oleanolic acid (8), ursolic acid (9), pinnatifinoside A (10), pinnatifinoside B (11), pinnatifinoside C (12), pinnatifinoside D (13), shanyenoside A (5, 4'-dimethoxy-biphenyl-4-ol-3-O-β-D-glucoside)	Zhang et al., 2000; Maurya & Yadav, 2005; Lin et al., 2009; Chen et al., 2008; Zhang & Xu, 2001
<i>C. laevigata</i>	Oligomeric procyanidins	epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→6)-epicatechin, pentamer of (-)-epicatechin units linked through C-4β/C-8 bonds	Svedstrom et al., 2002
<i>C. microphylla</i>	Flavanoids	hesperetin (14), apigenin (15), vitexin (2), vitexin-4'-O-rhamnoside	Melikoglu et al., 2004
<i>Crataegi folium</i>	Phenolics	catechin (16), naringenin (17), gallic acid (18), coumaric acid (19), caffeic acid	Demiray et al., 2009
<i>C. scabrifolia</i>	Carbohydrates	sugars, acids, sugar alcohols	Liu et al., 2010
<i>C. davisii</i>	Flavanoids	hyperoside (4), vitexin-2-O-rhamnoside (3), vitexin-4'-O-rhamnoside, rutin (20), quercetin (21)	Sozer et al., 2006
<i>C. macrocarpa</i>	Flavanoids	eriodictyol-7-glucuronide, luteolin-7-O-glucuronide	Ringl et al., 2007
<i>C. pentaegyna</i>	Phenolics	flavanoids	Ebrahimzadeh & Bahramian, 2009
<i>C. opaca</i> , <i>C. aestivalis</i> , <i>C. rufula</i>	Volatile components	linalool (22), hexanal, butyl hexanoate, pentyl hexanoate, methyl hexanoate (23)	Horvat & Chapman, 2007
<i>C. meyeri</i>	Carbohydrates	polysaccharides	Kuliev & Poletaeva, 1984
<i>C. curvisepala</i>	Flavanoids	cratenacin	Batyuk, 1996
<i>C. orientalis</i>	Carbohydrates	polysaccharides	Kuliev & Poletaeva, 1983
<i>C. turkestanica</i>	Phospholipids	phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol	Gazizov & Glushenkova 1996
<i>C. jackii</i> , <i>C. robesoniana</i> , <i>C. flabellata</i>	Essential oils	decane, linalool (22), syringaldehyde B, syringaldehyde C, syringaldehyde D, caryophylleneoxide, squalene, eicosane,	Kovaleva et al., 2009
<i>C. oxyacatha</i>	Flavanoids, Oligomeric procyanidins, Cardiotonic amines, triterpenes, Purine derivatives	heptahydroxyflavan glycoside, flavan polymers, quercetin (21), hyperoside (4), rutin (20), flavonoglycosyls, vitexin-4'-rhamnoside, epicatechol, tyramine, isobutylamine, O-methoxy phenylethylamine, ursolic acid (9), oleanolic acid (8), crategolic acid, adenosine, adenine, guanine, caffeic acid, polyphenols	Bersin et al., 1955; Rewerski & Lewak, 1967; Verma et al, 2007; Aneta & Oszmianski, 2007
<i>C. sanguine</i>	Flavanoid	acetylvitexin	Kashnikova et al., 1984; Kashnikova, 1984
<i>C. azarolus</i> var. <i>eu-azarolus</i> , <i>C. aronia</i>	Polyphenols	chlorogenic acid (5), hyperoside (4), quercetin (21), rutin (20), spiraeoside, epicatechin	Bahri-Sahloul et al., 2009
<i>C. sinaica</i>	Polyphenols	anthocyanin	Maharik et al., 2009
<i>Crataegi folium cum flore</i>	Flavanoids, flavone rotamers	flavonol 8-methoxykaempferol 3-O-(6"-malonyl-beta glucopyranoside	Amanzadeh et al., 2007; Rayyan et al, 2005
<i>C. cuneata</i>	Triterpenoid	cuneataol	Ikeda et al., 1999
<i>C. flava</i>	Eudesmanolide	1β,9α-dihydroxyeudesm-3-en-5β,6α,7α,11αH-12,6-olide	Ahmed et al., 2001

<i>C. macrocarpa</i>	Flavonoids	Vitexin (2), isovitexin, rutin (20), hyperoside (4), isoquercitrin (R)- and (S)-eriodictyol-7-O-β-D-glucuronide and luteolin-7-O-β-D-glucuronide	Ringl et al., 2007
<i>C. pubescens</i>	Polymer of sugar acids	pectinmethylesterase (PME)	Vivar-Vera et al., 2007
<i>C. maximowiczii</i>	Flavonoids	8-methoxykaempferol, vitexin (2), hyperoside (4), quercetin (21)	Bykov & Glyzin, 1972

Apêndice 2

Revisão da atividade farmacológica em diferentes espécies de *Crataegus spp.*

Título e Referência	Espécies	Substâncias químicas	Ativ. Farmacológica
Herbal products containing <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., <i>Crataegus spp.</i> , and <i>Panax spp.</i> : Labeling and safety concerns (Nunes et al., 2017).	<i>monogyna</i> , <i>laevigata</i> , <i>pinnatifida</i> , <i>scabrifolia</i> ,	Folhas - Ácido Ferúlico - Ácido Ursólico - Apigenina - Kaempferol - Ácido Clorogênico - Quercitirina - Ácido Isovalínico - Rutina - Frutas - Ácido Cítrico - Ácido Succínico - Ácido Quínico - Ácido Ursólico - Ácido Oleanonico - Ácido Cafeico - Ácido Sinápico - Ácido Ferúlico - Ácido Protocatecuico - Ácido Clorogênico - Hiperósido - Epicatequina - Rutina - Quercetina Flores - Ácido Sinápico - Ácido Ferúlico - Taninas - Catequinas - Epicatequinas	Redução pressão arterial; Redução LDL; Anti-inflamatório; Protetor de Endotélio; Anti-arrítmico;
Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders (Rastogi et al., 2016).	<i>oxyantha</i>	Procianidinas oligoméricas Vitexina Quercetina Hiperósido	Prevenção do remodelamento cardíaco; Inibição da migração e proliferação celular muscular; Prevenção de isquemia; Proteção endotelial; Redução pressão arterial; Antiarrítmico; Inibição

			plaquetária; Efeito inotrópico positivo; Antioxidante; Antilipidêmico;
Antiaging effects of the mixture of <i>Panax ginseng</i> and <i>Crataegus pinnatifida</i> in human dermal fibroblasts and healthy human skin (Hwang, E. et al., 2016)	<i>pinnatifida</i>	(Mistura de <i>Panax ginseng</i> e <i>Crataegus pinnatifida</i>)	Efeitos “anti-aging”: Redução aspect áspero da pele; Regulação de MMP-1 e procologeno tipo 1; Redução na escala de dano e aspereza da pele; Propriedades hidratantes notáveis;
Antioxidant activity of <i>Crataegus Monogyna L</i> flower (Konyalioglu, Cebe e Aktar, 2017).	<i>monogyna L</i>		Taquicardia; Sedativo; Antiespasmódico; Antihipertensor; Diurético;
Antioxidant and anti-inflammatory neolignans from the seeds of hawthorn (Peng et al., 2016).	<i>pinnatifida</i>	Neoligninas <i>Crataegus</i> A - G Cinco compostos conhecidos	Antioxidante (DPPH, FRAP, APTS ⁺) – 7-12; Antiinflamatório (NO/TNF- α induzida por LPS); NO (7-12), 12 muito potente (> controlo positivo); Moulação atividade TNF- α (1-2);
Compounds isolated from the aerial part of <i>Crataegus azarolus</i> inhibit growth of B16F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis (Bze e Chekir-ghedira, 2015).	<i>azarolus</i>	Vitexina-2-ramnósido	Atividade anti-proliferativa.
Diet phytochemicals and cutaneous carcinoma chemoprevention: A review (Wang, S. et al., 2017).	<i>pinnatifida</i>	Fração polifenólica	↓ Grau Malignidade
Effect of <i>Ocimum sanctum</i> and <i>Crataegus pubescens</i> aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism (Pérez-ramírez et al., 2017).	<i>pubescens</i>	(Extrato) Possivelmente associado ao Ácido Gálico	Aumento da expressão gênica de Glut4, Irs1 em células adiposas Pi3k 3T3 L1.
Escitalopram or novel herbal treatments differentially alter cytokine and behavioural responses to immune challenge (Avitsur et al., 2017).	<i>pinnatifida</i>	(Extrato)	Abolição da secreção periférica de IL-1 β e TNF α induzida por LPS e redução sintomas.
Hawthorn (<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice (Dong et al., 2017).	<i>pinnatifida</i> Bunge	Flavonóides da folhas Hawthorn	↓ TC ↓ LDL + VLDL ↑ PPAR α

			<p>↓ SREBP-1c ↑ CPT-1 ↑ SOD-1/2 ↑ Gpx3 ↑ LDLR Inibição de células ↑ transporte reverso de colesterol (<i>in vivo</i>)</p>
Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins – <i>In-vivo</i> and <i>in-vitro</i> study (Mohana <i>et al.</i> , 2015).	<i>oxycantha</i>	Proantocianidinas oligoméricas	<p>↓ VCAM-1 e MCP1 (<i>in vivo</i>) ↓ MMP2,9 e PPARγ (<i>in vitro</i>)</p>
Major triterpenoids in Chinese hawthorn “ <i>Crataegus pinnatifida</i> ” and their effects on cell proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells (Abbasi <i>et al.</i> , 2017).	<i>pinnatifida</i>	<p>Ácido ursólico Ácido corosólico Ácido oleanólico Ácido maslínico Epicatequina Procianidina B2</p>	Efeito antiproliferativo
Monoterpenes and flavones from the leaves of <i>Crataegus pinnatifida</i> with anticoagulant Activities (Li <i>et al.</i> , 2015).	<i>pinnatifida</i>	<p>Eriodetirol-roseoside (6S,7Z,9R) Vitexina-2”-O-ramnósido</p>	Antitrombotico
Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities (Qiao <i>et al.</i> , 2015).	<i>pinnatifida</i>	<p>Ácido 3β,6β,18β,23-tetrahidroxi-Ácido Olean - 12-en-28-ólico Ácido 2α,3β,6β,18β-tetrahidroxi-olean-12-en-28-ólico Ácido 2α,3β,6β,18β,23-pentahidroxi-olean-12-en-28-ólico</p>	Inibição de células HepG2 e MCF-7.
Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen- activated protein kinase and apoptosis signalling in mice (Wang, Y. <i>et al.</i> , 2015).	<i>pinnatifida</i>	Vitexina	Lesão isquemia reperusão ceebral
Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway (Rosa <i>et al.</i> , 2016).	Não citado	Vitexina	Atividade antiinflamatória via redução em migração de neutrófilos por inibição da via p38, ERK 1/2 and JNK

VI. Referências Bibliográficas

- ABBASI, A. M. *et al.* - Major triterpenoids in Chinese hawthorn “*Crataegus pinnatifida*” and their effects on cell proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN 18736351 , 100, 149–160. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.032.
- ABEDINI, A. *et al.* - Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. ISSN 1741427X , 2013. doi: 10.1155/2013/604536.
- ADEROGBA, M. . *et al.* - Antioxidant activity and cytotoxicity study of *Leucaena leucocephala*(Lam.) de wit leaf extract constituents. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**. ISSN 1118-6267 , 13(1), 65–68. doi: 10.4314/njnpm.v13i1.61612.
- AHMAD, R. *et al.* - Antioxidant and Antiglycating Constituents from Leaves of *Ziziphus oxyphylla* and *Cedrela serrata*. **Antioxidants**. ISSN 2076-3921 , 5(1), 9. doi: 10.3390/antiox5010009.
- ALDINI, G. *et al.* - Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: New evidences for cardio-protection. **Life Sciences**. ISSN 00243205 , 73(22), 2883–2898. doi: 10.1016/S0024-3205(03)00697-0.
- AVITSUR, R. *et al.* - Escitalopram or novel herbal treatments differentially alter cytokine and behavioral responses to immune challenge. **Journal of Neuroimmunology**. , 309(January), 111–118. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.05.020.
- BARTHOLOMEW, B. - Urine Using the Nitrate Reductase Enzyme of *Escherichia Coli*. **Food and Chemical Toxicology**. , 22(7), 541–543. doi: 10.1016/0278-6915(84)90224-2.
- BIESAGA, M. - Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**. ISSN 00219673 , 1218(18), 2505–2512. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.059.
- BZE, M.; CHEKIR-GHEDIRA, L. - ScienceDirect Compounds isolated from the aerial part of *Crataegus azarolus* inhibit growth of BI6F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. , 69(2015), 139–144. doi: 10.1016/j.biopha.2014.11.010.
- CAO, X. *et al.* - Application of counter-current chromatography as a new pretreatment method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water. **Journal of Separation Science**. ISSN 16159306 , 35(4), 596–601. doi: 10.1002/jssc.201100852.
- CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. - Stress, inflammation, and defense of homeostasis.

Molecular Cell. ISSN 10974164 , 54(2), 281–288. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.030.

CHUNG, S. K. *et al.* - Novel flavonol glycoside, 7-O-methyl mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** ISSN 00218561 , 52(15), 4664–4668. doi: 10.1021/jf049526j.

COTA, B. B. *et al.* - Chemical constituents and leishmanicidal activity from leaves of *Kielmeyera variabilis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** ISSN 0102695X , 22(6), 1253–1258. doi: 10.1590/S0102-695X2012005000095.

DAI, J.; MUMPER, R. J. - Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules.** ISSN 14203049 , 15(10), 7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

DONG, P. *et al.* - Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. **Journal of Ethnopharmacology.** , 198, 479–488. doi: 10.1016/j.jep.2017.01.040.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. - The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** ISSN 03043959 , 4(C), 161–174. doi: 10.1016/0304-3959(77)90130-0.

EDWARDS, J. E. *et al.* - A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. **Phytochemistry.** ISSN 00319422 , 79, 5–26. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.04.006.

FRIESEN, J. B. *et al.* - Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. **Journal of Natural Products.** ISSN 15206025 , 78(7), 1765–1796. doi: 10.1021/np501065h.

FUNARI, C. S. *et al.* - Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova.** ISSN 01004042 , 36(10), 1605–1609. doi: 10.1590/S0100-40422013001000019.

FURMACE, T. - The Effects of a Triterpene Fraction Isolated from *Crataegus rnonogyna* Jacq . on Different Acute Inflammation Models in Rats and Mice . Leucocyte Migration and Phospholipase A2 Inhibition. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** , 49, 329–331.

FURTADO, R. A. *et al.* - Antiedematogenic evaluation of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroethanolic extract and its major compounds. **BioMed Research International.** ISSN 23146141 , 2015, 1–7. doi: 10.1155/2015/913152.

GADOTTI, V. M. *et al.* - Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** ISSN 00223573 , 57(10), 1345–1351. doi: 10.1211/jpp.57.10.0014.

GARJANI, A. *et al.* - Effects of extracts from flowering tops of *Crataegus meyeri* A. Pojark. on ischaemic arrhythmias in anaesthetized rats. **Phytotherapy Research.** ISSN 0951418X , 14(6), 428–431. doi: 10.1002/1099-1573(200009)14:6<428::AID-PTR618>3.0.CO;2-L.

- GIORNO, T. B. S. *et al.* - Central and peripheral antinociceptive activity of 3-(2-oxopropyl)-3-hydroxy-2-oxindoles. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. ISSN 18735177 , 135, 13–19. doi: 10.1016/j.pbb.2015.05.004.
- GOTTLIEB, O. R. - The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. **Phytochemistry**. ISSN 0031-9422 , 28(10), 2545–2558. doi: DOI: 10.1016/S0031-9422(00)98039-7.
- GREEN, L. C. *et al.* - Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. ISSN 10960309 , 126(1), 131–138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.
- GUILHON, C. C. *et al.* - Central Antinociceptive and Mechanism of Action of Pereskia bleo Kunth Leaves Crude Extract, Fractions, and Isolated Compounds. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. ISSN 1741-427X , 2015, 1–12. doi: 10.1155/2015/915927.
- HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. - Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. ISSN 0916-8451 , 69(2), 280–286. doi: 10.1271/bbb.69.280.
- HELLENBRAND, N. *et al.* - Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp.). **Fitoterapia**. ISSN 18736971 , 104, 14–22. doi: 10.1016/j.fitote.2015.04.010.
- HWANG, E. *et al.* - Anti-aging effects of the mixture of Panax ginseng and *Crataegus pinnatifida* in human dermal fibroblasts and healthy human skin. **Journal of Ginseng Research**. ISSN 1226-8453 doi: 10.1016/j.jgr.2016.01.001.
- HWANG, K. A. *et al.* - Effects of *Zanthoxylum piperitum* ethanol extract on osteoarthritis inflammation and pain. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. ISSN 19506007 , 105(2017), 481–490. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.109.
- JIN, X. N. *et al.* - Hyperoside exerts anti-inflammatory and anti-arthritic effects in LPS-stimulated human fibroblast-like synoviocytes in vitro and in mice with collagen-induced arthritis. **Acta pharmacologica Sinica**. ISSN 17457254 , 37(5), 674–686. doi: 10.1038/aps.2016.7.
- JOO, S.-J. *et al.* - Flavonoids from *Machilus japonica* stems and their inhibitory effects on LDL oxidation. **International journal of molecular sciences**. ISSN 1422-0067 , 15(9), 16418–29. doi: 10.3390/ijms150916418.
- KIM, Y.-K. *et al.* - Isolation of flavonol rhamnosides from *Ioranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. **Archives of Pharmacal Research**. , 27(1), 44–

47. doi: 10.1007/bf02980044.

KONYALIOGLU, S.; CEBE, G. E.; AKTAR, S. - Antioxidant activity of *Crataegus Monogyna* L flower. **Free Radical Biology and Medicine**. , 108, S56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.198.

KUMAR, D. *et al.* - The genus *Crataegus*: Chemical and pharmacological perspectives. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. ISSN 0102695X , 22(5), 1187–1200. doi: 10.1590/S0102-695X2012005000094.

LEE, J. H. *et al.* - Flavonoids from the aerial parts of *Houttuynia cordata* attenuate lung inflammation in mice. **Archives of Pharmacal Research**. ISSN 19763786 , 38(7), 1304–1311. doi: 10.1007/s12272-015-0585-8.

LEE, J. I. *et al.* - Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. ISSN 12268372 , 16(5), 992–999. doi: 10.1007/s12257-011-0213-5.

LEE, S. Y. *et al.* - Antibacterial effects of afzelin isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, a leading cause of illness in immunocompromised individuals. **Molecules**. ISSN 14203049 , 19(3), 3173–3180. doi: 10.3390/molecules19033173.

LEITÃO, G. G. *et al.* - Isolation of quinoline alkaloids from three *Choisya* species by high-speed countercurrent chromatography and the determination of their antioxidant capacity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. ISSN 0102695X , 27(3), 297–301. doi: 10.1016/j.bjp.2017.01.003.

LI, L. Z. *et al.* - Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities. **Journal of Functional Foods**. ISSN 17564646 , 12, 237–245. doi: 10.1016/j.jff.2014.11.012.

MIÑO, J. *et al.* - Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. **Journal of ethnopharmacology**. ISSN 03788741 , 79(2), 179–182. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00372-5.

MOHANA, T. *et al.* - Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins – in-vivo and in-vitro study. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN 0278-6915 , 82, 96–105. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.028.

NEVES COSTA, F. DAS; LEITÃO, G. G. - Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **Journal of Separation Science**. ISSN 16159306 , 33(3), 336–347. doi: 10.1002/jssc.200900632.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. - Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. ISSN 1943-0264 , 4(3). doi: 10.1101/cshperspect.a006049.

NN, A. - A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength

- and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**. ISSN 21670412 , 04(03), 3–8. doi: 10.4172/2167-0412.1000196.
- NOVAKOVIC, A. *et al.* - Endothelium-dependent vasorelaxant effect of procyanidin B2 on human internal mammary artery. **European Journal of Pharmacology**. ISSN 18790712 , 807(April), 75–81. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.04.015.
- NUNES, M. A. *et al.* - Herbal products containing Hibiscus sabdariffa L., Crataegus spp., and Panax spp.: Labeling and safety concerns. **Food Research International**. ISSN 0963-9969 , (June), 1–12. doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.031.
- OKODUWA, S. I. R. *et al.* - Evaluation of extraction protocols for anti-diabetic phytochemical substances from medicinal plants. **World Journal of Diabetes**. ISSN 1948-9358 , 7(20), 605. doi: 10.4239/wjd.v7.i20.605.
- PARADA, C. A. *et al.* - The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. ISSN 03064522 , 102(4), 937–944. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00523-6.
- PARK, E. K. *et al.* - Effects of unripe apple polyphenols on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen in ultraviolet irradiated human skin fibroblasts. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. ISSN 2234344X , 57(4), 449–455. doi: 10.1007/s13765-014-4128-7.
- PENG, Y. *et al.* - Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Antioxidant and anti-inflammatory neolignans from the seeds of hawthorn. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. ISSN 0960-894X , 26(22), 5501–5506. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.10.012.
- PÉREZ-RAMÍREZ, I. F. *et al.* - Effect of Ocimum sanctum and Crataegus pubescens aqueous extracts on obesity, inflammation, and glucose metabolism. **Journal of Functional Foods**. , 35(2017), 24–31. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.028.
- QIAO, A. *et al.* - Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**. ISSN 17564646 , 13, 308–313. doi: 10.1016/j.jff.2014.12.047.
- RABEL, F.; SHERMA, J. - Review of the State of the Art of Preparative Thin Layer Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. , 6076(February). doi: 10.1080/10826076.2017.1294081.
- RASTOGI, S.; PANDEY, M. M.; RAWAT, A. K. S. - Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. **Phytomedicine**. ISSN 1618095X , 23(11), 1082–1089. doi: 10.1016/j.phymed.2015.10.012.
- RAYMUNDO, L. J. R. P. *et al.* - Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive

activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. ISSN 03788741 , 134(3), 725–732. doi: 10.1016/j.jep.2011.01.027.

RENDA, G. *et al.* - Bioassay Guided Isolation of Active Compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. **Records of Natural Products**. , 1, 76–85. doi: <http://doi.org/10.25135/rnp.07.17.07.117>.

ROSA, S. I. G. *et al.* - Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. **Phytomedicine**. ISSN 1618095X , 23(1), 9–17. doi: 10.1016/j.phymed.2015.11.003.

SAKIPOVA, Z. *et al.* - Quantification of santonin in eight species of *Artemisia* from Kazakhstan by means of HPLC-UV: Method development and validation. **PloS one**. ISSN 1932-6203 , 12(3), e0173714. doi: 10.1371/journal.pone.0173714.

SANNOMIYA, M. *et al.* - Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**. ISSN 00219673 , 1035(1), 47–51. doi: 10.1016/j.chroma.2004.02.050.

SHAN, T. *et al.* - Preparative separation of spirobisnaphthalenes from endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 by high-speed counter-current chromatography. **Molecules**. ISSN 14203049 , 18(10), 12896–12908. doi: 10.3390/molecules181012896.

SHASHANK, K.; PANDEY, A. K. - Chemistry and biological activities of flavonoids. **Hindawi The Scientific World Journal**. ISSN 09242244 , 2013(12), 533–548. doi: 10.1016/j.tifs.2005.08.006.

SILVA, S. *et al.* - Contractile effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on the human internal mammary artery. **Toxicology in Vitro**. ISSN 08872333 , 34, 187–193. doi: 10.1016/j.tiv.2016.04.002.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. - The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**. ISSN 18793649 , 71, 40–56. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.005.

SOBHANI, Z. *et al.* - Medicinal Plants Targeting Cardiovascular Diseases in View of Avicenna. **Current Pharmaceutical Design**. , 23, 2428–2443. doi: 10.2174/1381612823666170215104101.

SOBRINHO, A. P. *et al.* - Characterization of anti-inflammatory effect and possible mechanism of action of *Tibouchina granulosa*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. ISSN 20427158 , 69(6), 706–713. doi: 10.1111/jphp.12712.

STALIKAS, C. D. - Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. ISSN 16159306 , 30(18), 3268–3295. doi:

10.1002/jssc.200700261.

SUEDEE, A.; TEWTRAKUL, S.; PANICHAYUPAKARANANT, P. - Anti-HIV-1 integrase compound from *Pometia pinnata* leaves. **Pharmaceutical Biology**. ISSN 1388-0209 , 51(10), 1256–1261. doi: 10.3109/13880209.2013.786098.

VEVERIS, M.; KOCH, E.; CHATTERJEE, S. S. - Crataegus special extract WS® 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. **Life Sciences**. ISSN 00243205 , 74(15), 1945–1955. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.050.

WANG, J.; XIONG, X.; FENG, B. - Effect of *Crataegus* Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ISSN 1741-427X , 2013, 1–16. doi: 10.1155/2013/149363.

WANG, S. *et al.* - Diet phytochemicals and cutaneous carcinoma chemoprevention: A review. **Pharmacological Research**. ISSN 1043-6618 , 119, 327–346. doi: 10.1016/j.phrs.2017.02.021.

WANG, Y. *et al.* - Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice. **Phytomedicine**. ISSN 1618095X , 22(3), 379–384. doi: 10.1016/j.phymed.2015.01.009.

WEHLING, M. - Non-steroidal anti-inflammatory drug use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. **European Journal of Pharmacology**. , 70(10), 1159–1172. doi: 10.1007/s00228-014-1734-6.

WO, Ł.; SKAPSKA, S.; MARSZALEK, K. - Ursolic Acid — A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities Ursolic Acid — A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**. , 20(11), 20614–20641. doi: 10.3390/molecules201119721.

YANG, C.; LI, D.; WAN, X. - Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods. An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. ISSN 15700232 , 861(1), 140–144. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.11.022.

YANG, N. Y.; TAO, W. W.; DUAN, J. A. - Antithrombotic flavonoids from the faeces of *Trogopterus xanthipes*. **Natural Product Research**. ISSN 14786419 , 24(19), 1843–1849. doi: 10.1080/14786419.2010.482057.

ZAPESOCHNAYA, G. G. - Study of the structure and stereochemistry of flavonoid O-rhamnosides with the aid of PMR spectroscopy. **Chemistry of Natural Compounds**. , 18(6), 658–671.

ZHAO, B. T. *et al.* - Cytotoxic and anti-oxidant constituents from the aerial parts of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus*. **Natural Product Sciences**. ISSN 12263907 , 19(1), 66–70. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.04.043.

ZHOU, X. *et al.* - Separation and purification of α -glucosidase inhibitors from *Polygonatum odoratum* by stepwise high-speed counter-current chromatography combined with Sephadex LH-20 chromatography target-guided by ultrafiltration-HPLC screening. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. ISSN 1873376X , 985, 149–154. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.01.030.