

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

FERNANDA ANGÉLICA MADOGLIO

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE**  
***Passiflora alata* Curtis.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Área de concentração: Fármaco-Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto.

**FLORIANÓPOLIS**

**2011**



Aos meus pais Antonio e  
Neuza por tudo que eles  
representam em minha  
vida.



## AGRADECIMENTOS

A todos que acreditaram em mim, que de alguma maneira tornaram essa conquista possível com um abraço, palavras de consolo, idéias inovadoras, a todos vocês muito obrigada.

Ao professor Flávio Henrique Reginatto pela confiança que depositou em mim, pela orientação e pela amizade. E por todo apoio despendido sempre que precisei.

Ao professor Eloir Paulo Schenkel pela colaboração sem as quais esse trabalho não seria o mesmo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente à Prof<sup>a</sup>. Maique Weber Biavatti por estar sempre disposta a ajudar com conhecimentos científicos e de vida, à Prof<sup>a</sup>. Lilian Bernardes ao Prof. Marcos Antônio Segatto Silva muito obrigada!

Aos amigos do laboratório com os quais pude aprender muito e compartilhar todos os momentos de conquistas frustração e cansaço, especialmente a Cassandra pela parceria e amizade diária, ao Geison, ao Carlos, obrigada por serem os “blodinhos” fiéis. À Maria Izabel por tudo, à Vanessa pelas ajudas com os glicosídeos, ao Solomon, Tatiana, Andressa, Silvana, Carol, Lara, Simone, Tereza, Karen, Lilian, Claiton, as ajudantes mais prestativas e dedicadas Mariana e Francine. Às técnicas Claudia e Solange.

As amigas que sempre estiveram ao meu lado participando de todos os momentos me fazendo ver que o problema nem era tão grande, vocês que foram muitas vezes psicólogas sem formação, mas sempre com muitas informações: Sanmara, Virginia, Ana Luiza, Carolina, Carize, Naira, Débora, Talita e Camila, amo vocês!

Aos meus pais, que foram meus primeiros mestres, ensinando-me o que realmente era certo e o que era errado. Obrigada por cada dia de batalha, por tudo que abdicaram por mim. Aos meus irmãos Fabiano e Flaviana por tudo, especialmente a minha irmã por ser sempre tão presente e por ter me dado as duas flores mais lindas da minha vida Laura e Luisa. A Thainá, Miguel e Leandro. Amo muito vocês.

A Deus por colocar todos esses anjos em minha vida sem os quais eu não teria chego até aqui e por estar sempre ao meu lado. E por fim a CAPES pela bolsa concedida.



**“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”**

Abraham Lincoln





## RESUMO

### INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Passiflora alata* Curtis.

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) possui cerca de 630 espécies, constituindo o maior gênero da família, ocorrendo principalmente nas Américas. As espécies desse gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional, sendo relatados usos como ansiolíticos, antiespasmódico, antiinflamatório e sedativo. Especificamente *P. alata*, espécie central do presente trabalho, apresenta como principais metabólitos secundários relatados para as folhas flavonóides e saponinas, entre as atividades descritas as que possuem mais publicações são as sobre o SNC. No entanto, assim como para outras espécies, não existe um consenso sobre quais compostos ou classes de compostos são responsáveis por determinada atividade. Nas folhas de *P. alata* foi identificado por CLAE isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina-2"-O-ramnosideo sendo esse último o composto majoritário das folhas. As partes aéreas também foram avaliadas por CCD e CLAE, apresentando perfil distinto sendo o pericarpo, das partes avaliadas, o mais rico em variedade de compostos flavonoídicos, mas em concentrações inferiores. Pode-se observar também que o flavonóide majoritário das folhas (vitexina-2"-O-ramnosideo) não é o composto majoritário detectado nas outras partes investigadas. Foi mensurado o teor de compostos fenólicos nas diferentes partes aéreas de *P. alata*, e as sementes apresentaram o maior teor desses compostos (3,93 g EAG /100 g de extrato) tornando-a promissora para análises químicas e biológicas futuras. A vitexina-2"-O-ramnosideo, flavonóide majoritário das folhas de *P. alata*, foi isolado do pericarpo de *P. alata*, fato ainda não descrito na literatura para essa parte da espécie. Das folhas de *P. alata* foi isolado uma saponina. A influência de diferentes métodos de extração das folhas e secagem dos extratos de *P. alata* demonstram que os métodos de extração e secagem mais eficientes para se obter um extrato com maior teor de vitexina-2"-O-ramnosideo são respectivamente infusão e liofilização.

**Palavras Chave:** *Passiflora alata* Curtis; flavonóides; saponinas; fenólicos; métodos de extração e secagem.



## ABSTRACT

### PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE AERIAL PARTS OF *Passiflora alata* Curtis

The genus *Passiflora* (Passifloraceae) has about 630 species, making it the largest genus in the family, occurring mainly in the Americas. The species of this genus are widely used in traditional medicine, with uses being reported as anxiolytic, antispasmodic, anti-inflammatory and sedative. Specifically for *P. alata*, the central specie of this work, the main secondary metabolites reported for leaves are flavonoids and saponins, among the activities described in the literarture activities are on the CNS. However, as for other species, there is no consensus about which compounds or classes of compounds are responsible for certain activities. In leaves of *P. alata* was identified by HPLC isoorientina, orientin, isovitexin and vitexin-2"-O-rhamnoside the latter being the major compound leaves. The aerial parts were evaluated by TLC and HPLC, and showed a distinct profile. The pericarp, the parties evaluated the richest in variety of flavonoid compounds, but in lower concentrations. What can also be observed is the major flavonoid from leaves (vitexin-2"-O-rhamnoside) is the major compound detected in other parts investigated. The concentration of phenolic compounds was measured in the different aerial parts of *P. alata*, the seeds showed the highest content of these compounds (3.93 g EAG / 100 g of extract), making it promising for future chemical and biological analyses. The vitexin-2"-O-rhamnoside, major flavonoid from leaves of *P. alata*, was isolated from the pericarp of *P. alata*, which was not described in the literature for this part of the species. From the leaves of *P. alata* was isolated a saponin. The influence of different methods extraction and drying of leaves extracts of *P. alata* showed which the methods of extraction and drying more efficient to obtain an extract with a higher content of vitexin-2"-O-rhamnoside are respectively infusion and lyophilization.

**Keywords:** *Passiflora alata*; flavonoids, saponins, phenolic compounds, methods of extraction and drying.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento do extrato hidroetanólico das diferentes partes de <i>P. alata</i> e suas frações.....	71
Tabela 2: Estrutura química e tempo de retenção (tr) de flavonóides utilizados como amostras autênticas.....	79
Tabela 3: Máximos de absorção e deslocamentos nos espectros UV da substância VIT-R.....	103
Tabela 4: Valores de deslocamentos químicos em ppm observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância FAM12 em $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	108
Tabela 5: Valores de $\delta$ dos hidrogênios e carbonos na região dos açúcares ligados a substância R9a e suas correlações COSY.....	128
Tabela 6: Valores de $\delta$ observados nos espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ da substância R9a e suas correlações HSQC, HMBC e COSY.....	129
Tabela 7: Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de substância R9a e da literatura.....	133
Tabela 8: Resultados da validação.....	149



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Flavonóides descritos para *P. alata*..... 40
- Figura 2: Saponinas descritas para *P. alata* ..... 42
- Figura 3: Núcleo fundamental dos flavonóides..... 64
- Figura 4: Diferentes classes de flavonóides ..... 65
- Figura 5: Folhas (5A) e frutos (5B) de *P. alata* Foto: F.A. Madoglio ..... 68
- Figura 6: Curva de calibração do ácido gálico. A leitura foi realizada a 726 nm e cada ponto representa a média de três leituras de cada concentração. .... 72
- Figura 7: Teor de fenólicos totais dos extratos hidroalcoolicos de diferentes partes aéreas de *P. alata*. Os dados são média  $\pm$  desvio padrão, expressos em g de EAG/100 g de extrato seco ( $n=3$ ). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA /SNK  $p<0,05$ ) dentro de cada fração das partições avaliadas..... 73
- Figura 8: Teor de fenólicos totais em extratos hidroalcoolicos e frações de diferentes partes aéreas de *P. alata*. Os dados são média  $\pm$  desvio padrão, expressos em g de EAG/100 g de extrato seco ( $n=3$ ). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA /SNK  $p<0,05$ ) dentro de cada parte da planta avaliada. .... 74
- Figura 9: Comparação cromatográfica por CCD do extrato etanólico e de suas frações obtidos de diferentes partes de *P. alata*. Eluente: AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v). Detecção: Reagente Natural (RN). Amostras:..... 75
- Figura 10: Comparação cromatográfica por CCD do extrato etanólico e de suas frações obtidos de diferentes partes de *P. alata*. Eluente: AcOEt:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1,

v/v). Detecção: Anisaldeído sulfúrico e aquecimento.  
Amostras: ..... 76

Figura 11: Cromatografia em camada delgada sob gel de sílica da fração *n*-BuOH do pericarpo de *P. alata* e comparação com amostras autênticas. Fase móvel: AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v). Detecção: Reagente Natural. Amostras:..... 77

Figura 12: Núcleo fundamental dos flavonóides..... 78

Figura 13: Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2)..... 80

Figura 14: Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH do pericarpo de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2)..... 81

Figura 15: Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH da polpa de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2)..... 82

Figura 16: Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH da semente de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2)..... 83

Figura 17: Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno e alguns exemplos de triterpenos e saponinas de plantas (SHIBUYA et al., 1999)..... 93

Figura 18: Purificação e isolamento do composto FAM 12 a partir do pericarpo de *P. alata*..... 99

Figura 19: Purificação e isolamento da substância R9 das folhas de *P. alata*..... 101



Figura 20: Cromatografia em camada delgada da substância FAM12 isolada a partir da fração BuOH do pericarpo de <i>P. alata</i> , cromatografada com amostra autêntica.....	104
Figura 21: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância FAM12 em CD <sub>3</sub> OD a 400MHz. ....	105
Figura 22: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância FAM12 em CD <sub>3</sub> OD a 400MHz. ....	106
Figura 23: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, ampliado, da substância FAM12 em CD <sub>3</sub> OD a 400MHz. ....	107
Figura 24: Cromatografia em camada delgada do composto R9, obtido a partir da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>P. alata</i> . ..	109
Figura 25: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C totalmente desacoplado da substância R9a em CDCl <sub>3</sub> a 100 MHz. ....	111
Figura 26: Subespectro DEPT 135° da substância R9a. ....	112
Figura 27: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H do composto R9a em CDCl <sub>3</sub> e a 400 MHz. ....	114
Figura 28: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, ampliado, do composto R9a em CDCl <sub>3</sub> e a 400 MHz. ....	115
Figura 29: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H, ampliado, da substância R9a em CDCl <sub>3</sub> e a 400 MHz. ....	116
Figura 30: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz) do composto R9a. ....	118
Figura 31: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz), ampliado, da substância R9a.....	119
Figura 32: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz), ampliado, do composto R9a. ....	120

Figura 33: Espectro de correlação CH-HMBC (400-100 MHz) do composto R9a. ....	122
Figura 34: Espectro de correlação CH-HMBC (400-100 MHz), ampliado, do composto R9a. ....	123
Figura 35: Espectro de RMN HH-COSY da substância R9a. ..	125
Figura 36: Seqüência de hidrogênios determinados através das correlações vicinais observadas no espectro COSY para $\beta$ -glicose ligada ao C-3 da R9a (setas: azuis COSY; rosa HMBC).....	127
Figura 37: Constante de acoplamento de hidrogênios vicinais ( $^3J_{HH}$ ) característicos do ciclohexano (FRIEBOLIN, 1988)......	127
Figura 38: Espectro de Massas (APPI) da substância R9. ....	131
Figura 39: Propostas de estruturas para substância R9a (S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> e S <sub>3</sub> )......	132
Figura 40: R9a comparados com estruturas semelhantes da literatura (quadrangulosideo e aquilegiosideo)......	135
Figura 41: Rendimento entre os diferentes métodos de extração e secagem (ANOVA uma via/SNK, p<0.05). Os dados representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas. ....	146
Figura 42: Cromatogramas dos diferentes extratos das folhas de <i>P. alata</i> com detecção UV/DAD em $\lambda = 340$ nm (condições cromatográficas, item 6.3)......	147
Figura 43: Comparação do teor de VIT-R entre os diferentes métodos de extração e secagem (ANOVA uma via/SNK p<0,05), letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas, valores expressos em média $\pm$ DP. Análise comparativa do mesmo método de extração seco de maneiras	

diferentes (ANOVA duas via/Bonferroni  $p < 0,05$ ,  $\pm DP$ ,  $n = 9$ ), \*  
representa diferenças estatísticas significativas..... 150

Figura 44: Formação de quelatos da vitexina e da rutina com  
 $AlCl_3$  (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). ..... 160



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>3. CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Introdução</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 Objetivo</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 Objetivo geral .....	38
3.2.2 Objetivos específicos .....	38
<b>3.3 Metodologia</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 <i>Passiflora alata</i> Curtis: constituição química</b> .....	<b>39</b>
3.4.1 Flavonóides .....	39
3.4.2 Saponinas.....	41
3.4.3 Alcalóides .....	43
<b>3.5 Metodologias analíticas de metabólitos secundários em <i>Passiflora</i> spp.</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6 Atividade farmacológica</b> .....	<b>45</b>
3.6.1 Atividades sobre o SNC .....	46
3.6.2 Atividade antiinflamatória e atividade antioxidante .....	48
3.6.3 Outras atividades farmacológicas .....	49
<b>3.7 Ensaio de toxicidade</b> .....	<b>49</b>
<b>3.8 Conclusão</b> .....	<b>51</b>
<b>3.9 Referências</b> .....	<b>53</b>
<b>4. CAPÍTULO II: ANÁLISE COMPARATIVA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DE FOLHAS, FRUTOS E SEMENTES DE <i>PASSIFLORA ALATA</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.1 Introdução</b> .....	<b>61</b>
<b>4.2 Objetivo</b> .....	<b>62</b>
4.2.1 Objetivo geral .....	62
4.2.2 Objetivo específico .....	62
<b>4.3 Revisão da literatura</b> .....	<b>63</b>
4.3.1 Compostos fenólicos .....	63
4.3.2 Flavonóides .....	64
<b>4.4 Metodologia</b> .....	<b>67</b>
4.4.1 Materiais e Métodos .....	67
4.4.2 Análise estatística .....	69

4.4.3 Análise cromatográfica dos flavonóides das diferentes partes aéreas de <i>P. alata</i> .....	69
<b>4.5 Resultados e discussão .....</b>	<b>71</b>
4.5.1 Rendimento .....	71
4.5.2 Compostos fenólicos totais .....	72
4.5.3 Perfil químico das diferentes partes aéreas de <i>P. alata</i> por cromatografia em camada delgada (CCD).....	75
4.5.4 Perfil químico por CLAE-DAD das diferentes partes aéreas de <i>P. alata</i> .....	78
<b>4.6 Conclusão .....</b>	<b>84</b>
<b>4.7 Referências .....</b>	<b>85</b>
<b>5. CAPÍTULO III: FLAVONÓIDE GLICOSILADO ISOLADO DO PERICARPO (FAM 12) E SAPONINA ISOLADA DAS FOLHAS (R9) DE PASSIFLORA ALATA CURTIS .....</b>	<b>89</b>
<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>91</b>
<b>5.2 Objetivo .....</b>	<b>95</b>
<b>5.3 Procedimentos gerais.....</b>	<b>95</b>
5.3.1 Cromatografia em camada delgada .....	95
5.3.2 Cromatografia em coluna.....	95
5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	95
<b>5.4 Análise Estrutural .....</b>	<b>96</b>
<b>5.5 Material Vegetal.....</b>	<b>96</b>
5.5.1 Preparo e fracionamento dos extratos ( <i>P. alata</i> ).....	97
<b>5.6 Análise cromatográfica das frações .....</b>	<b>97</b>
<b>5.7 Isolamento e purificação .....</b>	<b>97</b>
5.7.1 Isolamento da substância FAM 12 a partir da fração butanólica do pericarpo dos frutos de <i>P. alata</i> .....	97
5.7.2 Substância isolada a partir da fração butanólica das folhas de <i>P. alata</i> .....	100
<b>5.8 Resultados e discussão .....</b>	<b>102</b>
5.8.2 Análise estrutural das substâncias isoladas .....	102
<b>5.9 Conclusão .....</b>	<b>136</b>
<b>5.10 Referências .....</b>	<b>137</b>
<b>6. CAPÍTULO IV: INFLUÊNCIA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E SECAGEM NO TEOR DE VITEXINA-2''-O-RAMNOSÍDEO NO EXTRATO AQUOSO A PARTIR DAS FOLHAS DE PASSIFLORA ALATA CURTIS .....</b>	<b>141</b>
<b>6.1 Introdução .....</b>	<b>143</b>
<b>6.2 Experimental .....</b>	<b>144</b>
6.2.1 Reagentes químicos .....	144
6.2.2 Material vegetal e preparação da amostra .....	144

<b>6.3 Análise qualitativa e quantitativa em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	<b>145</b>
<b>6.4 Validação e procedimento analítico</b> .....	<b>145</b>
<b>6.5 Análise estatística</b> .....	<b>146</b>
<b>6.6 Resultados e discussão</b> .....	<b>146</b>
6.6.1 Rendimento .....	146
6.6.2 Perfil químico .....	147
6.6.3 Validação .....	148
<b>6.7 Conclusão</b> .....	<b>152</b>
<b>6.8 Referências</b> .....	<b>153</b>
<b>7. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>157</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>163</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>167</b>
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>171</b>
<b>APÊNDICE I</b> .....	<b>177</b>
<b>APÊNDICE II</b> .....	<b>201</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACN:** Acetonitrila  
**AcOEt:** Acetato de etila  
**APPI:** Fotoionização a pressão atmosférica  
**AQ:** Aquoso  
**AS:** Anisaldeído sulfúrico  
**CCD:** Cromatografia em camada delgada  
**CDCl<sub>3</sub>:** Clorofórmio deuterado  
**CD<sub>3</sub>OD:** Metanol deuterado  
**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** Diclorometano  
**CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:** Acetona  
**CH<sub>3</sub>COOH:** Ácido acético  
**CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência  
**CLAE-DAD:** Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta por arranjo de diodos.  
**COSY:** Correlation spectroscopy  
**<sup>13</sup>C RMN:** Ressonância magnética nuclear de carbono  
**DEPT:** Distortionless enhancement by polarization transfer  
**DL<sub>50</sub>:** Dose letal em 50%  
**DP:** Desvio padrão  
**EAG:** Equivalente em ácido gálico  
**EC:** Extrato combinado  
**EtOH:** Etanol  
**FO:** Folha  
**HCOOH:** Ácido fórmico  
**HE:** Hidroetanólico  
**HMBC:** Heteronuclear multiple bond correlation  
**HSQC:** Heteronuclear single quantum coherence  
**<sup>1</sup>H RMN:** Ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
**IP:** Intra peritonal  
**LCE:** Labirinto em cruz elevado  
**NaOH:** Hidróxido de sódio  
**NaOMe:** Metóxido de sódio  
***n*-BuOH:** *n*-butanol  
**PE:** Pericarpo  
**PO:** Polpa  
**R. H<sub>2</sub>O:** Resíduo aquoso  
**RN:** Reagente natural  
**SE:** Semente

**SNC:** Sistema nervoso central

**SNK:** Student-newman-keuls

**TBARS:** Thiobarbituric acid reactive substances

**TCA:** Teste de campo aberto

**tr:** tempo de retenção

**UV:** Ultravioleta

**VIT-R:** vitexina-2"-O-ramnosideo

**VO:** Via Oral

---

## INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

Muitos dos fármacos modernos tiveram sua origem na utilização popular, sendo que na metade do século XX, pelo menos 80% de todos os medicamentos eram derivados de plantas (GILANI; RAHMAN, 2005). De acordo com Bade, Chan e Reynisson (2010) dos fármacos comercializados atualmente 39% permanecem sendo obtidos de origem natural, sendo que dos 1000 fármacos comercializados, 10% tratam-se de produtos naturais inalterados, 29% são derivados semi-sintéticos e o restante (61%) de origem sintética.

Mesmo com a revolução na indústria farmacêutica, impulsionada pela produção de fármacos sintéticos, os medicamentos de origem natural nunca deixaram de ter sua importância médica e econômica. Ácido salicílico, atropina, efedrina, morfina, digoxina, taxol, vincristina e vimblastina são alguns exemplos de medicamentos obtidos de fontes naturais com amplo uso na prática clínica (GILANI; RAHMAN, 2005; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

Dentre os principais produtos de origem natural utilizados no mundo destacam-se as espécies do gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae com cerca de 630 espécies (DEGINANI, 1999) e que ocorrem principalmente nas Américas (SACCO, 1980). O centro norte do Brasil é onde mais se distribui este gênero, com cerca de 150 espécies nativas (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

No Brasil as espécies de *Passiflora* são popularmente conhecidas como maracujás (PIO-CORRÊA, 1978), sendo o nosso país o maior produtor mundial de maracujá. Dados do IBGE (2007) indicaram que a produção brasileira dessa fruta foi superior a 660.000 toneladas, concentrada predominantemente na região Nordeste (63,44%) seguido da região Sudeste (23,63%).

Entre as diferentes espécies nem todas são comestíveis e apenas um número reduzido consegue ocupar espaço nos grandes mercados alimentícios, sendo as mais conhecidas o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata*) (LEONEL; SAMPAIO, 2007).

*Passiflora alata* Curtis, objeto central do presente estudo, é também conhecida como maracujá-de-refresco, maracujá-grande e maracujá-doce, e possui como sinônimas científicas

*Passiflora alata* var. *latifolia* (DC.) Mast., *Passiflora latifolia* DC., *Passiflora phoenicia* Lindl. (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; PIO-CORRÊA, 1978; SACCO, 1980). *P. alata* foi mantida como espécie oficial da 5ª edição da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010) onde, além dessa espécie, foram incluídas *P. edulis* e *P. incarnata*.

Recentemente importantes iniciativas de expansão do cultivo do maracujá doce têm sido observadas. Tal fato está diretamente relacionado à comercialização dos frutos do maracujá-doce a preços muito superiores aos praticados para o maracujá-amarelo, o que tem atraído a atenção por parte dos produtores. No entanto, apesar do contexto favorável, são escassas as informações técnicas que permitam um manejo adequado dos pomares e do fruto (MELETTI et al., 2003). *P. alata* possui frutos ovais ou periformes, com casca intensamente alaranjada e formato semelhante ao mamão-papaia. A polpa é adocicada, com odor forte e agradável (MELETTI, 1996).

Em relação às folhas, cada espécie do gênero *Passiflora* apresenta características específicas. *P. alata* apresenta a base da folha arredondada ou ligeiramente reentrante, ápice acuminado e margem lisa. A nervação é penínérvea, sendo as nervuras principais e secundárias mais salientes na face abaxial. Já *Passiflora edulis* possui folhas trilobadas, trinervada e margem serrilhada (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; LORENZI; MATOS, 2008; SACCO, 1980).

As espécies desse gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional, sendo relatados usos como ansiolíticos, antiespasmódica, antiinflamatória e sedativa (SOARES et al., 2004). Sob o ponto de vista de estudos químicos e farmacológicos a espécie com maior número de estudos é *Passiflora incarnata*, sendo essa a espécie oficial de diversas Farmacopéias como a Européia, Portuguesa, Espanhola dentre outras (EUROPEAN PHARMACOEPIA, 1996; FARMACOEPIA ESPAÑOLA, 2005; FARMACOEPIA PORTUGUESA, 2002)

No Brasil, embora *P. incarnata* não seja amplamente cultivada, em um levantamento realizado por Ortega e colaboradores (1989) foi constatado que dos 147 medicamentos registrados com maracujá em sua formulação, 101 não especificaram qual espécie era utilizada, 27 caracterizaram a *P. incarnata* em sua formulação e 19 descreveram a *P. alata*.

Dados mais recentes obtidos no *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária em fevereiro (BRASIL, 2011), indicaram 71 medicamentos cadastrados, dos quais 36 estavam descritos como *Passiflora incarnata*, 24 como *Passiflora alata* e 11 como *Passiflora* sem espécie descrita. Cabe ressaltar que dentre as espécies de *Passiflora* com registros de medicamentos no mercado Brasileiro, *Passiflora alata* é a que possui menos estudos científicos comprovando suas atividades farmacológicas.

Apesar do elevado teor de flavonóides (MÜLLER et al., 2005) e saponinas (REGINATTO et al., 2001) presentes em *P. alata*, são escassas publicações na literatura sobre as propriedades biológicas destes metabólitos quando avaliados em sua forma isolada, fato que pode ser justificado pelo baixo número de investigações fitoquímicas realizadas com essa espécie. Cabe ressaltar também que estudos químicos e farmacológicos com outras partes do vegetal como os frutos e a polpa são raros.

## 2. Objetivo

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar um estudo químico das folhas e frutos de *P. alata*. O desenvolvimento do trabalho se deu com base no perfil de saponinas e flavonóides C-glicosídeos buscando o isolamento e identificação dos mesmos, utilizando para isso técnicas cromatográficas e espectroscópicas distintos.

### 2.2 Objetivos específicos

Estabelecer um perfil comparativo entre as diferentes partes aéreas da *Passiflora alata* por CLAE- DAD com base na constituição de flavonóides C-glicosídeos.

Isolar os flavonóides C-glicosídeos dos frutos de *P. alata* e as saponinas das folhas de *P. alata* por meio de técnicas cromatográficas diversas.

Identificar por Espectrofotometria no UV-Vis, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM) os flavonóides e saponinas isolados.

Avaliar a influência de diferentes métodos de extração (decoção, infusão e refluxo) e secagem do extrato (liofilização, evaporação à pressão reduzida-rotavapor) no perfil químico de flavonóides e no teor de vitexina-2"-O-ramnosideo por CLAE-DAD.

Diante dos objetivos propostos a dissertação foi organizada em quatro capítulos:

**O capítulo 1** descreve uma revisão bibliográfica de algumas espécies de *Passiflora* (*P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis*, *P. actinia*, *P. tripartita* var. *molissima*, *P. ligularis*, *P. foetida*) com ênfase em seus constituintes químicos e atividade farmacológica.

**O capítulo 2** apresenta uma análise comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e do teor de fenólicos totais das folhas e frutos de *P. alata*



**O capítulo 3** descreve o isolamento de constituintes químicos das partes aéreas de *P. alata*, sua caracterização e elucidação por técnicas espectroscópicas e cromatográficas.

**O capítulo 4** avalia a influência dos métodos de extração e secagem no perfil químico de flavonóides por CLAE-DAD e no teor de fenólicos totais em folhas, e frutos de *P. alata*.



---

---

**CAPÍTULO I:**

REVISÃO DA LITERATURA

---

---



### 3. CAPÍTULO I: Revisão da literatura

#### 3.1 Introdução

O maracujá tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional com diversas indicações. A infusão das folhas de *P. alata*, por exemplo, possui relatos para o tratamento da ansiedade, espasmos e nervosismo (SOARES et al., 2004) além de relatos de uso como diurética, antifebril, para o tratamento de inflamações cutâneas, sendo ainda considerada diaforética e anti-histérica (PIO-CORRÊA, 1978).

O uso etnofarmacológico das espécies de *Passiflora* ocorre, na maioria das vezes para as folhas e algumas vezes para os ramos floridos, quando colhidos depois do amadurecimento de alguns dos seus primeiros frutos (COSTA, 1977; LORENZI; MATOS, 2008). Já as suas raízes são utilizadas popularmente como anti-helmínticas, antiinflamatórias (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999), sedativas, narcóticas e no tratamento de histerias (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Dos frutos, o mesocarpo seco e pulverizado, é usado popularmente contra diabetes e o suco como sedativo (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

No âmbito da saúde pública no Brasil, foi estabelecido em 2006 pelo Ministério da Saúde a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). Mais recentemente, em dezembro de 2008, foi instituído o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MDS, 2008) que tem como objetivo inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. Nesse contexto, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (BRASIL, 2009) listou 71 espécies de plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde, sendo incluídas nessa lista *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*.

## 3.2 Objetivo

### 3.2.1 Objetivo geral

O propósito dessa revisão é apresentar uma visão geral sobre a diversidade e constituintes químicos de espécies de *Passiflora* selecionadas e relatar suas atividades biológicas.

### 3.2.2 Objetivos específicos

Descrever sumariamente, os estudos químicos e farmacológicos de diferentes espécies de *Passiflora* (*P. actinia*, *P. foetida*; *P. quadrangularis*; *P. ligularis*; *P. tripartita* var *molissima*; *P. incarnata*; *P. edulis* spp).

Detalhar as publicações de constituintes e atividades relatados para *P. alata*, objeto central do presente trabalho.

## 3.3 Metodologia

Nessa revisão realizou-se um extensivo levantamento na literatura de (1975 a 2011) abrangendo folhas e frutos de oito espécies de *Passiflora*, compilando os artigos com relatos de atividade biológica e descrição de constituintes químicos (características como nome da espécie, parte utilizada, atividade - apêndice 1, e constituintes químicos - apêndice 2, relatados e sumarizados em duas tabelas). Mais de 160 referências foram consultadas em diversas bases de dados (Scopus, Science Finder, Periódicos Capes) as palavras de busca foram o *gênero* e a *espécie* das oito *Passiflora* de interesse.

### 3.4 *Passiflora alata* Curtis: constituição química

Dentre os principais metabólitos secundários relatados para *P. alata* destacam-se os flavonóides, as saponinas e os alcalóides. Uma breve revisão dos constituintes descritos para o gênero *Passiflora* é apresentada no Apêndice 1. A seguir são destacados os constituintes relatados para *P. alata*, objeto central do presente trabalho.

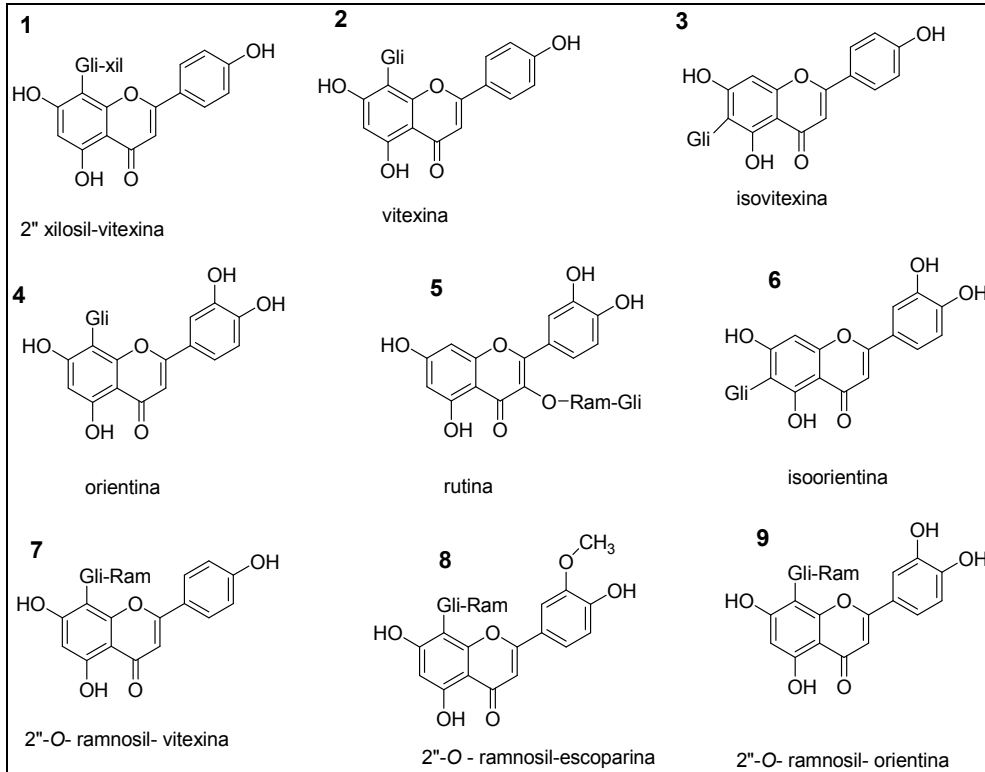
#### 3.4.1 Flavonóides

O primeiro relato de flavonóide para *P. alata* foi em 1982, quando Ulubelen e colaboradores descreveram o isolamento de quatro flavonóides por cromatografia líquida preparativa de fase reversa (RP-18), a partir das folhas desta espécie. Os compostos isolados foram identificados como 2"-xilossilvitexina (1), vitexina (2), isovitexina (3), orientina (4) (ULUBELEN et al., 1982).

A presença de vitexina (2) e isovitexina (3) foi descrita novamente em extratos hidroalcoolicos das folhas de *P. alata*. Além da identificação estrutural, os flavonóides presentes no extrato foram quantificados por métodos espectrofotométricos, indicando um teor de 44,8% de flavonóides totais expressos em rutina (OGA et al., 1984). Pereira et al. (2004) também descreveram a presença de vitexina (2), orientina (4), rutina (5), e isoorientina (6), a partir de extratos metanólicos das folhas de *P. alata*.

Mais recentemente, foi relatado o isolamento de cinco C-glicosilflavonas derivados da apigenina - luteolina e crisoeriol [isovitexina (3), isoorientina (6), 2"-O-ramnosil-vitexina (7), 2"-O-ramnosil-scoparina (8), 2"-O-ramnosil-orientina (9)] - a partir de extrato aquoso das folhas de *P. alata*. É importante destacar que os flavonóides 7, 8 e 9 foram relatados pela primeira vez para a espécie (DOYAMA et al., 2005).

Os flavonóides relatados para *P. alata* encontram-se na figura 1.



**Figura 1:** Flavonóides descritos para *P. alata* (DOYAMA et al., 2005; ULUBELEN et al., 1982)

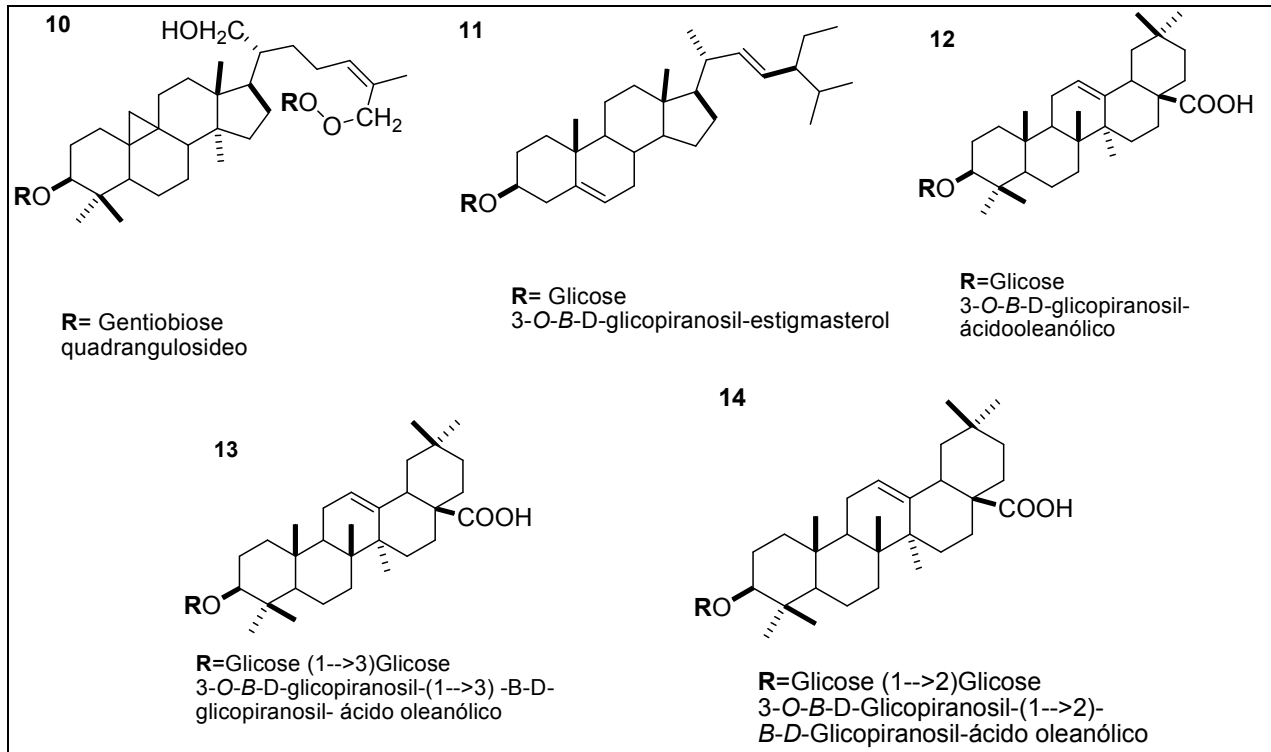


### 3.4.2 Saponinas

O primeiro trabalho que relatou a presença de saponinas em *P. alata* foi publicado por Reginatto et al. (2001). Neste trabalho os autores descreveram o isolamento, a partir das folhas de *P. alata*, de uma saponina triterpênica tetracíclica, o 9,19-ciclolanostano-24Z-en-3 $\beta$ ,21,26-tri-hidróxi-3,26-di-O-gentiobiose (10) conhecida como quadrangulosídeo, composto previamente relatado para *P. quadrangularis* (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985). Neste mesmo trabalho os autores descrevem também a identificação de quatro saponinas (11-14), sendo uma esteroidal e identificada como 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-estigmasterol (11), e três saponinas triterpênicas de núcleo oleanano, o ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico (12), o ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glicopiranosil-oleanólico (13) e o ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosiloleanólico (14).

Em uma análise quantitativa do extrato aquoso das folhas desta mesma espécie utilizando CLAE-UV, Reginatto et al. (2004) constataram que o quadrangulosídeo representa 22,2% (m/m) do extrato aquoso das folhas, correspondendo a 0,8% em relação às folhas secas e constituindo-se no composto majoritário para a espécie. Em 2005 tanto o quadrangulosídeo (10) como o ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glicopiranosiloleanólico (14) foram novamente relatados por Doyama e colaboradores para esta mesma espécie.

As estruturas das saponinas relatadas para *P. alata* encontram-se na figura 2.



**Figura 2:** Saponinas descritas para *P. alata* (REGINATTO et al., 2001)

### 3.4.3 Alcalóides

Os alcalóides descritos para as espécies de *Passiflora* são do tipo indólicos, mais especificamente do tipo  $\beta$ -carbolínicos, sendo que muitos desses possuem atividade como tranqüilizante e também para o tratamento de hipertensão (HARBORNE; BAXTER, 1995).

Embora os relatos da presença destes alcalóides (harmina, harmol, harmalina, harmalol e harmana) para o gênero *Passiflora*, especialmente para *P. incarnata*, sejam referentes na sua quase totalidade a estudos conduzidos nas décadas de 60 e 70, estudos mais recentes detectaram somente traços de harmana ou mesmo nenhum alcalóide no gênero, com exceção do trabalho realizado por Rehwald et al. (1995), o qual confirmou a presença destes alcalóides em *P. incarnata*, através de um método seletivo e validado para análise em nível de traços.

Especificamente para *P. alata* estes compostos foram primeiramente relatados em 1984, onde Oga e colaboradores quantificaram os alcalóides presentes nas folhas de *P. alata* através de métodos espectrofotométricos (UV). Os resultados apresentaram um teor de 0,217 mg/kg de alcalóides expressos em harmana. No entanto, tentativas recentes foram realizadas no intuito de analisar qualitativamente, através de CLAE, a presença de alcalóides indólicos, e mais uma vez a presença dessas substâncias não foi detectada (COELHO; VASCONCELLOS, 2003). Já Abourashed et al. (2003) utilizando CLAE identificaram e quantificaram cinco alcalóides  $\beta$ -carbolínicos em várias espécies de *Passiflora*, entre elas *P. alata* onde foram detectado os alcalóides harmana, harmina e harmalina.

### 3.5 Metodologias analíticas de metabólitos secundários em *Passiflora* spp.

A padronização química de medicamentos fitoterápicos e a garantia da sua eficácia e segurança requerem métodos analíticos adequados para a detecção e quantificação dos princípios ativos, “marcadores químicos” e/ou substâncias potencialmente tóxicas (CARVALHO et al., 2008).

Diferentes métodos cromatográficos, como CLAE e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) demonstraram ser importantes ferramentas para a identificação de material vegetal de espécies de *Passiflora*, empregando flavonóides como marcadores

Os flavonóides presentes em *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. caerulea* foram analisados por HPTLC e comparados com os teores obtidos por CLAE (PEREIRA et al., 2004). As espécies *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* foram escolhidas para este estudo devido às várias atividades farmacológicas relatadas e ao significativo número de preparações farmacêuticas existentes no mercado. Já *P. caerulea* foi incluída no estudo por ser usada como possível adulterante na Argentina e no Uruguai. A comparação dos métodos (HPTLC e CLAE) foi realizada utilizando amostras padrões e 11 amostras comerciais, visando avaliar a aplicabilidade destas técnicas no controle de qualidade de espécies de *Passiflora*.

Foi possível determinar o teor de orientina e isoorientina por meio das duas técnicas, mostrando um perfil flavonoídico distinto entre as espécies analisadas tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Além disso, empregando HPTLC, isoorientina foi detectada em todas as amostras analisadas, não se caracterizando, dessa forma, como um bom marcador químico (PEREIRA et al., 2004).

A outra metodologia analítica avaliada, CLAE, também demonstrou ser eficiente para a análise quantitativa de flavonóides de *Passiflora* spp. No entanto, documentos oficiais como as Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira ainda adotam a espectrometria UV-Visível como método de escolha para a análise quantitativa de flavonóides nestas espécies vegetais (PEREIRA et al., 2004).

Em outro trabalho utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), foi realizada uma análise qualitativa (*fingerprint*) de flavonóides e saponinas de 14 espécies de *Passiflora* de ocorrência no sul do Brasil. De todas as amostras avaliadas somente em *P. alata* foram detectadas saponinas, mais especificamente os compostos 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-1 $\rightarrow$ 2- $\beta$ -D-glicopiranosil-ácido oleanólico e o quadrangulosídeo, compostos sugeridos como potenciais marcadores químicos para a espécie (BIRK et al., 2005).

Em análise por CLAE e UV foi possível determinar os flavonóides presentes nas folhas de *P. alata* e comparar o seu perfil e teor aos de *P. incarnata*. Os autores constataram que isovitexina é o flavonóide majoritário de *P. incarnata* (1,198 g%), embora não o seja em *P. alata* (0,018 g%), pois somente traços de isovitexina e vitexina foram observados nesta espécie. Foi constatado também a ausência de outros compostos como orientina, swertisina (marcador de *P. incarnata*), hiperosídeo, rutina, hesperidina e ácido clorogênico em *P. alata* (MÜLLER et al., 2005).

Com o objetivo de determinar o teor de rutina, vitexina, flavonóides totais e de alguns nutrientes, folhas de *P. edulis* foram coletadas de diferentes posições do ramo. Os teores de rutina, vitexina e flavonóides totais variaram em função da posição e idade da folha, sendo maiores nas folhas jovens, localizadas na região apical dos ramos do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) (FREITAS et al., 2007).

Para *P. alata* não foi encontrado, na literatura consultada, estudos detalhados de sazonalidade, embora Müller et al. (2005) tenham observado uma diferença marcante na concentração de flavonóides das folhas de *P. alata* coletadas em diferentes estações (inverno e verão).

Em uma publicação mais recente, Chabariberi e colaboradores (2009) determinaram os flavonóides das folhas de *Passiflora* spp. por espectrofotometria e seus resultados foram comparados com métodos CLAE. Os autores evidenciaram que a espectrofotometria no UV-Vis possui resultados similares quando comparada à CLAE para análises de rutina, pois foram obtidos resultados estatisticamente similares, com a vantagem de que o método espectrofotométrico trata-se de uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que utiliza menor quantidade de solvente em comparação com CLAE.

### **3.6 Atividade farmacológica**

Muitos trabalhos foram publicados objetivando elucidar a atividade farmacológica de espécies de *Passiflora*, e relacioná-la com a composição química. Dentre as atividades mais investigadas destacam-se as sobre o Sistema Nervoso Central

(SNC). Uma breve revisão das atividades descritas para o gênero *Passiflora* é apresentada no Apêndice 2. A seguir são destacadas as atividades relatadas para *P. alata*.

### 3.6.1 Atividades sobre o SNC

Com relação à atividade no SNC de *P. alata*, o maior número de estudos é para atividade ansiolítica. O primeiro trabalho que relatou atividade farmacológica de *P. alata* foi publicado por Lutomski e Wrocinski onde o extrato seco de *P. alata*, causou depressão do SNC em camundongos. Em continuidade a esse relato, Oga e colaboradores (1984) analisaram o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos tratados com extratos preparados de acordo com a Farmacopéia Francesa (1965) nas doses de 75 e 150 mg/kg via i.p. Os resultados mostraram um aumento significativo no tempo do sono nos animais tratados.

Oga e colaboradores (1984) avaliaram também a convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos, sendo que os extratos mostraram uma atividade inibitória, prolongando o tempo de latência e o período de sobrevivência nas doses de 75 e 150 mg/kg. Ao avaliar a atividade motora dos camundongos, a dose de 150 mg/kg reduziu a atividade, causando ainda um efeito antagonista ao observado para a anfetamina. A atividade analgésica dos extratos foi testada nessas mesmas doses e não foi detectada atividade (OGA et al., 1984).

Petry et al (2001), avaliaram a atividade ansiolítica de extratos hidroetanólicos (40°GL) a partir das folhas de *P. alata* e *P. edulis* usando o teste do labirinto em cruz elevada (LCE). Os extratos apresentaram atividade ansiolítica nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg para *P. edulis* e nas doses de 100 e 150 mg/kg para *P. alata*. Foram avaliados também os teores de flavonóides totais expressos em apigenina, onde o teor de *P. edulis* foi superior ao de *P. alata*, 4,60% (m/m) e 2,90% (m/m) respectivamente. Os autores sugerem uma correlação entre o teor de flavonóides com ação farmacológica observada.

De-Paris et al. (2002) avaliaram a atividade ansiolítica de *P. alata* e *P. edulis* Sims, porém agora com extrato aquoso das folhas desta espécie, utilizando as mesmas doses e modelo

utilizado por Petry et al. (2001). *P. edulis* mostrou efeito ansiolítico nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, enquanto *P. alata* apresentou atividade nas doses de 100 e 150 mg/kg. Pode se constatar que o extrato aquoso (DE-PARIS et al., 2002) comparado ao extrato hidroetanólico (40°GL) (PETRY; REGINATTO, 2001) possuem efeito ansiolítico semelhante.

Otobone e colaboradores (2005) avaliaram o efeito ansiolítico e sedativo do extrato combinado (EC) de *P. alata* e *Valeriana officinalis* L. em ratos, submetidos aos testes do LCE e teste de campo aberto (TCA). Nenhum efeito foi detectado após o tratamento agudo ou repetido por 3 ou 7 dias com EC (5, 10 e 20 mg/kg, v.o.). Somente após a administração por 15 dias do EC (20 mg/kg), foi detectado um aumento na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos no LCE, sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA. O tratamento agudo com 300 ou 600 mg/kg do EC diminuiu significativamente a atividade locomotora no TCA. Estes resultados mostram que EC produz efeito ansiolítico e sedativo, sendo o efeito ansiolítico detectado em doses 15 vezes menor que a necessária para atingir o efeito sedativo.

Reginatto et al. (2006) avaliaram a atividade ansiolítica de extratos aquosos extraído por refluxo e secos por *spray-dryer* das folhas de *P. alata* e *P. edulis* em ratos, utilizando o modelo de LCE, nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg (v.o.). Foi observado um efeito ansiolítico na dose de 800 mg/kg para *P. alata* e 400 e 800 mg/kg para *P. edulis*.

Barbosa et al. (2008) avaliaram a ação ansiolítica e o processo de formação de memória de extratos aquosos de *P. alata* e *P. edulis* var. *flavicarpa* nas doses 25, 50, 100 e 150 mg/kg em ratos (i.p.), usando o modelo de LCE e de esQUIVA inibitória, respectivamente. *P. alata* induziu efeito ansiolítico nas doses de 100 e 150 mg/kg e *P. edulis* nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg. A memória não foi afetada em nenhuma das doses, diferentemente do diazepam que interferiu no processo de formação de memória em ratos. Os resultados sugerem que o extrato aquoso de ambas as espécies de *Passiflora*, induziram efeito ansiolítico em ratos, mas sem afetar o processo de formação da memória.

No mesmo ano, Provensi et al. (2008) avaliaram o efeito ansiolítico e sedativo em camundongos (v.o.) do extrato aquoso (AQ) e hidroetanólico (HE-70%) obtidos das folhas de *P. alata*, e

investigaram também o envolvimento do receptor benzodiazepino-GABA<sub>A</sub> no efeito ansiolítico observado. Foi demonstrado que o AQ e o HE embora tenham uma composição similar em relação aos flavonóides e saponinas apresentam um diferente perfil farmacológico, pois o extrato HE nas doses de 300 e 600 mg/kg apresentou tanto efeito ansiolítico quanto sedativo, enquanto o extrato AQ (nas mesmas doses) apresentou somente efeito hipnótico.

O efeito ansiolítico causado pelo extrato HE na dose de 300 mg/kg foi testado com o antagonista flumazenil observando que houve um bloqueio completo da atividade descrita. Os autores avaliaram também para o mesmo extrato (HE na dose de 300 mg/kg) o ligante flunitrazepam [<sup>3</sup>H], nas doses de 10-1000 µg/mL, em fluido de cérebro de ratos. Os autores verificaram que não houve modificação na ligação do flunitrazepam inoculado, sendo uma das justificativas apresentadas pelos autores que *in vivo* pode haver biotransformação de alguns constituintes do extrato para gerar metabólitos ativos nos receptores benzodiazepínicos (PROVENSI et al., 2008).

### 3.6.2 Atividade antiinflamatória e atividade antioxidante

Vargas et al. (2007) avaliaram a inibição da inflamação de extratos aquosos secos por *spray-dryer* das folhas de *P. alata* e *P. edulis* Sims, em camundongos empregando o modelo de pleurisia induzida por carragenina. O tratamento com os extratos inibiu a migração dos leucócitos e reduziu a formação de exsudatos. Além disso, foi observada significativa inibição da atividade da mieloperoxidase e adenosina-deaminase nas doses testadas (100 mg/kg - *P. alata* - e 250 mg/kg - *P. edulis* - ip), e uma significativa redução da proteína sérica. Baseado nesses dados os autores afirmaram que *P. alata* e *P. edulis* Sims possuem uma importante atividade antiinflamatória *in vivo*.

A atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. alata* e *P. edulis* foi avaliada *in vitro* e *ex vivo* em ratos. Os autores constataram que ambas as espécies, em especial *P. alata*, possuem atividade antioxidante significativa. A análise do teor de fenólicos totais das duas espécies indicou que *P. alata* apresenta aproximadamente o dobro de fenólicos totais



quando comparado a *P. edulis*, o que pode ser relacionado à atividade antioxidante detectada (RUDNICKI et al., 2007a)

Rudnicki et al (2007b) avaliaram também o efeito protetor de extratos de *P. alata* em ratos com danos oxidativos induzidos por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). O pré-tratamento com *P. alata* (5 mg/kg, v.o.) proporcionou uma significativa proteção, evidenciada pela proteção do fígado, mostrando também uma relevante diminuição da peroxidação lipídica (TBARS) em níveis cardíacos, o que sugere um efeito tanto hepatoprotetor quanto cardioprotetor de *P. alata* em ratos tratados com CCl<sub>4</sub>.

### 3.6.3 Outras atividades farmacológicas

Doyama et al. (2005) analisaram os efeitos do chá de *P. alata* nos níveis de colesterol e glicose em ratos. O extrato administrado na dose de 1000 mg/kg, (v.o.) apresentou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de colesterol HDL.

## 3.7 Ensaios de toxicidade

Doses elevadas do extrato bruto das folhas de *P. alata* (acima de 400 mg/kg, i.p) foram relatadas como letais por provocarem depressão profunda no SNC em camundongos, sendo o valor da DL<sub>50</sub> do extrato estimado em 456 mg/kg (OGA et al., 1984).

Nos últimos 10 anos foram encontrados somente três relatos da avaliação da toxicidade de extratos de *P. alata*.

Giavina-Bianchi JR. e colaboradores (1997) descreveram as espécies *P. alata* e *Rhamnus purshiana* como possíveis agentes causadores de doenças respiratórias, como asma e rinite. Testes de pele e por *western blot* confirmaram a sensibilidade de pacientes para esses extratos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* sugerindo que essas plantas são agentes etiológicos ocupacionais mediadores de IgE para asma e rinite.

Amaral, Schenkel e Langeloh (2001) avaliaram a toxicidade dos extratos aquosos liofilizados de *P. alata* e *P. edulis* Sims sobre a reprodução de ratas. Esses extratos foram administrados nas doses de 800 mg/kg (v.o.) durante todo o

período de gestação, e os resultados não mostraram diferença significativa no desenvolvimento ponderal, consumo de água ou ração, massa do útero, número de sítios de implantação, número de corpos lúteos, perdas pré e pós implantação e taxa de parto, bem como o desenvolvimento da prole também não foi afetado. Pode se concluir a ausência de toxicidade reprodutiva dos extratos nas doses testadas.

Boeira e colaboradores (2010) avaliaram a toxicidade aguda em camundongos e sub-aguda em ratos do extrato aquoso seco por *spray-drier*, a partir das folhas de *P. alata*. Foram avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos, histológicos e da urina. Não foi observada morte dos camundongos quando o extrato foi administrado em dose única de 4800 mg/kg (v.o.), nem nos ratos tratados com dose de 300 mg/kg por 14 dias (uma vez ao dia). Além disso, todos os animais não apresentaram alterações bioquímicas, hematológicas ou histológicas significantes quando comparados ao grupo controle. No entanto, os camundongos tratados com doses agudas (150, 300 e 600 mg/kg) apresentaram danos no DNA determinados pelo teste cometa após 3h do tratamento, indicando que mais investigações são necessárias para garantir a segurança do uso em humanos (BOEIRA et al., 2010).

### **3.8 Conclusão**

Dentre as atividades mais descritas para as espécies investigadas destacam-se as sobre o SNC. Os metabólitos secundários mais publicados para o gênero são flavonóides, saponinas e os alcalóides. Sendo a presença dos alcalóides artigo de discussão, indicada como presente por alguns autores (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2003) e ausente para outros (COELHO; VASCONCELLOS, 2003).



### 3.9 Referências

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants-II. Application to Harman Alkaloids of Genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**. v. 41, n. 2, p. 100-106, 2003.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AMARAL, K. M.; SCHENKEL, E. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratos Wistar. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 20, n. 3, p. 215-20, 2001.

BARBOSA, P. R.; VALVASSORI, S. S.; BORDIGNON JR, C. L.; KAPPEL, V. D.; MARTINS, M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**. v. 11, n. 2, p. 282-288, 2008.

BIRK, C. D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 28, n. 14, p. 2285-2291, 2005.

BOEIRA, J. M.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L. D. A.; BARBOSA, P. R.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CORRÊIA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M. P.; PEDROSO, A. P.; GOSMANN, G.; DA SILVA, J.; RATES, S. M. K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 128, n. 2, p. 526-532, 2010.

BRASIL. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. In: **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, p.92.

BRASIL. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renisus)**. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1). Acesso em: 22 de março de 2011.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHABARIBERI, R. D. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

COELHO, M.; VASCONCELLOS, S. R. B. **Análise qualitativa dos extratos de *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce), através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2003. p. Monografia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí (SC), 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia** 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.

DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

FREITAS, M. S. M.; MONNERAT, P. H.; VIEIRA, I. J. C.; CARVALHO, A. J. C. Flavonóides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. **Ciência Rural**. v. 37, n. 6, p. 1634-1639, 2007.

GIAVINA-BIANCHI JR, P. F.; CASTRO, F. F. M.; MACHADO, M. L. S.; DUARTE, A. J. S. Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**. v. 79, n. 5, p. 449-454, 1997.

HARBORNE, J.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. London, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MDS. **Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome**  
Disponível em: <http://www.mds.gov.br/noticias/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-disponibiliza-consulta-publica-1>.  
Acesso em: 22 de março de 2009.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**: Algomac-Michigan: Reference Publications, 2000.

MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.

OGA, S.; DE FREITAS, P. C. D.; DA SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**. v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**. v. 25, n. 1, p. 191-193, 1985.

OTOBONE, F. J.; MARTINS, J. V. C.; TROMBELLI, M. A.; ANDREATINI, R.; AUDI, E. A. Anxiolytic and sedative effects of a combined extract of *Passiflora alata* Dryander and *Valeriana officinalis* L. in rats. **Acta Scientiarum - Health Sciences**. v. 27, n. 2, p. 145-150, 2005.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 162-164, 2001.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.

PROVENSI, G.; NOËL, F.; LOPES, D. V. S.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; DE COSTA, F.; MORAIS, E. C.; GOSMANN, G.; RATES, S. M. K.

Participation of GABA-benzodiazepine receptor complex in the anxiolytic effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 6, p. 845-851, 2008.

REGINATTO, F. H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 5, p. 348-351, 2006.

REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 3, p. 195-197, 2004.

REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 6, n. 2, p. 96-100, 1995.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; VEIGA PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; FONSECA MOREIRA, J. C. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**. v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007a.

RUDNICKI, M.; SILVEIRA, M. M.; PEREIRA, T. V.; OLIVEIRA, M. R.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, n. 4, p. 656-661, 2007b.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**. v. 13, n. 4, p. 323-328, 1999.

SOARES, E. L. C.; VENDRUSCOLO, G. S.; EISINGER, S. M.; ZÁCHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de



2001. I–Origem e fluxo do conhecimento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, n. 3, p. 69-95, 2004.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**. v. 45, n. 6, p. 783-783, 1982.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**. v. 78, n. 2, p. 112-119, 2007.



---

---

**4.CAPÍTULO II: Análise comparativa por Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e teor de fenólicos totais de folhas, frutos e sementes de *Passiflora alata***

---

---



## 4.1 Introdução

Nos últimos anos têm-se observado um aumento significativo no consumo de plantas medicinais em nível mundial (DE SMET, 2005). Atualmente no Brasil, programas oficiais de saúde têm incentivado a exploração e/ou a produção sustentada de espécies medicinais, que vem sendo gradativamente implementados por muitos governos estaduais e municipais (BRASIL, 2010; LOURENZANI; LOURENZANI; BATALHA, 2004).

De forma paralela a este crescente uso de plantas medicinais também são requeridos procedimentos de controle de qualidade da matéria-prima acompanhando desde o plantio até o produto final, pois o metabolismo de plantas pode variar consideravelmente dependendo de diversos fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Portanto, os processos de normalização são requisitos fundamentais para garantir um nível consistente e adequado de substâncias ativas que garanta a eficácia e qualidade do produto, uma vez que diferentes condições de processamento podem levar a produtos com qualidades distintas (BAUER, 1998). Esta não é uma tarefa fácil considerando a grande variedade de componentes presentes com diferentes características físico-químicas em plantas, ao contrário dos fármacos sintéticos (BAUER, 1998; LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011).

Este capítulo apresenta uma comparação química das diferentes partes aéreas (folha, pericarpo, polpa, semente) de *P. alata* por CCD; CLAE-DAD e no teor de fenólicos totais.

## **4.2 Objetivo**

### **4.2.1 Objetivo geral**

Avaliar o perfil químico das folhas e frutos (pericarpo, polpa, semente) de *P. alata* por CCD e CLAE-DAD e quantificar o teor de fenólicos totais.

### **4.2.2 Objetivo específico**

Desenvolver um método por CCD e CLAE para a análise qualitativa de flavonóides em folhas e frutos de *P. alata*.

Avaliar o teor de fenólicos totais das folhas e frutos de *P. alata* por espectrofotometria UV/VIS.

## 4.3 Revisão da literatura

### 4.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui ampla diversidade de estruturas simples ou complexas, e que possuem pelo menos um anel aromático substituído por um grupamento hidroxila. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário são encontradas estruturas variadas como os ácidos fenólicos, as cumarinas, as ligninas, os taninos e os flavonóides (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

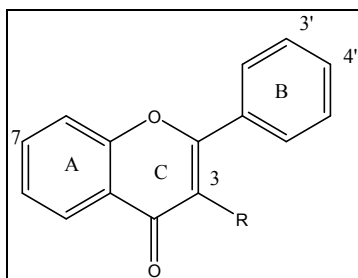
Muitos estudos têm descrito que a ingestão de alimentos ricos em fenólicos é capaz de inibir o estresse oxidativo devido a sua capacidade de seqüestrar os radicais livres e, dessa forma, prevenir o aparecimento de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes entre outras (HAVSTEEN, 2002; MANACH et al., 2004; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Dentre os polifenóis isolados relatados para *P. alata* há uma predominância de flavonóides, especialmente do tipo C-glicosilados (DOYAMA et al., 2005; MÜLLER et al., 2005; OGA et al., 1984; ULUBELEN et al., 1982).

Embora existam na literatura trabalhos que descrevam o teor de fenólicos totais em espécies de *Passiflora* (OGA et al., 1984; PETRY; REGINATTO, 2001; RUDNICKI et al., 2007a), pode-se constatar que todos são relacionados às folhas de *P. alata*, mas nenhum que relate o teor desses compostos nos frutos desta espécie.

Rudnick et al. (2007a) analisaram o teor de fenólicos totais de extratos hidroalcoolicos de *P. edulis* e *P. alata* correlacionando esses teores com as propriedades antioxidante e capacidade de antiglicação dos extratos dessas espécies. Os autores encontraram uma relação linear entre o conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante em ambos os extratos, sugerindo que os compostos fenólicos sejam os responsáveis pela atividade antioxidante.

### 4.3.2 Flavonóides

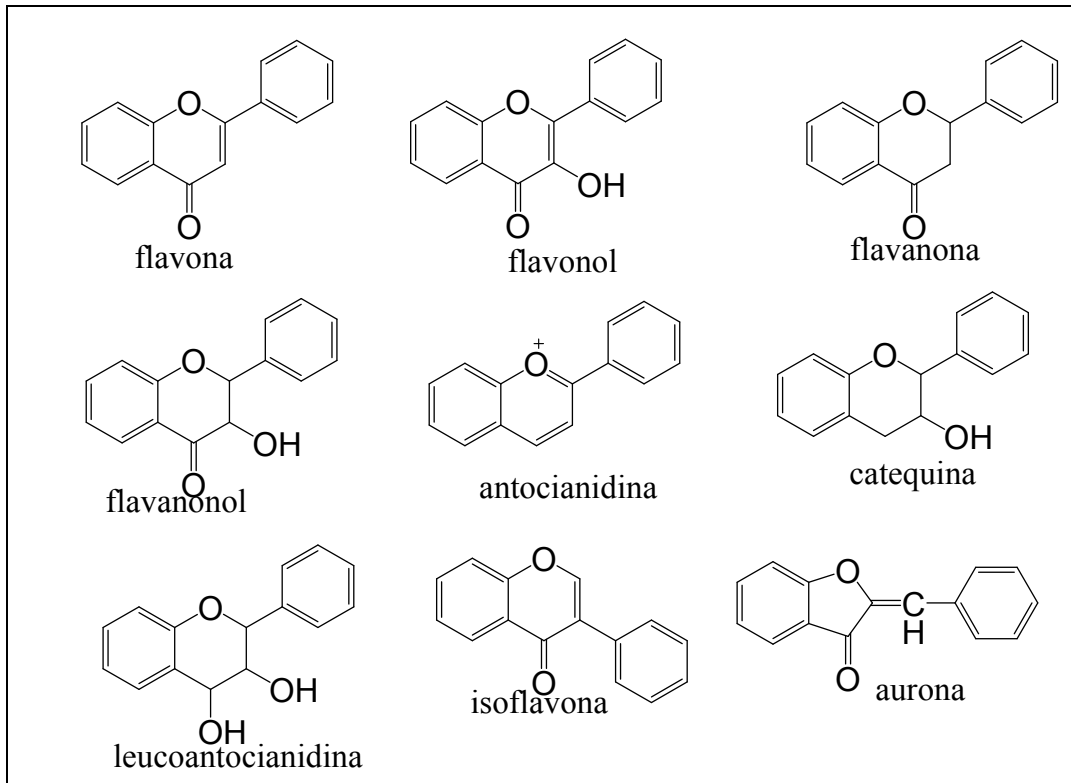
Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, derivados de fenilbenzopironas, formados pela união de três anéis (A, B, C), sendo dois deles aromáticos (Figura 3). Apresentam uma grande variedade de estruturas básicas que dão lugar a uma série de compostos que diferem em seu grau de oxidação e substituição (Figura 4).



**Figura 3:** Núcleo fundamental dos flavonóides

As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações nos núcleos (especialmente a saturação do heterociclo pirônico), e pelo grau de metilação e glicosilação, as quais afetam várias propriedades dos flavonóides, particularmente a hidrofobicidade das moléculas. Dentro dos grupos flavona e flavonol, os compostos mais facilmente encontrados são aqueles com hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B e, em menor extensão, aqueles com apenas uma hidroxilação na posição 4'. O sítio de glicosilação preferido dos flavonóides é a posição 3 e, com menor freqüência, a posição 7 (Figura 3). A glicose é o carboidrato mais usual, mas outros resíduos de açúcares também podem ser encontrados, como xilose, galactose e ramnose (SILVA; NUNES; FREIRE, 2001; WILHELM FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).





**Figura 4:** Diferentes classes de flavonóides

A maior ênfase no estudo das atividades biológicas dos flavonóides teve lugar nos últimos anos como consequência da necessidade de entender a interação que estes compostos apresentam com as células e tecidos dos mamíferos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007), em virtude da ampla gama de atividades biológicas relatadas, tais como antitumoral, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, e também na doença de Alzheimer (ZHAO et al., 2009).

Considerando que *P. alata*, espécie de interesse nesse trabalho, possui como constituintes majoritários flavonóides (DOYAMA et al., 2005; OGA et al., 1984; PEREIRA et al., 2004) e saponinas (BIRK et al., 2005; REGINATTO et al., 2001), e pelo fato dos flavonóides apresentarem maior facilidade de detecção por CLAE quando comparados aos compostos terpênicos e possuírem padrões comerciais disponíveis, o presente capítulo avaliou o perfil flavonoídico das diferentes partes aéreas (folha, pericarpo, polpa, semente) de *P. alata* por CLAE-DAD, CCD e teor de fenólicos totais.

## 4.4 Metodologia

### 4.4.1 Materiais e Métodos

#### 4.4.1.1 *Material vegetal*

Partes aéreas de *P. alata* foram coletadas no município de Urussanga/SC, em maio de 2010 e identificadas pelo Agrônomo Ademar Brancher (EPAGRI/Urussanga-SC). Material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR: 37823). Após a coleta e identificação, as folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante sob temperatura não superior a 40°C por sete dias, moídas em moinho de facas e armazenadas à temperatura ambiente até a preparação dos extratos.

Os frutos foram adquiridos na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) em novembro de 2009, provindos da Fazenda ITAMARATY. A partir destes, o pericarpo, a polpa e a semente foram separados e armazenados a -20°C até a preparação dos respectivos extratos.

#### 4.4.1.2. *Preparo e fracionamento dos extratos (P. alata)*

As folhas (FO) (Figura 5A) foram secas, trituradas e posteriormente extraídas por decocção ( $\pm 90^\circ\text{C}$ ) com EtOH 40°GL por 10 minutos, com relação droga:solvente 1:10 (m:v). O pericarpo (PE) *in-natura* (Figura 5B) foi submetido à extração por decocção com etanol 40°GL por 10 minutos, com relação droga:solvente 1:3 (m:v). Após arrefecimento, os extratos foram filtrados, o solvente eliminado sob pressão reduzida (evaporador rotatório) e particionados com solventes de polaridade crescente (AcOEt e *n*-BuOH).

A polpa (PO), a semente (SE) e o mesocarpo foram separados por filtração. A seguir, a polpa foi particionada *in-natura* com *n*- BuOH. Já as sementes foram trituradas em liquidificador, lavadas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1; m/v), e posteriormente extraídas com EtOH 40°GL por sete dias. O extrato obtido foi filtrado, o solvente eliminado sob pressão reduzida (evaporador rotatório) e particionado com solventes de polaridade crescente (AcOEt e *n*- BuOH).



Figura 5: Folhas (5A) e frutos (5B) de *P. alata* Foto: F.A. Madoglio

#### **4.4.1.3 Determinação dos teores de fenólicos totais de folhas e frutos de *P. alata* por UV/VIS**

A avaliação do teor de compostos fenólicos totais das diferentes partes aéreas de *P. alata* foi conduzida segundo procedimento descrito por Singleton et al. (1999). A 100 µL das amostras (1 mg/mL) foi adicionado 100 µL do reagente Folin Ciocalteu e 200 µL de carbonato de sódio<sup>1</sup> (25%, m/v). Essa solução foi homogeneizada e diluída com água destilada para um volume final de 2 mL. Após 2h sob abrigo da luz, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/VIS (PerkinElmer®, Lambda 25 UV/VIS) a 726 nm. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (EAG) em g/100 g de extrato seco. Todas as análises foram realizadas em triplicata

#### **4.4.2 Análise estatística**

Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de pós teste Newman-Keuls (SNK), utilizando o programa GraphPad Prism® (versão 5,00) (MackievTM), e as significâncias estatísticas foram avaliadas em relação a média ± D.P. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativo.

#### **4.4.3 Análise cromatográfica dos flavonóides das diferentes partes aéreas de *P. alata***

##### **4.4.3.1 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)**

O extrato seco obtido a partir das folhas secas e dos frutos *in-natura* de *P. alata* e suas diferentes frações foram analisados por CCD. Os cromatogramas foram obtidos empregando-se como fase estacionária gel de sílica F<sub>254</sub>, e como

---

<sup>1</sup> Preparo da solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 25 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Vetec®) foram pesados, dissolvidos em 100 mL de água destilada e a solução foi estocada a 4°C ate o uso.

fase móvel AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v) ou *n*-BuOH:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (12:5:7, v/v). Como agentes de detecção foram empregados Reagente Natural (RN)<sup>2</sup> e anisaldeído-sulfúrico/ aquecimento (AS)<sup>3</sup>.

#### **4.4.3.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD)**

As análises cromatográficas por CLAE/DAD foram realizadas em equipamento Perkin Elmer Series 200 empregando coluna C18 Brownlee Analytical Perkin-Elmer® (150 x 4,6 mm d. i., 5 µm), fase móvel constituída de Acetonitrila (A) e Ácido acético 1% em água (B) em um sistema gradiente; 0-30 minutos, 5-20% de A em B e de 30-40 minutos isocrático 20% A em B. A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada por sonicção antes da utilização. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e o volume de injeção de 10 µL. A detecção foi realizada a 340 nm e os espectros de UV obtidos na faixa de 700 – 200 nm. Como substâncias de referência foram utilizadas isorientina isovitexina, orientina, rutina, vitexina e vitexina-2"-O-ramnosídeo. Todos os extratos foram analisados na concentração de 5 mg/mL e todas as análises foram realizadas em triplicata.

---

<sup>2</sup> RN: Reagente Natural (difenilboriloxetilamina 1% em metanol)

<sup>3</sup> AS: Anisaldeído Sulfúrico (0,5 mL de 4-aldeído anísico, 25 mL de ácido acético, 25 mL de etanol, 1 mL de ácido sulfúrico).

## 4.5 Resultados e discussão

### 4.5.1 Rendimento

O rendimento dos extratos após extração por decocção e o das frações após a partição com solventes de polaridade crescente foi avaliado. A tabela 1 discrimina os rendimentos dos extratos e das frações obtidas.

**Tabela 1:** Rendimento do extrato hidroetanólico das diferentes partes de *P. alata* e suas frações

		<b>Rendimento</b>	<b>Percentual*</b>
<b>folhas</b>	Extrato hidroetanólico	23,3 g	23,30%
	Fração AcOEt	2,49 g	2,49%
	Fração <i>n</i> -BuOH	10,35 g	10,35%
	Fração Residual H <sub>2</sub> O	84,85 g	84,85%
<b>pericarpo</b>	Extrato hidroetanólico	5,5088 g	1,10%
	Fração AcOEt	0,0180 g	0,0036%
	Fração <i>n</i> -BuOH	0,6197 g	0,12%
	Fração Residual H <sub>2</sub> O	4,8707 g	0,97%
<b>polpa</b>	Fração <i>n</i> -BuOH	18,0422 g	12,18%
	Fração Residual H <sub>2</sub> O	130,0748 g	87,82%
<b>sementes</b>	Extrato hidroetanólico	9,839 g	11,8%
	Fração AcOEt	0,231 g	0,27%
	Fração <i>n</i> -BuOH	0,422 g	0,50%
	Fração Residual H <sub>2</sub> O	9,1857	11,02%

\*Percentual das folhas foi calculado em relação aos 100 g de planta seca; do pericarpo em relação aos 500 g de fruto *in-natura*; da polpa em relação aos 2 L de polpa *in natura* que seco rendeu 148,117 g essa quantidade foi considerada 100%; da semente em relação à 83,33 g de semente *in-natura*

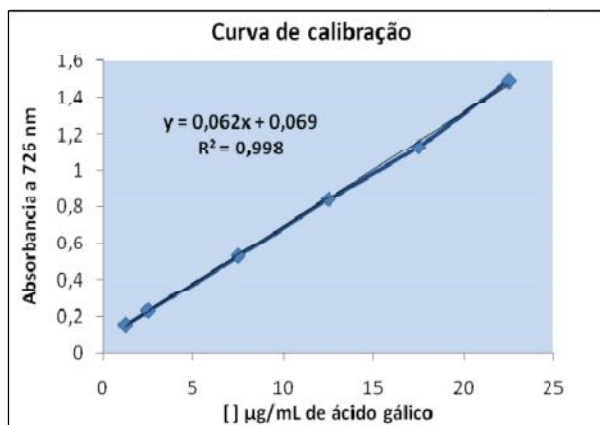
A extração por decocto do pericarpo não foi realizada na proporção de 1:10, m/v devido ao grande volume de solvente que deveria ser usado se considerada a massa do pericarpo. Na

proporção de 1:3 m/v obteve-se um bom resultado, considerando também o grande volume de água contido no fruto fresco (74%).

#### 4.5.2 Compostos fenólicos totais

A avaliação do teor de fenólicos totais presentes no extrato e frações resultantes do processo de fracionamento de *P. alata* foi conduzida, segundo procedimentos descritos por Singleton et al. (1999). O ensaio para determinação do teor de fenólicos totais baseia-se na redução do íon fosfomolibdato do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma<sup>®</sup>) pelo íon fenolato da amostra, formando compostos cromógenos, que podem ser detectados espectrofotometricamente.

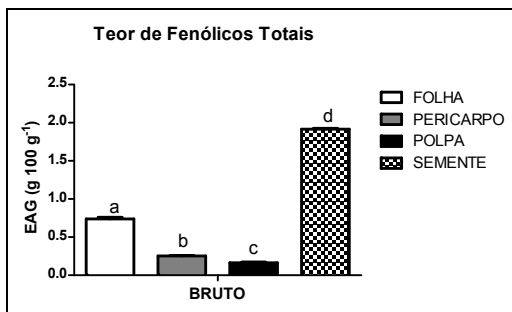
Os materiais-teste analisados foram o extrato hidroetanólico das diferentes partes aéreas, obtido por decocção e suas respectivas frações (AcOEt, *n*-BuOH, R. H<sub>2</sub>O). Para esta quantificação foi construída uma curva analítica com ácido gálico em seis concentrações (1,25; 2,5; 7,5; 12,5; 17,5; 22,5 µg/mL), a qual foi expressa pela equação ( $y=0,062x+0,069$ ;  $R^2=0,998$ ), representada na figura 6.



**Figura 6:** Curva de calibração do ácido gálico. A leitura foi realizada a 726 nm e cada ponto representa a média de três leituras de cada concentração.

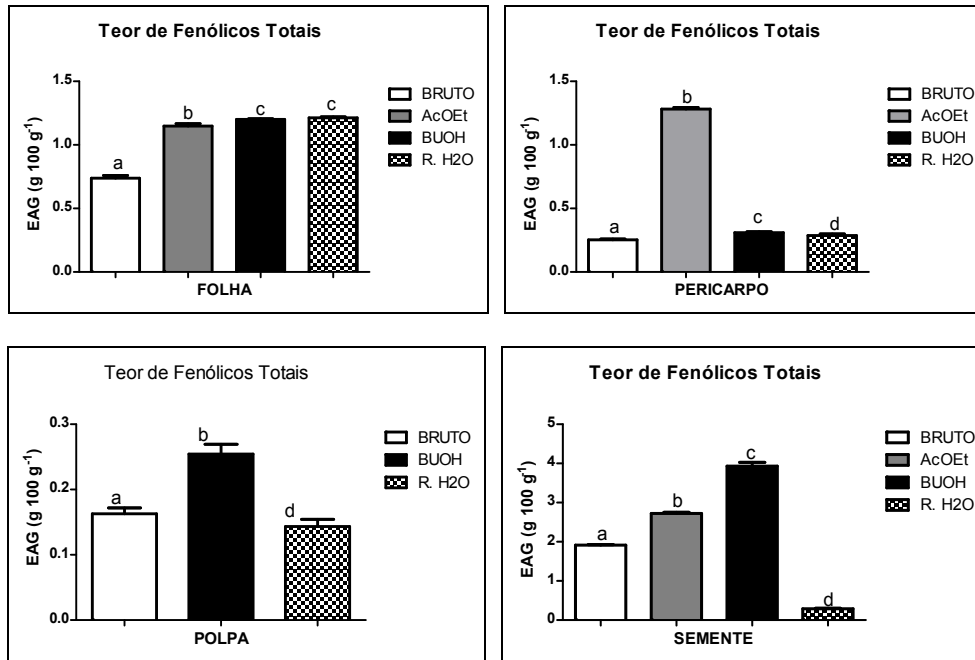


O teor de compostos fenólicos totais do extrato bruto das diferentes partes de *P. alata* está apresentado na figura 7, sendo o teor encontrado na semente duas vezes maior que o teor de fenólicos encontrados nas folhas.



**Figura 7:** Teor de fenólicos totais dos extratos hidroalcoolicos de diferentes partes aéreas de *P. alata*. Os dados são média  $\pm$  desvio padrão, expressos em g de EAG/100 g de extrato seco ( $n=3$ ). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA /SNK  $p<0,05$ ) dentro de cada fração das partições avaliadas.

Os teores de fenólicos totais das frações estão apresentados na Figura 8. Das frações avaliadas os maiores teores detectados foram na fração *n*-BuOH das sementes de *P. alata* (3,93 g EAG/ 100 g de extrato), sendo este um teor três vezes superior ao detectado para as folhas (1,20 g EAG/ 100 g de extrato). Já para o pericarpo os maiores teores de fenólicos totais foram detectados na fração AcOEt com valores próximos a 1,5 g EAG/100 g de extrato.

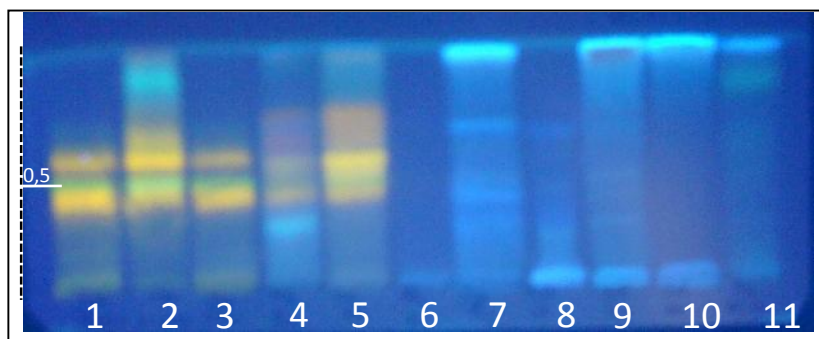


**Figura 8:** Teor de fenólicos totais em extratos hidroalcoolicos e frações de diferentes partes aéreas de *P. alata*. Os dados são média  $\pm$  desvio padrão, expressos em g de EAG/100 g de extrato seco ( $n=3$ ). Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas (ANOVA /SNK  $p<0,05$ ) dentro de cada parte da planta avaliada.

Considerando que Rudnicki et al. (2007a) relacionaram o maior potencial antioxidante do extrato das folhas de *P. alata* ao alto teor de compostos fenólicos, os dados aqui apresentados sugerem que o extrato e as frações das sementes de *P. alata* sejam avaliados quanto ao seu potencial antioxidante, principalmente se considerarmos que as sementes, em muitos casos, são considerados resíduos de processos tecnológicos do maracujá-doce.

#### 4.5.3 Perfil químico das diferentes partes aéreas de *P. alata* por cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise por CCD dos extratos etanólicos das folhas e frutos de *P. alata*, e das diferentes frações obtidas, apresentaram diferenças quanto aos seus perfis cromatográficos como mostram as figuras 9 e 10, respectivamente.



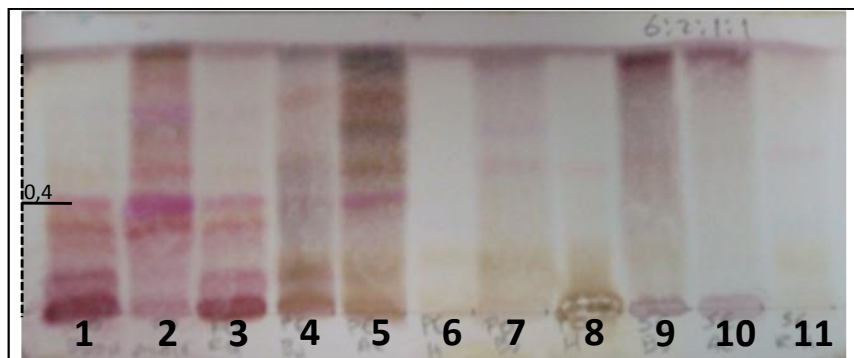
**Figura 9:** Comparação cromatográfica por CCD do extrato etanólico e de suas frações obtidas de diferentes partes de *P. alata*. Eluente: AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v). Detecção: Reagente Natural (RN). Amostras:

- |                                     |                                     |                                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Folha Fração BuOH                | 5. Pericarpo Fração AcOEt           | 9. Semente Fração BuOH          |
| 2. Folha Fração AcOEt               | 6. Pericarpo R. H <sub>2</sub> O    | 10. Semente Fração AcOEt        |
| 3. Folha Fração R. H <sub>2</sub> O | 7. Polpa Fração BuOH                | 11. Semente R. H <sub>2</sub> O |
| 4. Pericarpo Fração BuOH            | 8. Polpa Fração R. H <sub>2</sub> O |                                 |

As frações *n*-BuOH e AcOEt das folhas comparadas às mesmas frações do pericarpo apresentaram compostos de mesma coloração e fator de retenção (Rf) (0,4; 0,5 e 0,6) quando

revelados com RN (Figura 9). Por meio de comparação com valores de R<sub>f</sub>s obtidos, somente a vitexina-2''-O-ramnosídeo (R<sub>f</sub>:0,5) apresentou valor de R<sub>f</sub> semelhante a compostos presentes na fração *n*-BuOH do pericarpo. Pode-se observar também que as diferentes partes de *P. alata*, após nebulização com RN, apresentam um perfil químico distinto, sendo as folhas (representadas pelos números 1, 2 e 3) e o pericarpo (4, 5 e 6) ricos em compostos flavonoídicos. A polpa (7 e 8) e a semente (9, 10 e 11) apresentaram, aparentemente, uma menor variedade desses compostos além de possuírem perfis distintos da folha e do pericarpo.

O perfil cromatográfico das diferentes frações, de diferentes partes de *P. alata*, apresentou-se distinto ao serem revelados com AS. Pode-se observar que os compostos mais polares permaneceram nas frações *n*-BuOH, sendo a fração AcOEt mais rica em compostos de menor polaridade (Figura 10).



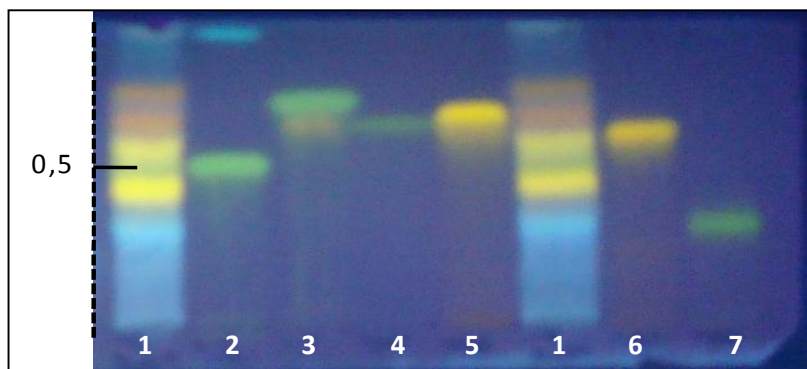
**Figura 10:** Comparação cromatográfica por CCD do extrato etanólico e de suas frações obtidos de diferentes partes de *P. alata*. Eluente: AcOEt:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v). Detecção: Anisaldeído sulfúrico e aquecimento. Amostras:

- |                                     |                                     |                                 |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Folha Fração BuOH                | 5. Pericarpo Fração AcOEt           | 9. Semente Fração BuOH          |
| 2. Folha Fração AcOEt               | 6. Pericarpo R. H <sub>2</sub> O    | 10. Semente Fração AcOEt        |
| 3. Folha Fração R. H <sub>2</sub> O | 7. Polpa Fração BuOH                | 11. Semente R. H <sub>2</sub> O |
| 4. Pericarpo Fração BuOH            | 8. Polpa Fração R. H <sub>2</sub> O |                                 |

As frações quando reveladas com AS indicaram a presença de triterpenos e saponinas, assinalados pela reação de coloração (rósea) típica frente ao agente cromogênico

empregado, estando essas substâncias mais acentuadas nas frações *n*-BuOH e/ou AcOEt das folhas e do pericarpo (Rf: 0,4).

No intuito de identificar esses compostos, a fração *n*-BuOH do pericarpo foi cromatografada com substâncias de referência (flavonóides) previamente descritas para as folhas (DOYAMA et al., 2005; LANGASSNER, 2010; MÜLLER et al., 2005) e com outros padrões de flavonóides disponíveis no laboratório (Figura 11).



**Figura 11:** Cromatografia em camada delgada sob gel de sílica da fração *n*-BuOH do pericarpo de *P. alata* e comparação com amostras autênticas. Fase móvel: AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v). Detecção: Reagente Natural. Amostras:

- |                                       |                 |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. Pericarpo Fração BuOH              | 5. orientina    |
| 2. vitexina-2''- <i>O</i> -rmanosideo | 6. isoorientina |
| 3. vitexina                           | 7. vicenina-2   |
| 4. isovitexina                        |                 |

Embora tenham sido testados diversos sistemas cromatográficos, o uso da CCD não foi eficiente para avaliar as frações da polpa e da semente, pois ambas apresentaram uma menor variedade e intensidade de compostos.

#### 4.5.4 Perfil químico por CLAE-DAD das diferentes partes aéreas de *P. alata*

A análise qualitativa do conteúdo de flavonóides glicosilados em extratos de espécies de *Passiflora* foi realizada por comparação dos tempos de retenção (tr), dos espectros de UV das amostras comparadas com substâncias autênticas e por co-injeção com padrões. O sistema de fase móvel mais apropriado para avaliar as diferentes partes de *P. alata* foi composto de acetonitrila (solvente A) e uma solução de ácido acético 1% (solvente B) (eluição gradiente).

Seis flavonóides foram utilizados como amostras autênticas e seus respectivos tr estão apresentados na tabela 2. O perfil cromatográfico relativo aos flavonóides das amostras variaram, desde uma composição simples, com apenas um composto como no extrato da semente (SE-BuOH), até uma composição complexa, com mais de dez compostos, como visto nos extratos do pericarpo (PE-BuOH). Os flavonóides glicosilados investigados nas diferentes partes aéreas de *P. alata* estão apresentados na figura 12 e na tabela 2.

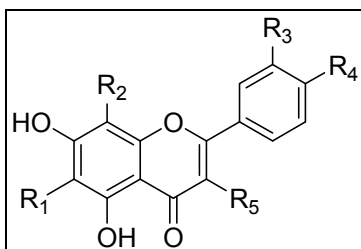


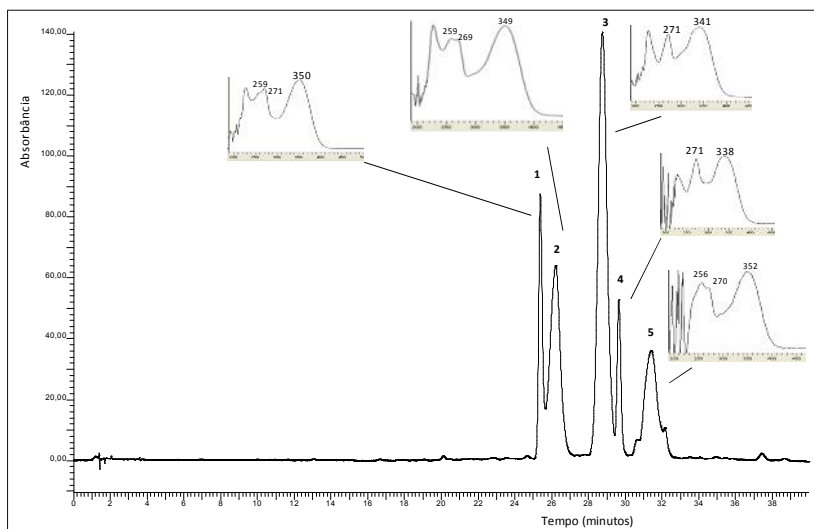
Figura 12: Núcleo fundamental dos flavonóides

**Tabela 2:** Estrutura química e tempo de retenção (tr) de flavonóides utilizados como amostras autênticas.

<b>Amostras</b>							
<b>autênticas</b>	<b>tr (min)</b>	<b>Aglicona</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
isoorientina (1)	25,3	luteolina	gli	H	OH	OH	H
orientina (2)	26,3	luteolina	H	gli	OH	OH	H
VIT-R* (3)	28,7	apigenina	H	gli-O-ramn	H	OH	H
isovitexina (4)	29,7	apigenina	glu	H	H	OH	H
rutina (6)	29,7	quercetina	H	H	OH	OH	O-ramn-gli
vitexina (11)	29,3	apigenina	H	gli	H	OH	H

gli= glicose, ramn= ramnose, \*vitexina-2"-O-ramnosideo

Na fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata* o pico 3 (tr=28,7 min) é o majoritário (Figura 13) e pode ser identificado como vitexina-2''-O-ramnosideo por comparação dos tempos e retenção, co-injeção com amostra autêntica e pelo perfil no UV (similar aos derivados de apigenina). Adicionalmente foram identificados, por meio dos mesmos parâmetros descritos acima, os picos 1, 2 e 4 como sendo isorientina, orientina e isovitexina respectivamente.



**Figura 13:** Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2).

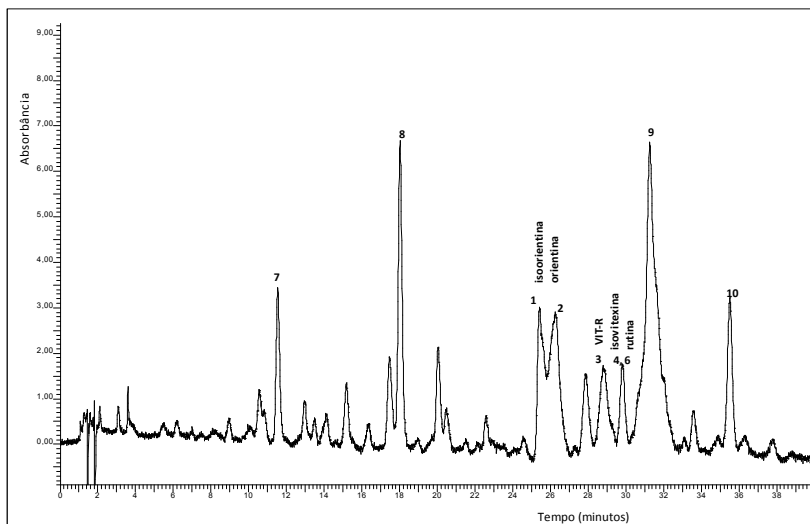
Todos esses flavonóides já foram previamente descritos para as folhas de *P. alata* (DOYAMA et al., 2005; OGA et al., 1984; ULUBELEN et al., 1982). Por outro lado, o composto 5 (pico 5, tr:31,4 min) não pode ser identificado, mas mostrou  $\lambda_{\text{max}}$ : 352, 270, 256 absorção UV semelhante aos derivados de luteolina.

No método que apresentou melhor resolução para as diferentes partes de *P. alata*, isovitexina e rutina apresentaram o mesmo tr, fato comprovado pelo espectro de UV/DAD. Nas folhas, essas substâncias foram facilmente diferenciadas, por comparação sob luz UV (365 nm), pois a isovitexina possui



núcleo tipo apigenina (flavona) e a rutina possui núcleo flavonol, o que gera coloração distinta sob luz UV.

Como os flavonóides no pericarpo (Figura 14) estão em concentrações inadequadas para visualização de seus espectros de UV, esses foram caracterizados somente por tr e por co-injeção. Dessa forma, não foi possível afirmar se o pico com tr: 29,7 trata-se da isovitexina ou da rutina ou de co-eluição de ambas as substâncias. Nessa mesma linha de raciocínio não foi possível identificar, com as estratégias utilizadas, os compostos majoritários, no pericarpo, descritos como 7, 8, 9, 10 com tr: 11,5; 18,0; 31,2; 35,5 min respectivamente.

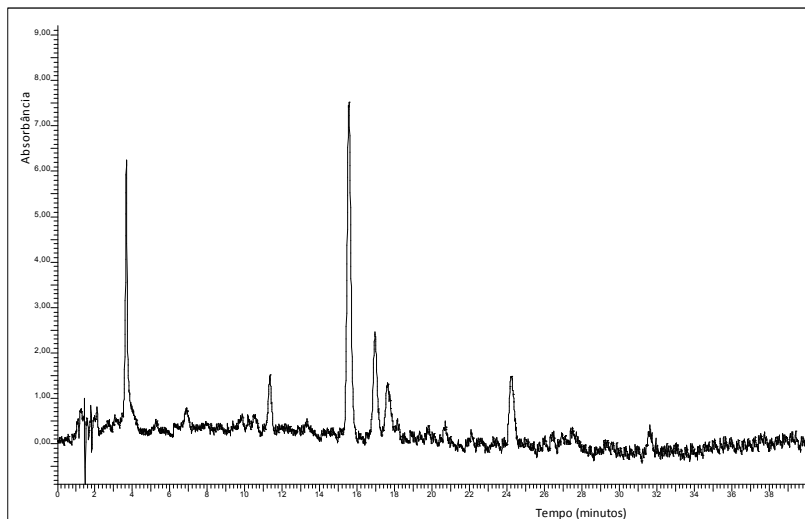


**Figura 14:** Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH do pericarpo de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2).

De todas as partes aéreas de *P. alata* avaliadas o pericarpo apresentou a maior variedade de flavonóides, sendo detectadas substâncias com o mesmo tr dos compostos 1, 2, 3 e 4, sendo eles respectivamente isoorientina, orientina, VIT-R e isovitexina.

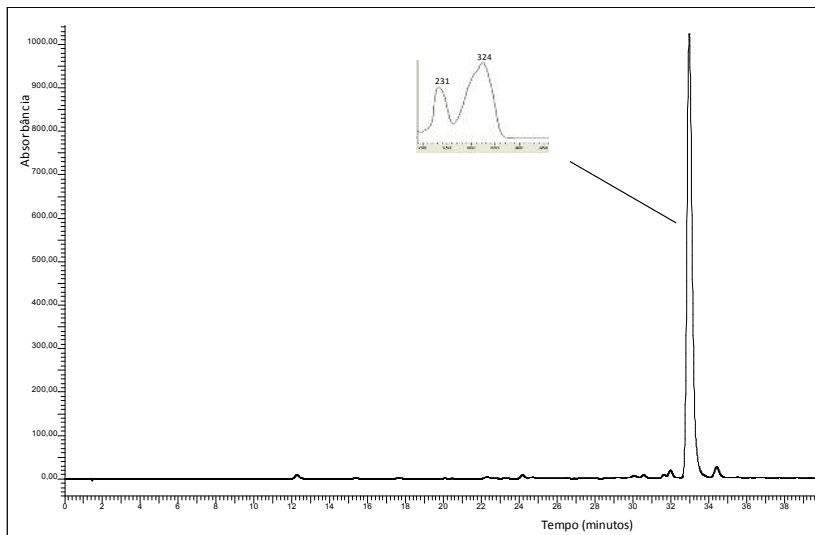
Na polpa foram detectados compostos com absorção em 340 nm (Figura 15), porém, em virtude desses compostos estar em baixa concentração, não foi possível avaliar o espectro de UV

dos mesmos. Pode-se observar também que as substâncias majoritárias presentes na polpa não estão presentes nas outras partes avaliadas, pois as substâncias majoritárias da polpa possuem caráter mais polar que os compostos majoritários da folha (VIT-R), do pericarpo e da semente, sugerindo que estes compostos possam ser flavonóides diglicosilados e/ou triglicosilados.



**Figura 15:** Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH da polpa de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2).

A fração *n*-BuOH da semente mostrou-se instigante, visto que é possível observar somente um composto fenólico, ainda não identificado, mas que apresentou valores de absorção no UV semelhantes aos derivados cafeoilquínicos (Figura 16, tr 32,5 min).



**Figura 16:** Cromatograma por CLAE da fração *n*-BuOH da semente de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas item 4.4.3.2).

## 4.6 Conclusão

As partes aéreas de *P. alata* avaliadas por CLAE-DAD indicaram que o pericarpo apresentou a maior variedade de flavonóides, estando presentes os flavonóides descritos para as folhas (isoorientina, orientina, vitexina-2"-O-ramnosideo, isovitexina), embora em concentrações inferiores. Pode-se observar também que o flavonóide majoritário das folhas (vitexina-2"-O-ramnosideo) não é o composto majoritário detectado nas outras partes investigadas.

A fração *n*-BuOH da semente apresentou um composto majoritário com perfil UV característico de derivado cafeoilquínico, composto esse que está em processo de isolamento. Das partes aéreas avaliadas a semente foi a que apresentou maior teor de fenólicos.

## 4.7 Referências

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: Can acceptable drug standards be achieved? **Drug Information Journal**. v. 32, n. 1, p. 101-110, 1998.

BIRK, C. D.; PROVENSI, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 28, n. 14, p. 2285-2291, 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde - PNPIC**.

Disponível em:

<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em:

20 de ago de 2010.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2004. v.5.

DE SMET, P. A. G. M. Herbal medicine in Europe - Relaxing regulatory standards. **New England Journal of Medicine**. v. 352, n. 12, p. 1176-1178, 2005.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, p. 374, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

LANGASSNER, S. M. Z. **Avaliação da Composição Química e Atividades Farmacológicas de Espécies de Passiflora** (Doutorado em Farmácia). 2010. 131 p. Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2010.

- LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**. v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.
- LOURENZANI, A.; LOURENZANI, W. L.; BATALHA, M. O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**. v. 34, n. 3, p. 15-25, 2004.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, n. 5, p. 727, 2004.
- MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.
- MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007, p.183-208.
- OGA, S.; DE FREITAS, P. C. D.; DA SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**. v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.
- PETRY, R. D.; REGINATTO, F. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 162-164, 2001.
- REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEF, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**. v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; VEIGA PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; FONSECA MOREIRA, J. C. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**. v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.

SILVA, B. T. F.; NUNES, S.; FREIRE, S. M. F. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracujá amarelo). **Caderno de Pesquisa**. v. 12, p. 28-37, 2001.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**. v. 45, n. 6, p. 783-783, 1982.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p.317-334.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Passion fruit: A functional food? **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZHAO, S.; GUO, Y. X.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. Lectins but not antifungal proteins exhibit anti-nematode activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 28, n. 2, p. 265-268, 2009.





---

---

**5. CAPÍTULO III: Flavonóide glicosilado isolado do pericarpo (FAM 12) e saponina isolada das folhas (R9) de *Passiflora alata* Curtis**

---

---



## 5.1 Introdução

Até meados da década de 60, os estudos fitoquímicos sobre *Passiflora* enfatizavam a investigação dos alcalóides indólicos do tipo harmano e sua ação no Sistema Nervoso Central (SNC) (PEREIRA; VILEGAS, 2000). Contudo, recentemente os estudos direcionaram-se aos compostos de natureza flavonoídica (PEREIRA; VILEGAS, 2000), especificamente aos flavonóides do tipo C-glicosídeo (DOYAMA et al., 2005; PETRY; REGINATTO, 2001; SENA et al., 2009). Entre os flavonóides relatados para as folhas de *P. alata* temos a 2''xilossil-vitexina, vitexina, isovitexina, orientina, rutina, isoorientina, vitexina-2''O-ramnosídeo, escoparina-2''O-ramnosídeo, orientina-2''O-ramnosídeo (DOYAMA et al., 2005; ULUBELEN et al., 1982).

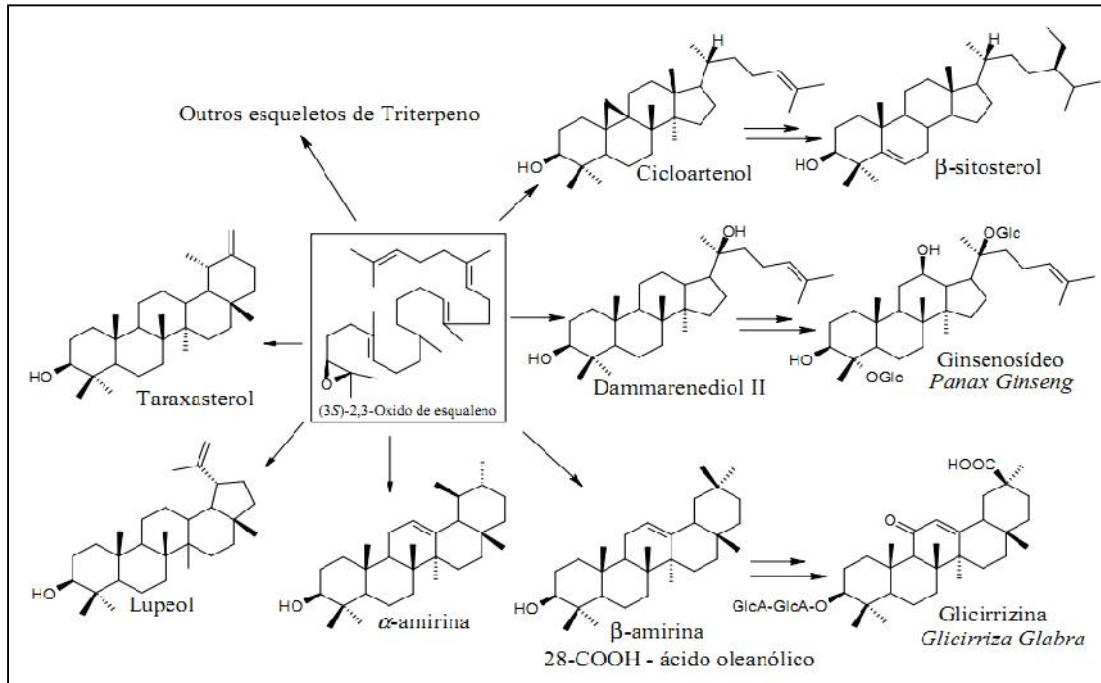
Outro tipo de metabólito investigado para o gênero são as saponinas (DOYAMA et al., 2005; ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985; REGINATTO et al., 2001; YOSHIKAWA et al., 2000a; ZUCOLOTTI; PALERMO; SCHENKEL, 2006). Para as saponinas, são descritos cinco compostos para as folhas da espécie, sendo o majoritário deles o quadrangulosídeo (REGINATTO et al., 2004) saponina de núcleo ciclolanostano.

As saponinas são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem uma das mais importantes classes de produtos naturais produzidos pelas plantas. Quimicamente são compostos de alto peso molecular (cerca de 700-1500 DA), formados por núcleo triterpênico ou esteroidal chamado de aglicona e açúcares ligados a essa (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2004; TAKETA, 1997).

As saponinas podem ser classificadas de acordo com a estrutura molecular de sua aglicona, sendo denominadas triterpênicas quando a aglicona apresenta 30 átomos de carbono, ou de saponinas esteroidais quando a aglicona possuir menos de 30 átomos de carbono. De acordo com a porção glicídica as saponinas podem ser classificadas quanto ao número dessas cadeias, sendo as mais comumente encontradas as monodesmosídicas (apenas um açúcar ou uma cadeia desses), e as bidesmosídicas (dois açúcares ou cadeia desses ligados a

carbonos diferentes na aglicona (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Os triterpenos, sapogeninas das saponinas triterpênicas, constituem um dos grupos mais importantes dos terpenóides. São conhecidos ao menos 200 esqueletos diferentes desses compostos, advindos de produtos naturais ou de reações enzimáticas características da ciclização do esqualeno ou de seu óxido. Os caminhos biossintéticos que conduzem à formação dos esteróides e triterpenos são completamente idênticos até a formação do 2,3-oxiesqualeno (Figura 17). A partir daí a rota torna-se diversificada em sua etapa de ciclização, sendo a diversidade estrutural dos triterpenos gerada nesta etapa (Figura 17) (SHIBUYA et al., 1999; XU; FAZIO; MATSUDA, 2004).



**Figura 17:** Ciclização do 2,3-óxido de esqualeno e alguns exemplos de triterpenos e saponinas de plantas (SHIBUYA et al., 1999).

Por séculos preparações contendo saponinas têm sido empregadas no tratamento de diversas enfermidades. Muitos estudos tem descrito diversas propriedades farmacológicas para saponinas, dentre elas se destacam as atividades antiinflamatória, hemolítica, antimicrobiana e antitumoral (MAN et al., 2010; MANDAL; SINHA BABU; MANDAL, 2005; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; SMALL; JURZYSTA; NOZZOLILLO, 1990). Mais recentemente algumas classes de saponinas têm sido utilizadas como adjuvantes em vacinas (ZAKAY-RONES, 2010). Especificamente para as saponinas descritas para *P. alata* não há relatos de estudos de atividade farmacológica.

## 5.2 Objetivo

O presente capítulo teve por objetivo o isolamento e a elucidação estrutural de flavonóides e saponinas dos frutos e folhas de *P. alata*.

## 5.3 Procedimentos gerais

### 5.3.1 Cromatografia em camada delgada

Para os procedimentos cromatográficos foram utilizados solventes grau p.a. de procedências variadas. Para as análises por CCD foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck® e Macherey-Nagel®.

A detecção dos compostos foi realizada mediante observação dos cromatogramas sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 366 nm e visualizadas com Reagente Natural A (RN) como reagente cromogênico para detecção de flavonóides e compostos fenólicos, e anisaldeído-sulfúrico (AS) para detecção de terpenóides/saponinas (WAGNER; BLADT, 1996).

### 5.3.2 Cromatografia em coluna

Como fase estacionária foram utilizadas sílica gel 60 de procedência Merck®, com as granulometrias de 63-200 µm e de 40-60 µm, sílica gel RP-18 de procedência EMD® (40-60 µm) e gel de permeação molecular Sephadex® LH-20 de procedência GE Healthcare®.

### 5.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises cromatográficas por CLAE/DAD foram realizadas empregando coluna C18 Brownlee Analytical Perkin-Elmer®, fase móvel constituída de Acetonitrila (A) e Ácido acético

1% (B) em um sistema gradiente. A detecção foi realizada a 340 nm (procedimentos descritos no item 4.4.3.2 capítulo 2).

## 5.4 Análise Estrutural

Para elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia no ultravioleta além de espectrometria de massas.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados em equipamentos Varian AS-400 MHz (400 e 100 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  respectivamente) no Depto de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, espectrômetro Bruker Avance 400 (400 e 100 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  respectivamente) em colaboração com a Faculté de Pharmacie (UPJV) Amiens, França, e espectrômetro Bruker AM 500 (500 e 125 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  respectivamente) em parceria com a Universidade de Buenos Aires, Argentina.

Os espectros de massas de alta resolução com fotoionização a pressão atmosférica (APPI) foram obtidos em espectrômetro Bruker MicrOTOF-Q II em modo positivo (Universidade de Buenos Aires, Argentina).

## 5.5 Material Vegetal

Partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis foram coletadas no município de Urussanga/SC, em maio de 2010. Após a coleta e identificação, as folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante sob temperatura não superior a 40°C. A partir dos frutos o pericarpo, polpa e semente foram separados e armazenados a -20°C até a preparação dos respectivos extratos (procedimento descrito no item 4.4.1.1 do capítulo 2).



### 5.5.1 Preparo e fracionamento dos extratos (*P. alata*)

Após a secagem, folhas de *P. alata* e o pericarpo *in-natura* foram extraídos por decocção em EtOH 40°GL. Após arrefecimento, os extratos foram filtrados, o solvente eliminado sob pressão reduzida (evaporador rotatório) e particionados com solventes de polaridade crescente (AcOEt e *n*-BuOH) (procedimento descrito no item 4.4.1.2 do capítulo 2).

### 5.6 Análise cromatográfica das frações

A fração *n*-BuOH das folhas e do pericarpo *in-natura* de *P. alata* e as frações das colunas cromatográficas foram analisadas por CCD. Estas cromatografias foram realizadas empregando-se como fase estacionária gel de sílica F<sub>254</sub>, e como fase móvel AcOEt: CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>: HCOOH: H<sub>2</sub>O (6:2:1:1, v/v); AcOEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O (8:1:1, v/v) e *n*-BuOH: CH<sub>3</sub>COOH : H<sub>2</sub>O (12:5:7, v/v). Os cromatogramas foram avaliados com reagente natural A (RN) e anisaldeído-sulfúrico (AS) seguido de aquecimento como agentes de detecção.

### 5.7 Isolamento e purificação

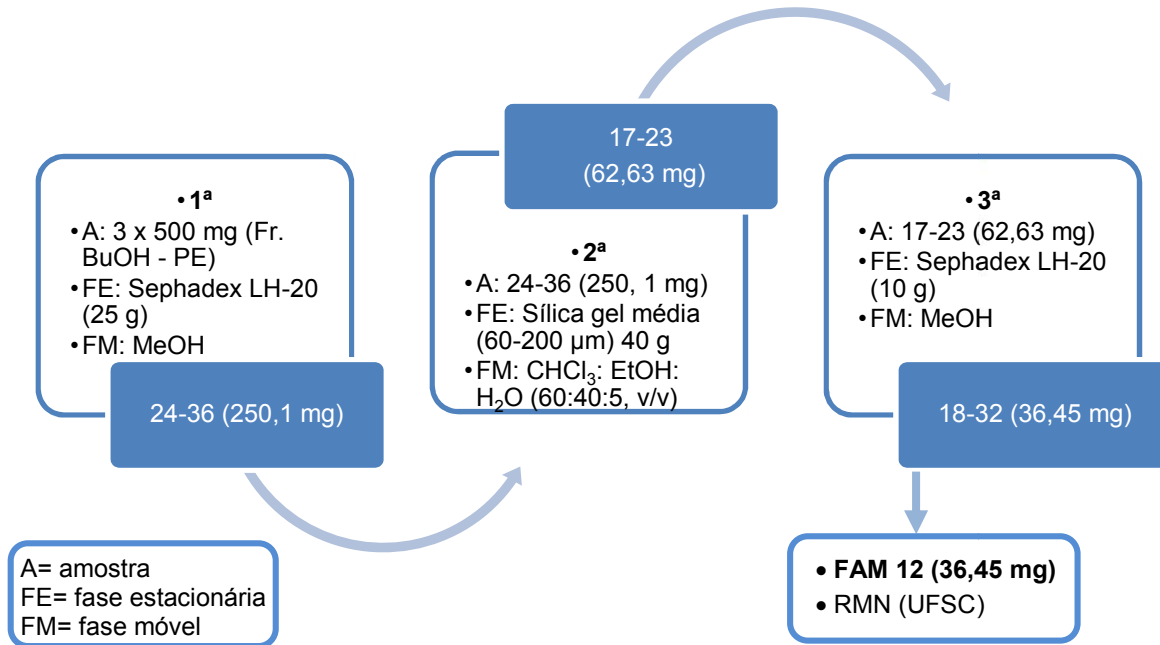
Visando o fracionamento e o isolamento dos metabólitos, as frações *n*-BuOH (ricas em flavonóides e saponinas) foram submetidas a sucessivos ensaios cromatográficos empregando diferentes fases estacionárias (sílica de fase normal e reversa, Sephadex LH-20).

#### 5.7.1 Isolamento da substância FAM 12 a partir da fração butanólica do pericarpo dos frutos de *P. alata*

O composto codificado como FAM 12, foi isolado da fração *n*-BuOH do pericarpo, como pode ser observado no esquema mostrado na figura 18. A fração *n*-BuOH do pericarpo de *P. alata* (1,5 g) foi cromatografada em coluna de permeação molecular (Sephadex LH-20, 25 g), tendo como eluente MeOH.

As frações foram monitoradas por CCD e as frações 24-36, que possuíam a substância codificada como FAM 12 como constituinte majoritário, reunidas (250,1 mg).

A seguir, essa fração foi novamente cromatografada sob sílica gel (60-200  $\mu\text{m}$  – 40 g) sendo possível observar que nas frações 17-23 (62,63 mg) havia a substância FAM 12 como constituinte majoritário (Figura 18) porém ainda com traços de outros compostos, especialmente após serem revelados com AS. A fração 17-23 (62,63 mg) foi então submetida a nova cromatografia em coluna de permeação molecular (Sephadex LH-20) onde pode-se obter nas frações 18-32 (36,45 mg) o composto FAM 12 puro.



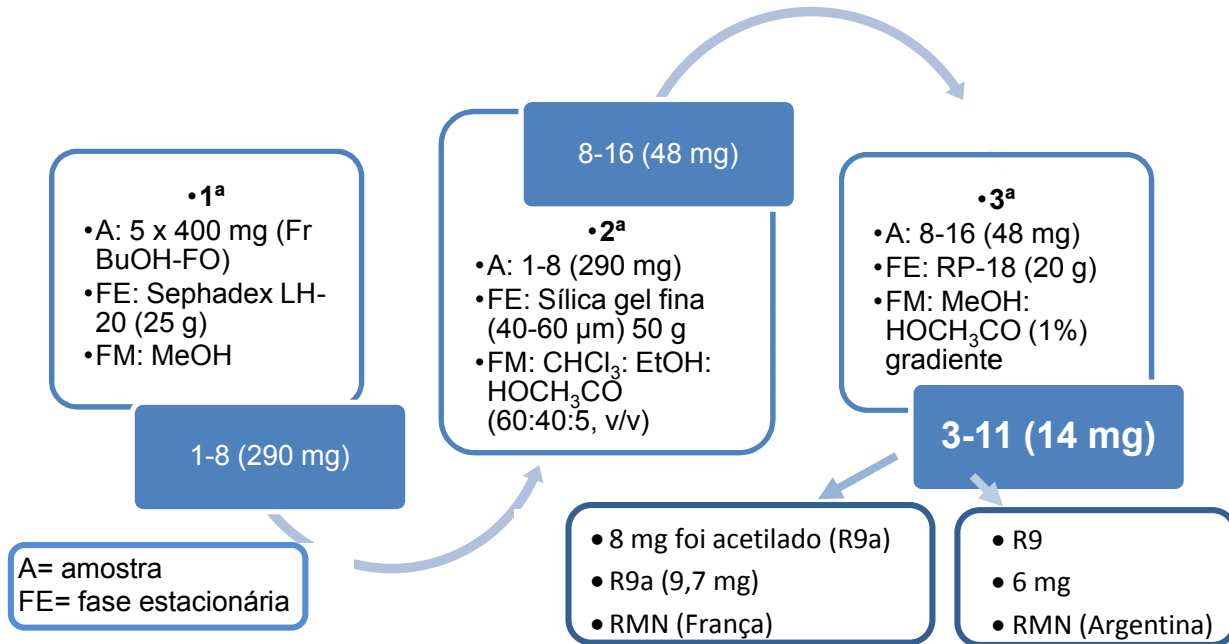
**Figura 18:** Purificação e isolamento do composto FAM 12 a partir do pericarpo de *P. alata*.

### 5.7.2 Substância isolada a partir da fração butanólica das folhas de *P. alata*.

A partir da fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata* foi isolado um composto codificado como R9. Esta fração (2 g) foi cromatografada em coluna Sephadex LH-20 (25 g), com MeOH como eluente (Figura 19). As frações 1-8 (290 mg) foram submetidas a nova cromatografia em coluna de sílica gel com fase móvel isocrática  $\text{CHCl}_3$ -EtOH- $\text{H}_2\text{O}$  (60:40:5, v/v), onde as frações 8-16 resultantes continham a substância R9 (48 mg) como constituinte majoritário. Essa fração foi novamente cromatografada em coluna com sílica RP-18, com fase móvel MeOH- $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1%) gradiente (5:95 à 20:80, v/v) obtendo-se a substância R9 (14 mg) isolada.

Essa fração foi dividida em duas partes, sendo uma delas (8 mg) submetida a acetilação, com o intuito de auxiliar na elucidação estrutural dos açúcares.

A substância R9 foi acetilada com 1,0 mL de piridina e 1,0 mL de anidrido acético. A solução permaneceu em agitação por 24h, onde posteriormente foi adicionado 2 g de gelo picado, e, a seguir, filtrado em funil de vidro sinterizado (G5). O filtrado obtido foi particionado três vezes com 10 mL de AcOEt e dessecado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .



**Figura 19:** Purificação e isolamento da substância R9 das folhas de *P. alata*.

## **5.8 Resultados e discussão**

### **5.8.2 Análise estrutural das substâncias isoladas**

#### **5.8.2.1 Substância FAM 12**

O composto FAM12 foi avaliado através de CCD apresentando satisfatória resolatividade no sistema escolhido, permitindo supor, pela fluorescência desenvolvida após reação frente ao RN sob luz ultravioleta em 366 nm, tratar-se de uma flavona com núcleo tipo apigenina (WAGNER; BLADT, 1996).

A análise por espectroscopia de ultravioleta com utilização de reagentes de deslocamento confirmou a presença de um núcleo flavona. Os dados destas análises foram comparados com a literatura (MARKHAM, 1982) e estão apresentados na tabela 3.

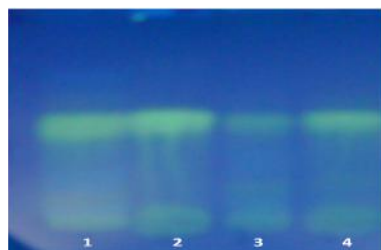
**Tabela 3:** Máximos de absorção e deslocamentos nos espectros UV da substância VIT-R

Solvente/ Reagente	$\lambda$ máximo (nm)		Deslocamento avaliado (nm)*		Informações estruturais propostas
	Banda II	Banda I	Banda II	Banda I	
MeOH	272	337	-	-	Núcleo flavona
NaOMe	279	396	+7	+ 59, sem decréscimo da intensidade	-OH livre em C-4'
NaOMe	Nova banda 334		-	-	-OH em C-7
NaOAc	272	342	-	+5	-OH livre em C-7
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	270	333	-	-4	Não possui grupamento o- diidroxil
AlCl <sub>3</sub>	276; 304	349; 390	-	Sem deslocamento em relação AlCl <sub>3</sub> + HCl	Não possui grupamento o-OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl	277; 302	347; 390	-	+ 53	-OH livre em C-5

\*: Deslocamento observado após a adição dos reagentes apresentados.

análise dos resultados obtidos a partir dos espectros de UV sugerem que o composto FAM12 trata-se de uma flavona com as características de núcleo apigenina com hidroxila livre no carbono 7, 5 e 4'.

Ao ser analisado por CCD e comparado frente a diferentes padrões de flavonóides disponíveis em nosso laboratório, a substância FAM12 apresentou o mesmo Rf (0,50) e coloração da vitexina-2''-O-ramnosideo (Figura 20). Além desses ensaios a substância FAM12 foi avaliada por CLAE-DAD (metodologia item 4.4.3.2) apresentando o mesmo tr e perfil de UV quando comparado a amostra padrão vitexina-2''-O-ramnosideo (dados não apresentados).



FM:AcOEt:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O  
(6:2:1:1, v/v).

FE: Gel de sílica F<sub>254</sub>

Deteccção: RN A, λ. 366 nm

Amostras: **1, 2 e 3** (FAM12 isolada);

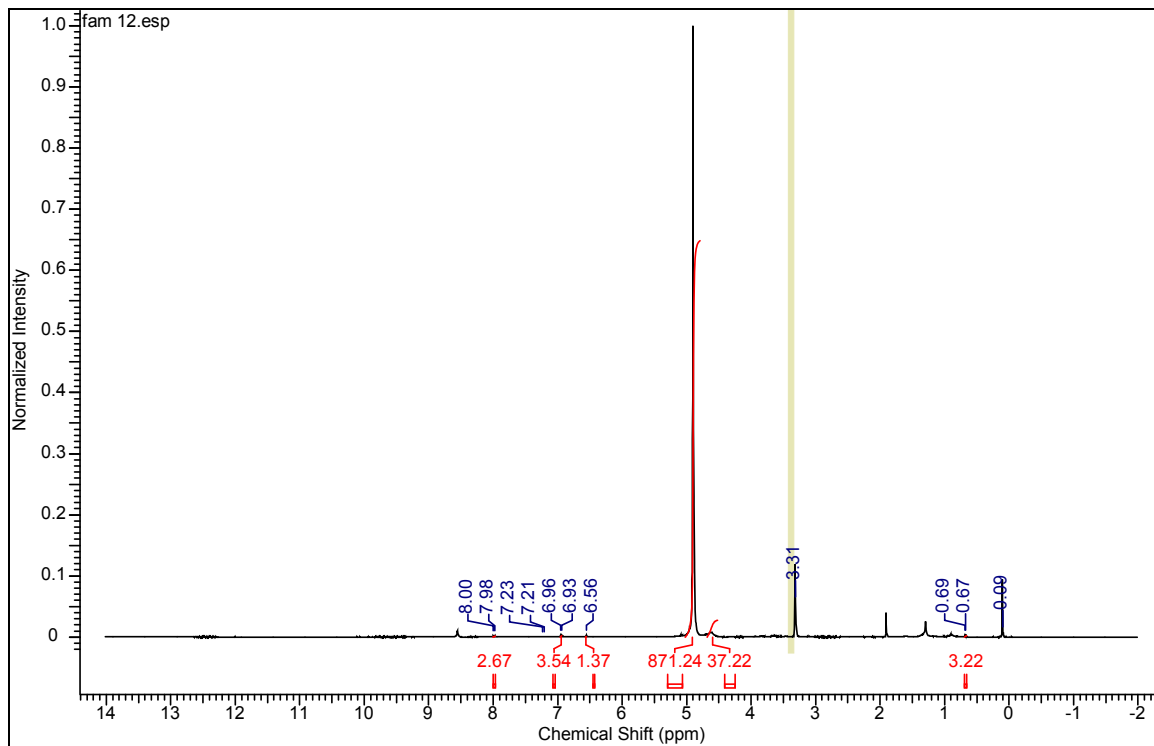
**4.** vitexina-2''-O-ramnosideo autêntica.

**Figura 20:** Cromatografia em camada delgada da substância FAM12 isolada a partir da fração BuOH do pericarpo de *P. alata*, cromatografada com amostra autêntica.

Através dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios característicos de heterosídeos de flavonóides para a substância FAM12. No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 21) são evidentes os sinais correspondentes a dois açúcares ( $\delta$  3,5–4,0) (MARKHAM, 1982) assim como a presença de um duplete em  $\delta$  0,66 com constante de acoplamento de 5,8 Hz, o que sugere a presença de ramnose na molécula.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H ampliado (Figura 22 e 23) a presença de um singleto em  $\delta$  6,56 correspondente ao H-3 e o hidrogênio H-6 ( $\delta$  6,93) sobreposto com o duplete 6,95 (H-3' e H-5') corrobora a presença de sinais característicos de um flavonóide glicosilado. Os hidrogênios referentes ao anel B da aglicona da substância FAM12 foram devidamente identificados e estão apresentados na tabela 4.





**Figura 21:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da substância FAM12 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400MHz.

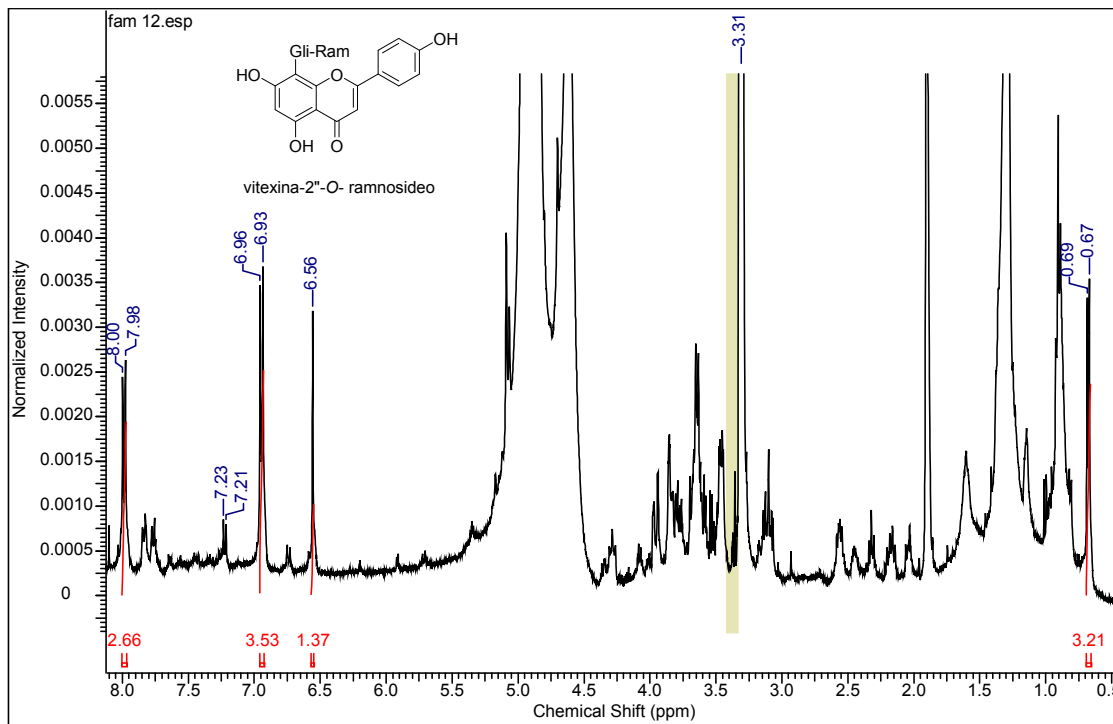
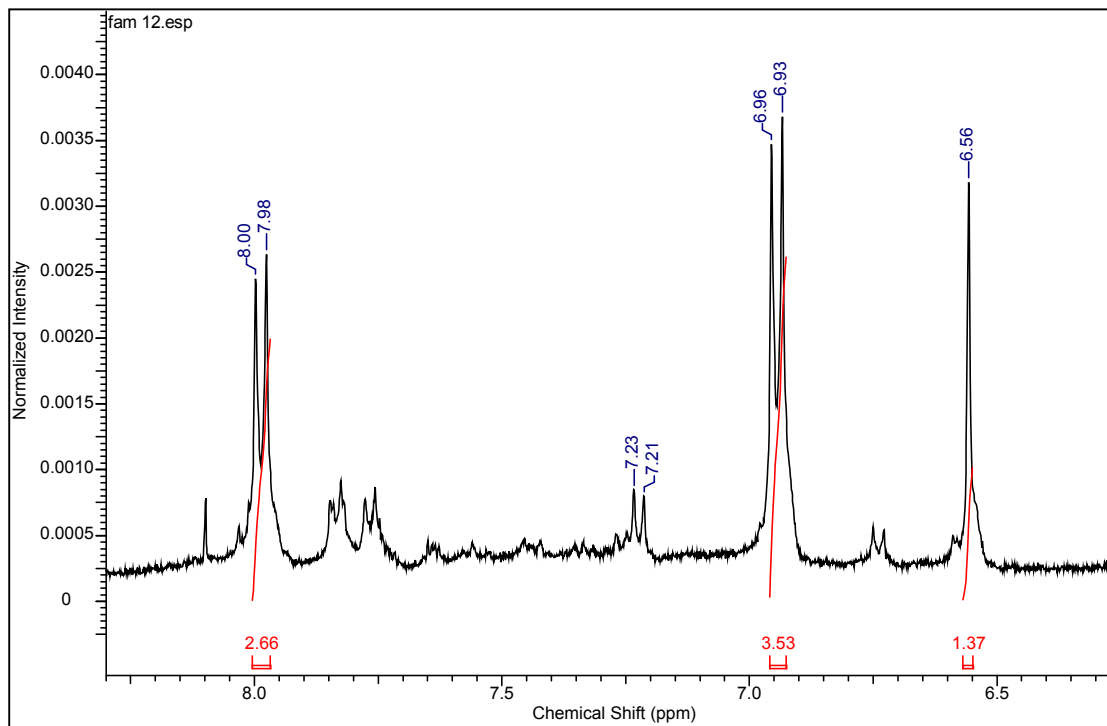


Figura 22: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da substância FAM12 em CD<sub>3</sub>OD a 400MHz.



**Figura 23:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H, ampliado, da substância FAM12 em CD<sub>3</sub>OD a 400MHz.

**Tabela 4:** Valores de deslocamentos químicos em ppm observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância FAM12 em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Posição	$^1\text{H}$ ppm; multiplicidade, intensidade (J Hz)	Referências	
		Tanaka et al. (2005)*	Doyama et al. (2005)**
H-ramn 6'''	0,66; d, 3 (5,86)	-	0,46
H-6	6,56; s, 1	6,27	6,25
H-3	6,93; s, 1	6,77	6,78
H-3' e H-5'	6,95;d, 2 (8,99)	6,88	6,89
H-2' e H-6'	7,99; d, 2 (8,99)	8,02	8,04

\*vitexina  $\text{CD}_3\text{OD}$  (TANAKA et al., 2005)\*\*vitexina-2''-O-ramnosideo em  $\text{DMSO-d}_6$  (DOYAMA et al., 2005)

Considerando que as análises por UV, CCD indicaram que o composto FAM12 possuía características de uma flavona (apigenina), que as análises por CLAE/DAD, mostraram que o composto apresentou tempo de retenção e espectro de UV semelhante a vitexina-2''-O-ramnosídeo, e que nas análises por RMN<sup>1</sup>H foram observados os sinais característicos desse composto, os dados apresentados confirmam tratar-se da substância vitexina-2''-O-ramnosídeo, composto já relatado para a espécie, mas ainda não descrito para o pericarpo de *P. alata*.

### 5.8.2.2 Substância R9

A substância codificada como R9 foi obtida da fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata*, a qual quando revelada com AS apresentou coloração característica de um composto terpênico (Figura 24). Adicionalmente, observando-se o sistema cromatográfico empregado, é possível sugerir que a substância R9 trata-se de um heterosídeo.



FE: Gel de sílica F<sub>254</sub>  
FM: BuOH: CH<sub>3</sub>COOH: H<sub>2</sub>O (12:5:7, v/v)  
Detecção: AS/aquecimento  
Amostra: R9

**Figura 24:** Cromatografia em camada delgada do composto R9, obtido a partir da fração *n*-BuOH das folhas de *P. alata*.

A elucidação estrutural da substância R9 foi realizada através do derivado acetilado (R9a) por apresentar maior massa e também por já possuímos espectros preliminares deste composto realizados na Faculté de Pharmacie (UPJV) Amiens - França. O interesse no re-isolamento deste composto ocorreu em função dos dados originais de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sugerirem tratar-se de um composto ainda não descrito para *P. alata*, embora sua estrutura não tenha sido elucidada a partir destes espectros

originais. Foram utilizados também espectros da substância R9 não acetilada isolada no presente trabalho (obtidos junto a UBA/Argentina - dados não apresentados), visando confirmar algumas informações observadas para o derivado acetilado.

Através dos espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e espectros bidimensionais COSY, HMBC e HSQC foi possível caracterizar a estrutura do composto R9 acetilado e atribuir seus deslocamentos.

Na figura 25 pode ser observado o espectro desacoplado de RMN-<sup>13</sup>C do composto R9a, sendo a caracterização de cada átomo de carbono realizada com a análise do espectro DEPT-135° (Figura 26).

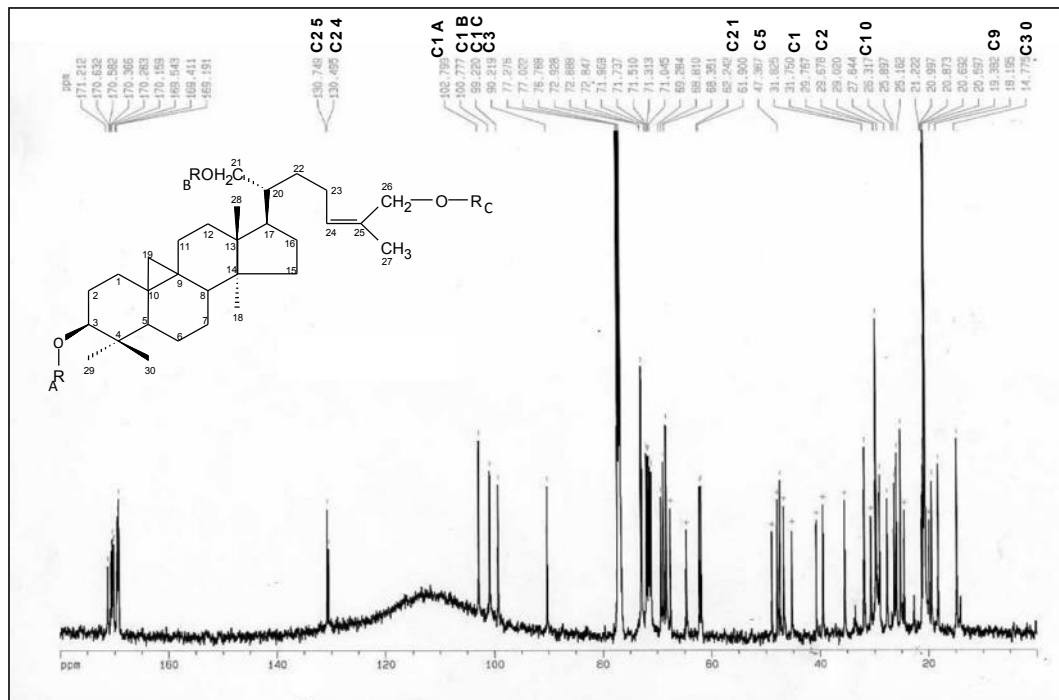


Figura 25: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância R9a em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

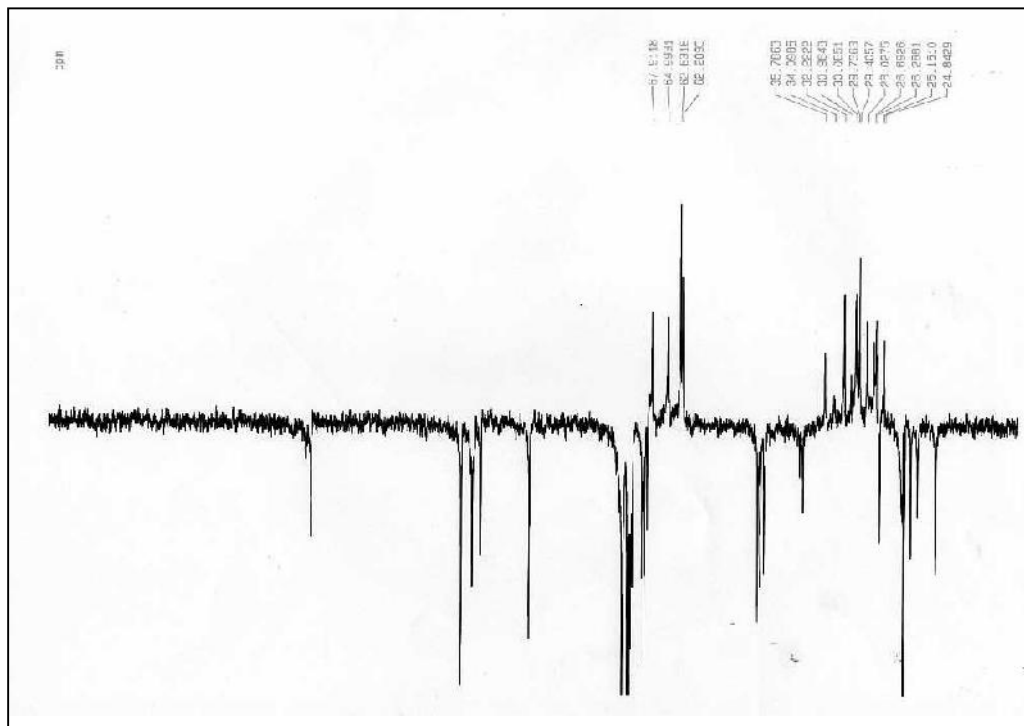


Figura 26: Subespectro DEPT 135° da substância R9a.



O espectro de RMN<sup>13</sup>C da R9 acetilada mostra a existência de 48 carbonos. Além destes são verificados também 18 sinais de carbonos na região de 20 e 170 ppm, que correspondem as metilas e as carbonilas respectivamente, das acetilas da estrutura.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C revelou também a presença de sinais característicos de três carbonos anoméricos ( $\delta$  99,2, 100,7 e 102,7) e uma dupla ligação ( $\delta$  130,4 e 130,7). Os carbonos do composto R9a através do espectro DEPT puderam ser caracterizados como:

Carbono	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	Cq
$\Sigma = 66$	14	16	21	15

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 27) e suas ampliações na região das metilas (Figura 28) e na região dos hidrogênios anoméricos (Figura 29) indicaram a presença de um ciclopropano na estrutura pela existência de dois dupletos em campo altamente blindado  $\delta_H$  0,35 ( $J = 3,6$  Hz) e 0,56 ( $J = 3,6$  Hz) (característicos dos H geminais do ciclopropano) (ORSINI et al., 1987), e cinco simpletos integrando para três hidrogênios em  $\delta_H$  0,79; 0,85; 0,91; 1,01; 1,70, indicando a presença de cinco metilas terciárias na estrutura. A presença de uma dupla ligação foi confirmada pelo sinal do hidrogênio olefínico ( $\delta_H$  5,35/ tripleto;  $J = 5,3$ ), sendo possível constatar também a presença de três hidrogênios anoméricos ( $\delta_H$  4,58; 4,55; 4,45/ dupeletos) o que confirma a presença de três açúcares na molécula, fato este corroborado pelos espectros de RMN<sup>13</sup>C que também sugerem essa característica para a estrutura (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

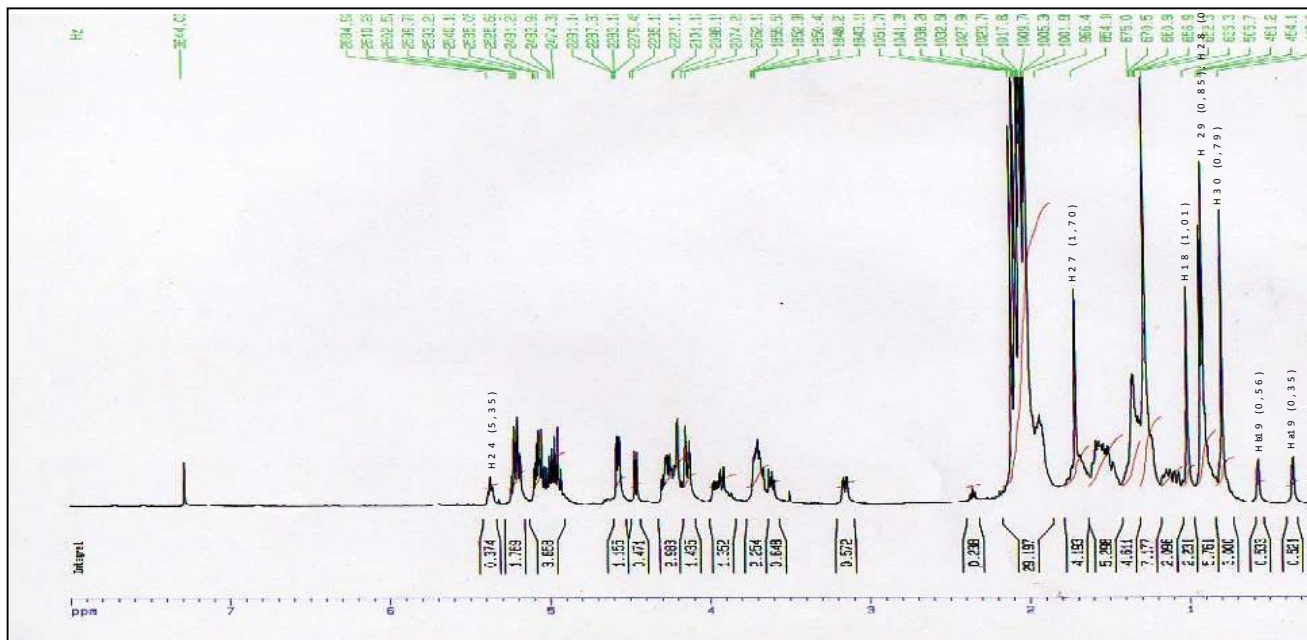


Figura 27: Espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  do composto R9a em  $\text{CDCl}_3$  e a 400 MHz.



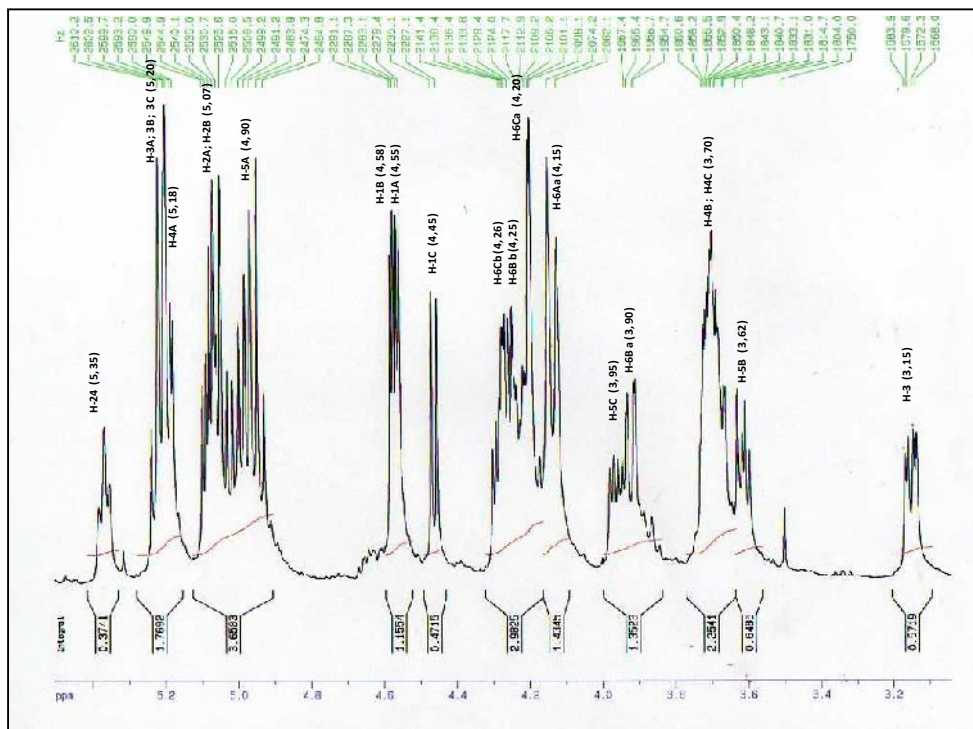


Figura 29: Espectro de RMN- $^1\text{H}$ , ampliado, da substância R9a em  $\text{CDCl}_3$  e a 400 MHz.

A partir da caracterização dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 27; 28 e 29) foi iniciado o trabalho com os espectros de HSQC, HMBC e COSY, onde foram observadas as conectividades entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC), entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância (HMBC) e entre hidrogênios vizinhos espacialmente (COSY),

A partir do espectro de correlação CH-HSQC (Figura 30, 31 e 32), foi possível identificar os hidrogênios ligados aos carbonos da molécula do triterpeno, o número de átomos de hidrogênio ligados por cada átomo de carbono e caracterizar os sinais referentes aos hidrogênios.

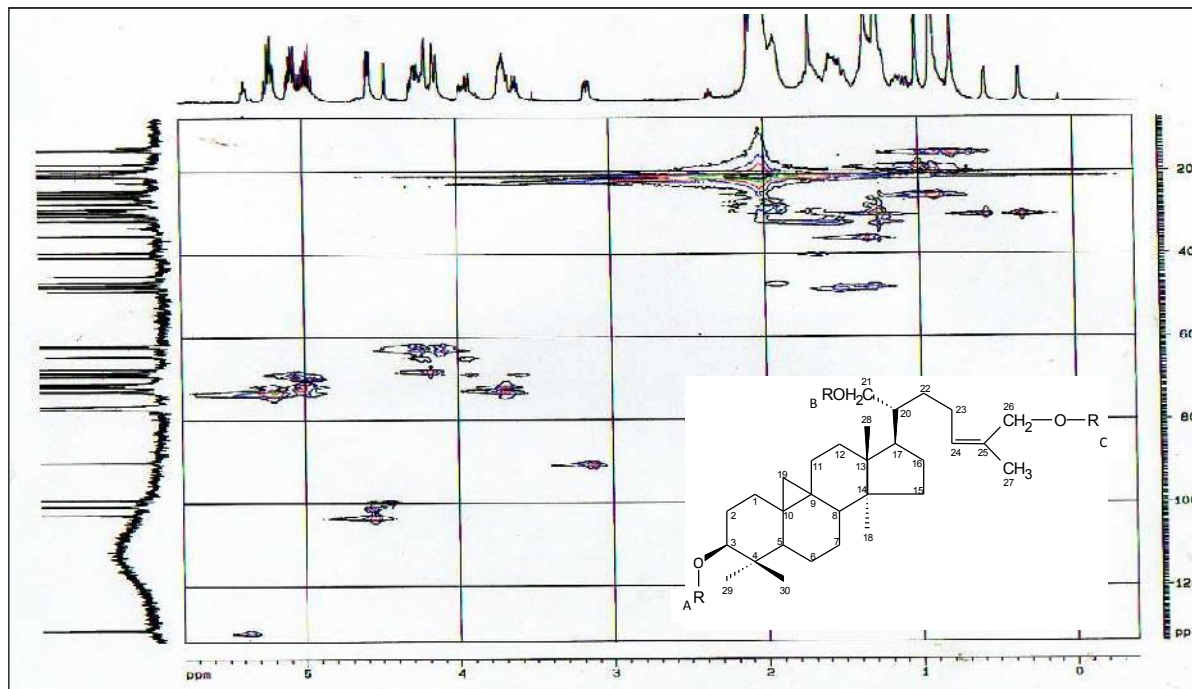


Figura 30: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz) do composto R9a.

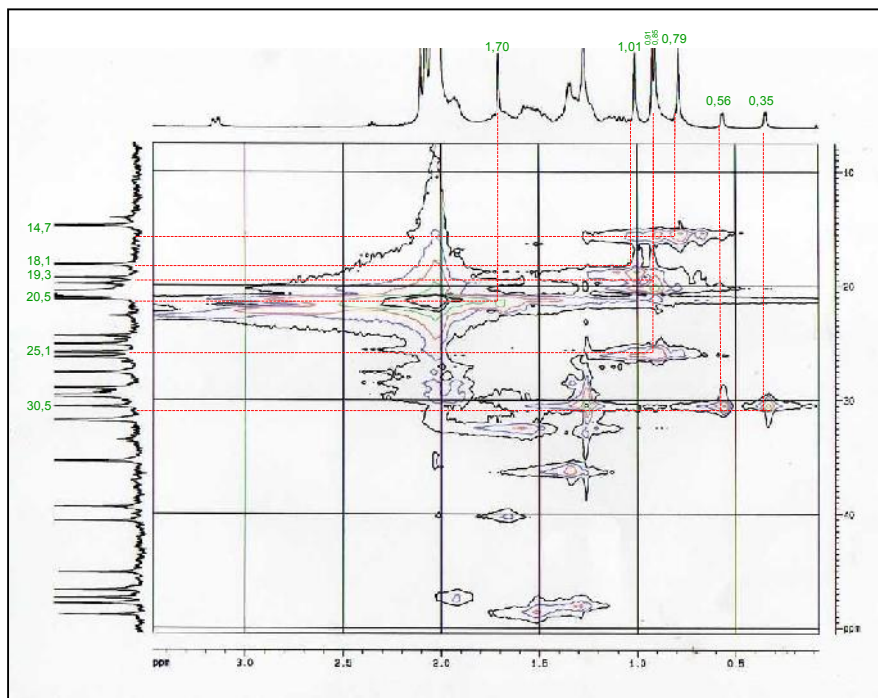


Figura 31: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz), ampliado, da substância R9a.

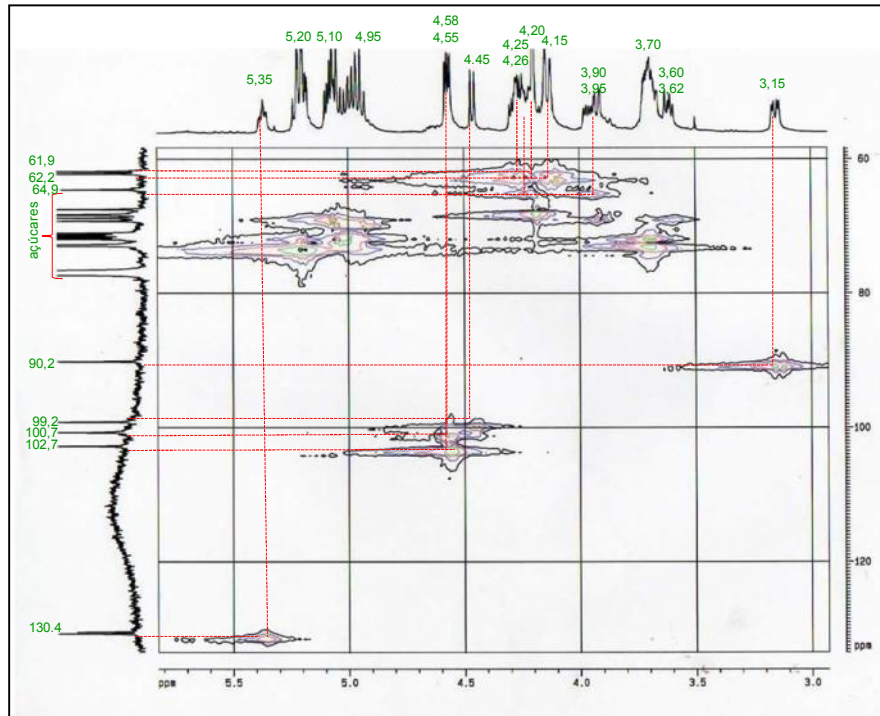
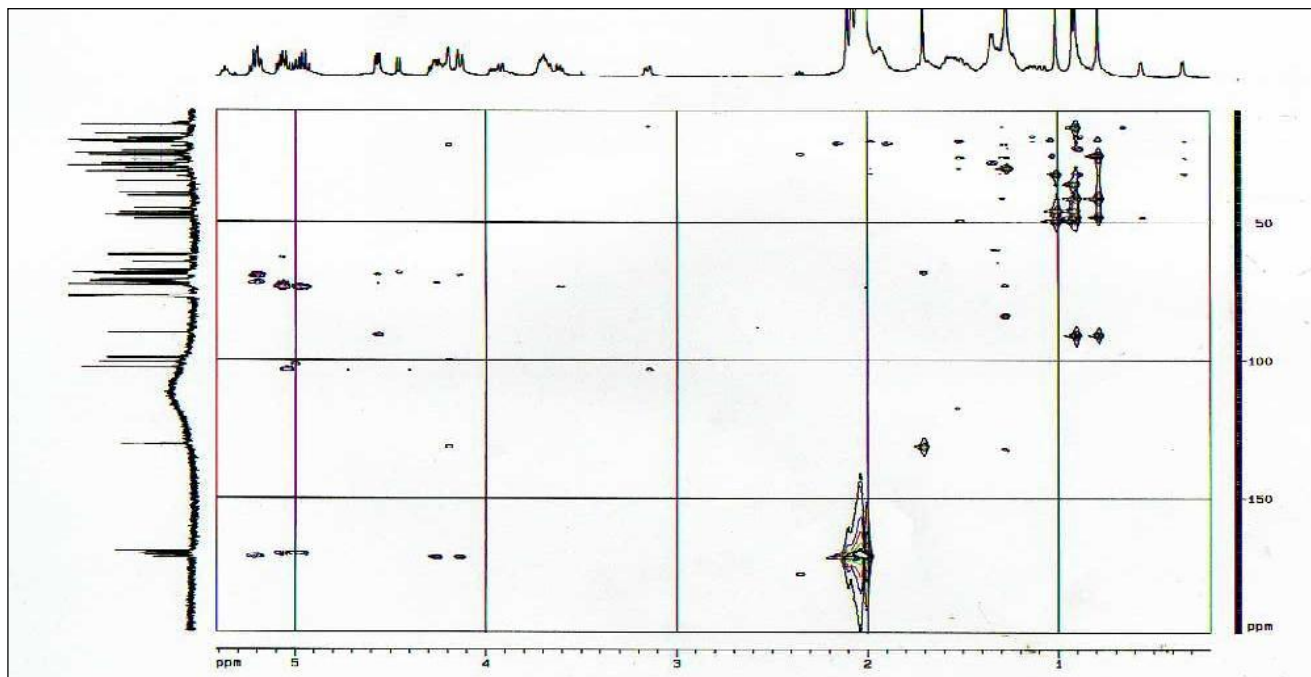


Figura 32: Espectro de correlação CH-HSQC (400-100 MHz), ampliado, do composto R9a.



O espectro de correlação HMBC (Figura 33) forneceu informações importantes sobre a conectividade entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância. No espectro HMBC foi possível caracterizar as correlações dos hidrogênios de grupos -CH<sub>3</sub> com seus respectivos carbonos vizinhos, bem como dos hidrogênios anoméricos (C-3 e C-26) com seus carbonos vizinhos (Figura 34), permitindo assim estabelecer a posição exata de ligação das metilas e de duas moléculas de açúcar à aglicona triterpênica.

O carbono anomérico com deslocamento de 100,7 ppm não apresentou correlação com nenhum outro carbono da molécula, permitindo apenas especular que ele possa estar ligado em C-21 pelo deslocamento químico observado (62,2 ppm). No entanto, considerando que raramente são descritos na literatura saponinas tridesmosídicas, outras possibilidades mais prováveis seriam a presença de uma glicose e de uma cadeia osídica com 2 açúcares ligada à aglicona, sendo estas ligadas ao C3 ou C26. No entanto as correlações não nos permitem concluir nenhuma dessas hipóteses, e mais análises espectroscópicas devem ser feitas para alocar corretamente este açúcar na molécula.



**Figura 33:** Espectro de correlação CH-HMBC (400-100 MHz) do composto R9a.

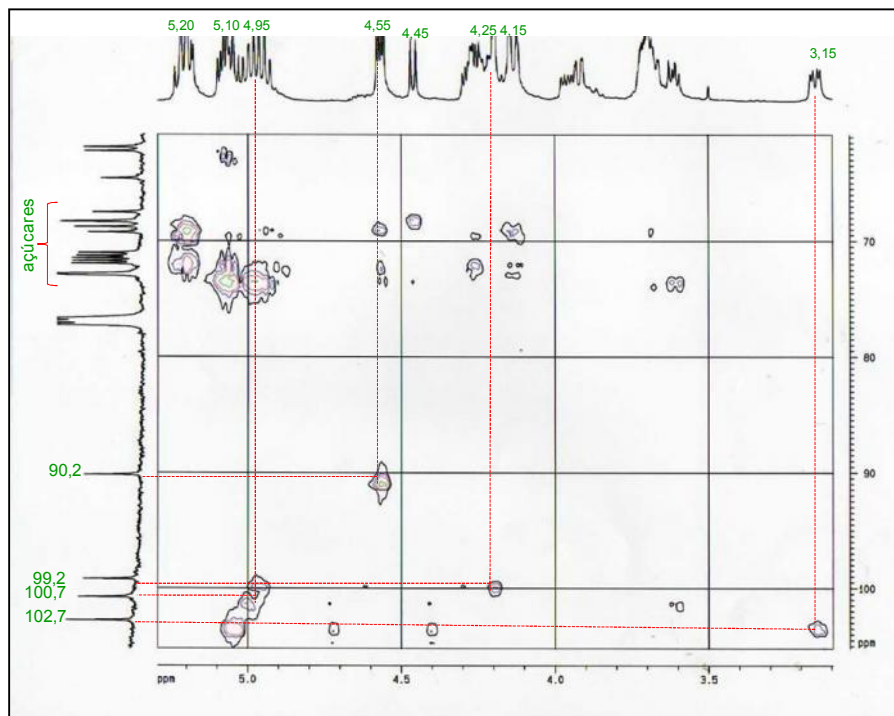


Figura 34: Espectro de correlação CH-HMBC (400-100 MHz), ampliado, do composto R9a.

No espectro HH-COSY (Figura 35) foram destacados os carbonos na região de 70 ppm, os quais estão acoplados aos hidrogênios que ressonam em campo baixo, que geralmente correspondem aos hidrogênios de moléculas de açúcares e aos hidrogênios próximos a grupos eletronegativos como hidroxilas e ligações insaturadas (H-24: 5,35 ppm).

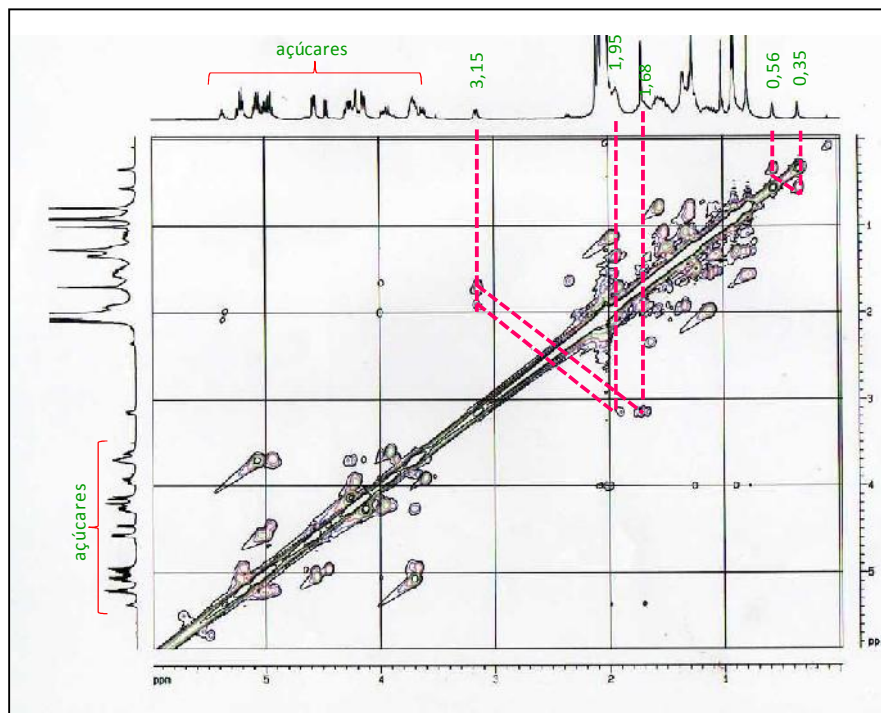
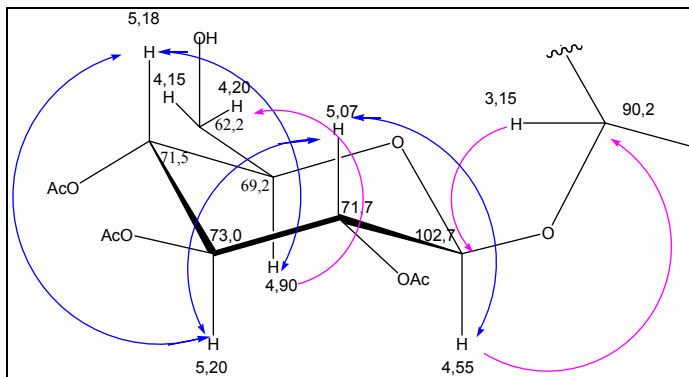


Figura 35: Espectro de RMN HH-COSY da substância R9a.

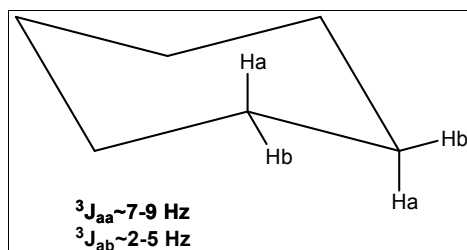
Conforme citado anteriormente, a presença de açúcares na molécula pode ser identificada nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C pelo deslocamento químico característico de seus hidrogênios e carbonos anoméricos, devido a maior desblindagem em relação aos demais átomos de hidrogênio que compõe a molécula de açúcar ligada a aglicona. Nos espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da substância R9a foi possível observar os sinais em  $\delta_H$  4,58 (d, J=7,9 Hz); 4,55 (d, J=7,9 Hz) e 4,45 (d, J=8 Hz) sendo seus respectivos carbonos  $\delta$  100,7; 102,7; 99,2 característicos de carbonos anoméricos de  $\beta$ -glicopiranosose (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Considerando que a porção açúcar normalmente encontra-se ligada na aglicona de saponinas formando uma ligação do tipo éter na hidroxila do C-3 (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995), a análise do espectro de correlação HH-COSY permitiu caracterizar, a partir dos hidrogênios anoméricos, a seqüência referente ao açúcar ligado ao C3 da aglicona (Figura 36).

As constantes de acoplamento observadas para os hidrogênios do ciclohexano (Figura 37) podem servir de base para a análise de açúcares, pois os dados espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H correspondentes às interações entre hidrogênios e as constantes de acoplamento variam de acordo com a disposição equatorial ou axial de seus substituintes. A configuração do carbono anomérico dos açúcares afeta o valor da constante de acoplamento <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>, onde a  $\beta$ -glicose, com disposição trans-axial entre H-1 e H-2, apresenta <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=7,9 Hz, ao passo que a  $\alpha$ -glicose, com disposição axial-equatorial, possui valor de <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub>=3,7 Hz.



**Figura 36:** Seqüência de hidrogênios determinados através das correlações vicinais observadas no espectro COSY para  $\beta$ -glicose ligada ao C-3 da R9a (setas: azuis COSY; rosa HMBC).



**Figura 37:** Constante de acoplamento de hidrogênios vicinais ( ${}^3J_{HH}$ ) característicos do ciclohexano (FRIEBOLIN, 1988).

A análise do espectro de RMN- ${}^1\text{H}$  permitiu a determinação das constantes de acoplamento entre os hidrogênios vicinais dos açúcares, os quais apresentam  $J$  próximos a 8,0 Hz, caracterizando estes como  $\beta$ -glicose, com disposição trans-axial entre H-1 e H-2.

Na tabela 5 podem ser observados os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos anoméricos das glicoses atribuídos para o composto R9a, bem como outros carbonos e hidrogênios presentes na região dos açúcares. A comparação destes valores com dados da literatura (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; REGINATTO et al., 2001; YOKOSUKA et al., 2010) sugerem que dois desses açúcares encontram-se ligados aos C-3 e C-26, respectivamente. No entanto, conforme

anteriorente citado, não é possível estabelecer com exatidão a localização do terceiro açúcar.

**Tabela 5:** Valores de  $\delta$  dos hidrogênios e carbonos na região dos açúcares ligados a substância R9a e suas correlações COSY.

	DEPT	$\delta_c$	$\delta_H$	COSY	HMBC
1A	CH	102,7	4,55 (d)	5,07	90,2
2A	CH	71,7	5,07 (m)	5,20	-
3A	CH	73,0	5,20 (m)	5,07	-
4A	CH	71,5	5,18 (m)	5,20; 4,90	-
5A	CH	69,2	4,90 (m)	5,18	62,2
6Aa	CH <sub>2</sub>	62,2	4,15 (d)	-	-
6Ab	CH <sub>2</sub>	62,2	4,20 (m)	-	-
1B	CH	100,7	4,58 (d)	5,00	68,8
2B	CH	71,0	5,00 (m)	5,20	-
3B	CH	72,9	5,20 (m)	5,00	-
4B	CH	71,9	3,70 (m)	3,62	-
5B	CH	68,8	3,62 (dd)	3,70; 3,90	100,7
6Ba	CH <sub>2</sub>	64,9	3,90 (m)	3,62	-
6Bb	CH <sub>2</sub>	64,9	4,25 (m)	-	-
1C	CH	99,2	4,45 (d)	-	-
2C	CH	68,3	5,07 (m)	5,20	-
3C	CH	72,0	5,20 (m)	5,07	-
4C	CH	71,3	3,70 (m)	3,95; 5,20	-
5C	CH	68,8	3,95 (m)	3,70; 4,20	-
6Ca	CH <sub>2</sub>	61,9	4,20 (m)	3,95	-
6Cb	CH <sub>2</sub>	61,9	4,26 (m)	-	-

A tabela 6 reúne as informações dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da estrutura R9a.



**Tabela 6:** Valores de  $\delta$  observados nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H da substância R9a e suas correlações HSQC, HMBC e COSY.

-	DEPT	$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicidade)	COSY	HMBC
1	CH2	31,7	1,21 (m); 1,55 (m)	2	29,6; 26,3; 40,6
2	CH2	29,6	1,95 (m); 2,00 (m)	-	31,7
3	CH	90,2	3,15 (dd)	1,95; 2,00	14,7; 25,1; 102,7
4	C	40,6	-	-	14,7; 25,1; 31,7
5	CH	47,3	1,95 (m)	-	14,7; 25,1; 30,5
6	CH2	25,8	0,91 (m)	-	14,7
7	CH2	31,7	1,20 (m); 1,55 (m)	1,95	25,8; 30,5
8	CH	46,6	1,95 (m)	1,55	18,2
9	C	19,3	-	-	30,5
10	C	26,3	-	-	30,5; 31,7
11	CH2	27,6	1,36 (m)	1,10; 1,95	-
12	CH2	35,4	1,36 (m)	1,10; 1,95	19,4
13	C	45,1	-	-	18,2; 19,4
14	C	48,8	-	-	18,2; 19,4
15	CH2	31,7	1,20 (m); 1,55 (m)	-	18,2
16	CH2	26,3	1,95 (m)	1,68	31,8
17	CH	39,4	1,68 (m)	1,95; 2,00	-
18	CH3	18,2	1,01 (s)	-	-
19	CH2	30,5	0,35 (d); 0,56 (d)	-	19,3; 26,3; 31,7; 47,3
20	CH	47,8	1,51 (m)	1,95	-
21	CH2	62,2	4,25 (m)	-	-
22	CH2	24,4	1,20 (m)	-	-
23	CH2	31,8	1,70 (m)	-	130,4
24	CH	130,4	5,35 (t)	-	21,4; 31,8
25	C	130,7	-	-	20,5; 67,9
26	CH2	67,9	4,20 (m)	-	20,5; 99,2
27	CH3	20,5	1,70 (s)	-	-
28	CH3	19,4	0,91 (s)	-	35,4; 45,1; 48,8
29	CH3	25,1	0,85 (s)	-	40,6; 47,3; 90,2
30	CH3	14,7	0,79 (s)	-	25,8; 40,6; 47,3; 90,2

A fórmula molecular do composto R9 não acetilada  $C_{48}H_{80}O_{18}$  foi deduzida por espectrometria de massas de alta resolução (APPI) pelo pico  $[M+Na]^+$  967.5222 (Figura 38), corroborando com as estruturas proposta ( $m/z$ : 944,5345) (Figura 39) a partir dos dados de RMN utilizados.

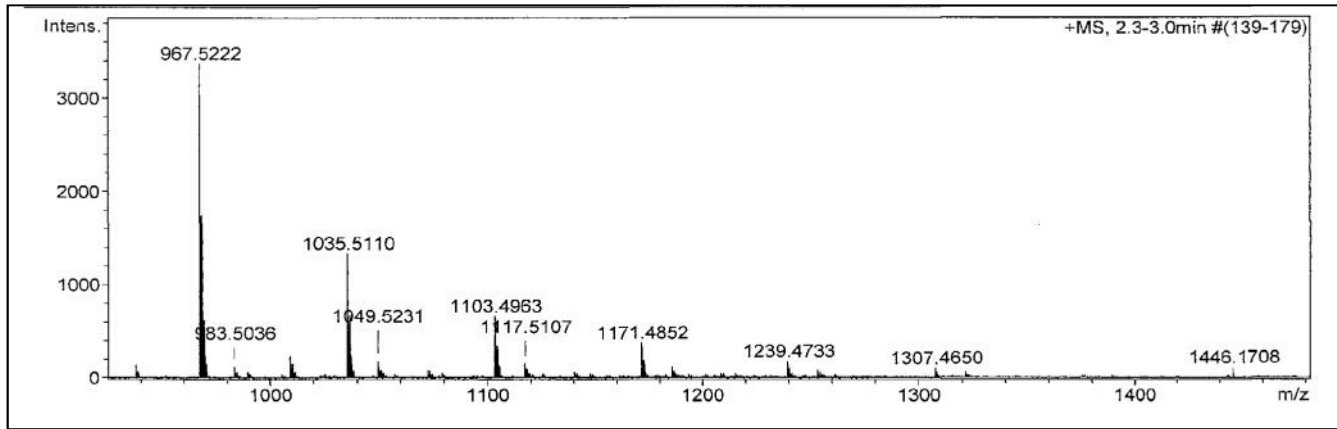
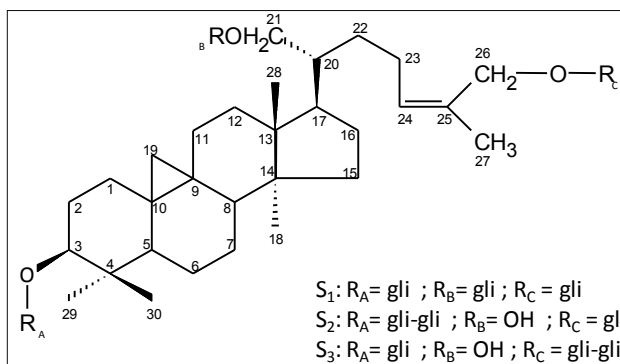


Figura 38: Espectro de Massas (APPI) da substância R9.

Os dados analisados e comparados com a literatura permitem sugerir 3 estruturas distintas ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) para o composto R9a, as quais são apresentadas na figura abaixo (Figura 39). Cabe destacar, porém que considerando as possibilidades biogenéticas e o relatado na literatura, a possibilidade de que o composto R9a seja o 9,19-ciclolanostano-24Z-*en*-3,21,26- $\beta$ -D-tri-O-glicopitranosídeo, uma saponina triterpênica tridesmosídica ( $S_1$ ) é menor, principalmente se considerarmos que não há um deslocamento químico específico de glicosilação no C-21 da aglicona. Por outro lado, a análise dos espectros disponíveis não permitiu visualizar qualquer correlação específica entre hidrogênios de uma possível cadeia osídica.



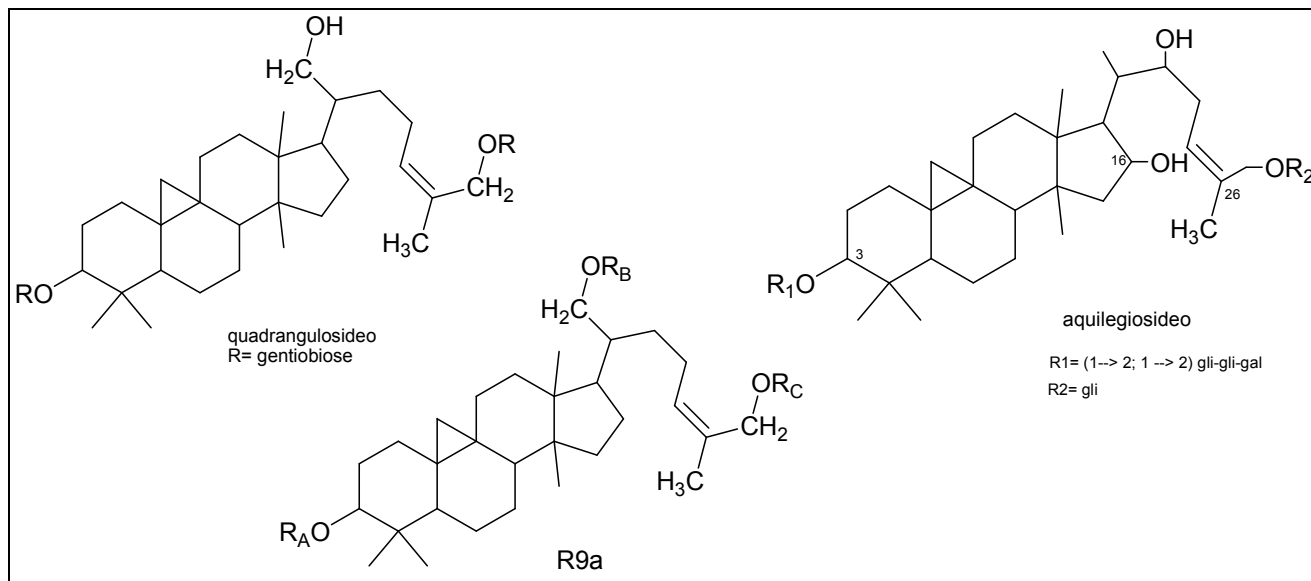
**Figura 39:** Propostas de estruturas para substância R9a ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ).

As três propostas para R9a ( $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ ) ainda não foram descritas na literatura. Os deslocamentos de carbonos da R9a comparados com estruturas semelhantes da literatura, como o quadrangulosídeo (REGINATTO et al., 2001;) e o aquilegiosídeo (YOSHIMITSU; NISHIDA; NOHARA, 2008) estão compilados na tabela 7. As estruturas destes compostos são apresentadas abaixo (Figura 40).

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de substância R9a e da literatura

$^{13}\text{C}$	R9a $\text{CDCl}_3$ 100 MHz	quadrangulosideo $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 100 MHz	aquilegiosideo $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 125 MHz
-	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	31,7	32,4	31,8
2	29,6	30,2	29,7
3	90,2	88,9	88,7
4	40,6	41,4	41,1
5	47,3	47,6	47,3
6	25,8	21,3	20,8
7	31,7	27,9	26,1
8	46,6	47,6	47,8
9	19,3	20,1	19,2
10	26,3	26,4	26,1
11	27,6	26,4	26,5
12	35,4	35,9	32,9
13	45,1	45,6	46,6
14	48,8	49,1	47,6
15	31,7	32,4	47,1
16	26,3	26,7	75,5
17	39,4	43,1	58,2
18	18,2	18,8	19,5
19	30,5	30,0	29,7
20	47,8	46,8	39
21	62,2	61,8	12,6
22	24,4	30,9	73,2
23	31,8	25,2	33,1
24	130,4	131,3	128,3
25	130,7	132	132,8

$^{13}\text{C}$	R9a $\text{CDCl}_3$ 100 MHz	quadrangulosideo $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 100 MHz	aquilegiosideo $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 125 MHz
-	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
26	67,9	67,8	67,2
27	20,5	22,3	21,9
28	19,4	19,9	20,3
29	25,1	25,9	25,4
30	14,7	15,6	15,2



**Figura 40:** R9a comparados com estruturas semelhantes da literatura (quadrangulosideo e aquilegiosideo).

## 5.9 Conclusão

Um flavonóide glicosilado (FAM12) foi isolado do pericarpo de *Passiflora alata*, o qual foi identificado como vitexina-2"-O-ramnosideo, substância previamente descrita para as folhas de *P. alata* e ainda não relatada para o fruto desta espécie.

A partir das folhas de *Passiflora alata* foi isolada uma saponina (R9) para a qual é possível afirmar:

- A aglicona desse composto é o 9,19-ciclolanostano.
- Existem 3 moléculas de glicose na estrutura dessa substância, sendo uma ligada ao C3 e outro ao C26.



## 5.10 Referências

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

FRIEBOLIN, H. **Ein- und zweidimensionale NMR - spektroskopie**. Deutschland: VHC Verlagsgesellschaft, 1988.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins**. Cambridge, 1995. 548 p.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970. 354 p.

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**. v. 81, n. 7, p. 703-714, 2010.

MANDAL, P.; SINHA BABU, S. P.; MANDAL, N. C. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. **Fitoterapia**. v. 76, n. 5, p. 462-465, 2005.

MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoids Identification**. Londres, 1982. 113 p.

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**. v. 25, n. 1, p. 191-193, 1985.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e Farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira Plantas Médicas**. v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 162-164, 2001.

REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora*

*alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 3, p. 195-197, 2004.

REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPESEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEF, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. S., E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p.711-740.

SENA, L. M.; ZUCOLOTTO, S. M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; DE LIMA, T. C. M. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**. v. 234, n. 8, p. 967-975, 2009.

SHIBUYA, M.; ZHANG, H.; ENDO, A.; SHISHIKURA, K.; KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. **European Journal of Biochemistry**. v. 266, p. 302-307, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. TRADUÇÃO DE ALENCASTRO, R. B. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora S.A., 2006. 490 p.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**. v. 13, n. 4, p. 323-328, 1999.

SMALL, E.; JURZYSTA, M.; NOZZOLILLO, C. The evolution of hemolytic saponin content in wild and cultivated alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae). **Economic Botany**. v. 44, n. 2, p. 226-235, 1990.

TAKETA, A. T. C. **Saponinas de *Ilex brevicuspis* Reissek**. (Dissertação de mestrado). 1997. p. Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

TANAKA, J. C. A.; DA SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; DE CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de

*Luehea divaricata* Mart.(TILIACEAE). **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**. v. 45, n. 6, p. 783-783, 1982.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas** 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 354 p.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. D. T. On the origins of triterpenoids skeletal diversity. Review. **Phytochemistry**. v. 65, p. 261-291, 2004.

YOKOSUKA, A.; SATO, K.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. Triterpene Glycosides from *Curculigo orchioides* and Their Cytotoxic Activity. **Journal of natural products**. v. 73, n. 6, p. 1102-1106, 2010.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 9, p. 1229-1234, 2000.

ZAKAY-RONES, Z. Human influenza vaccines and assessment of immunogenicity. **Expert Review of Vaccines**. v. 9, n. 12, p. 1423-1439, 2010.

ZUCOLOTTO, S. M.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 25, n. 1, p. 5-9, 2006.



---

---

**6. CAPÍTULO IV: Influência dos processos de extração e secagem no teor de vitexina-2''-O-ramnosideo no extrato aquoso a partir das folhas de *Passiflora alata* Curtis**

---

---



## 6.1 Introdução

Atualmente, o desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção de extratos secos padronizados de plantas medicinais é de grande interesse das indústrias de fitoterápicos. Estes atributos, entretanto, são dependentes das etapas de transformação ao longo da produção, que incluem as condições utilizadas nos processos de secagem e no tratamento térmico de bioprodutos (RAGHAVAN; ORSAT, 1998).

Outro fato a ser destacado é que para extratos vegetais, diferenças nas metodologias de preparação dos extratos podem acarretar alterações na composição química do produto final. Portanto, para garantir a equivalência farmacêutica dos medicamentos fitoterápicos faz-se necessário um controle rigoroso de todas as etapas do processo de produção. Assim, os parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal devem ser precisamente definidos e os procedimentos de preparação dos extratos adequadamente padronizados (LIANG; XIE; CHAN, 2004).

O gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae possui cerca de 630 espécies (DEGINANI, 1999) ocorrendo principalmente nas Américas (SACCO, 1980). O Centro-Norte do Brasil é a região de maior distribuição do gênero *Passiflora*, com cerca de 150 espécies nativas (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). Entre as espécies mais difundidas no Brasil está *P. alata*, sendo essa uma das espécies incluídas na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) e presente em diversos medicamentos no mercado nacional.

Para as espécies de *Passiflora*, embora diversos trabalhos correlacionem os flavonóides como compostos responsáveis pela atividade farmacológica, não foram encontradas publicações da influência do processo de extração e secagem no teor desses compostos.

Este estudo representa o primeiro trabalho de análise sistemática dos efeitos de diferentes métodos de extração (infusão, decocção, refluxo) e secagem (rotavapor, liofilização) no teor de VIT-R das folhas de *P. alata*.

## 6.2 Experimental

### 6.2.1 Reagentes químicos

Acetonitrila, ácido acético (grau P.A.) foram adquiridos da Tedia<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil). Água Ultra-pura foi obtida por sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA). Os padrões orientina ( $\geq 98\%$ ) e isoorientina ( $\geq 98\%$ ) foram adquiridos da Extrasynthèse<sup>®</sup>, vitexina ( $\geq 96\%$ ) e isovitexina ( $\geq 98\%$ ) da Fluka<sup>®</sup> enquanto vitexina 2"-O-ramnosideo foi adquirida da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Co. (St. Louis, EUA).

### 6.2.2 Material vegetal e preparação da amostra

Partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis foram coletadas no município de Urussanga/SC, em maio de 2010 e identificadas pelo Agrônomo Ademar Brancher (EPAGRI). Material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 37823). Após a coleta e identificação, as folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante sob temperatura não superior a 40°C por sete dias, moídas em moinho de facas e armazenadas à temperatura ambiente até a preparação dos extratos.

O material vegetal foi extraído com água na proporção droga: solvente (1:10, m/v) por 10 min., empregando diferentes métodos de extração: infusão (INF), decocção (DEC) e refluxo (REF). Após arrefecimento, os extratos foram filtrados e levados a secura por dois métodos distintos: evaporador rotatório (ROTA) (50°C) e liofilizador (LIOF).



### **6.3 Análise qualitativa e quantitativa em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A análise por CLAE foi realizada em equipamento PerkinElmer (série 200), com detecção por UV com arranjo de diodo (DAD). Todos os dados foram adquiridos empregando software TotalChrom<sup>®</sup>. Para análise cromatográfica foi utilizada coluna Brownlee RP-C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm). As amostras foram dissolvidas em ACN (10% em água) à 1 mg/mL e filtradas através de membrana Millipore de 0,45 μm. Uma alíquota de dez (10) μL de cada amostra foi injetada para análise. Como fase móvel foi empregada uma mistura composta por 20% de acetonitrila (solvente A) e 80% de ácido acético 1% em água (solvente B) na forma isocrática. A fase móvel foi preparada diariamente e deaerada por ultrassom. A vazão foi de 0,6 mL por minuto e os cromatogramas registrados a 340 nm, enquanto o espectro de UV foi monitorado em um intervalo de 700 a 200 nm. O constituinte majoritário foi caracterizado, considerando o tempo de retenção, os espectros de UV e por co-injeção com amostras autênticas. As soluções de VIT-R foram preparadas em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 40, 100, 150, 200 μg/mL). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de regressão de sete pontos ( $r^2 > 0,999$ ). Todas as soluções foram analisadas em triplicata e suas respectivas áreas foram mensuradas.

### **6.4 Validação e procedimento analítico**

Os parâmetros metodológicos avaliados e validados foram especificidade, linearidade, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD). Os parâmetros foram avaliados e validados de acordo com Cass, Degani (2001) e ICH (2005).

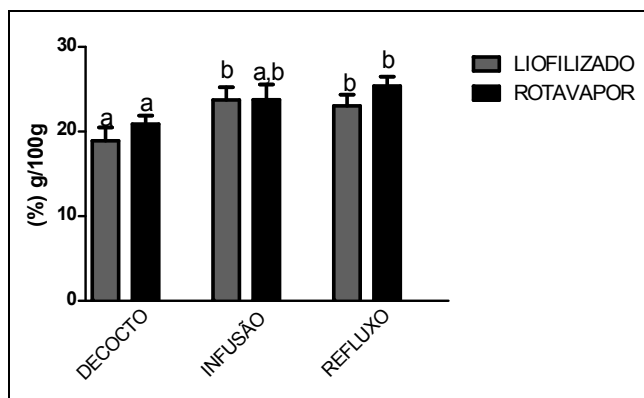
## 6.5 Análise estatística

As variações de flavonóides foram expressas como valores médios de triplicatas  $\pm$  DP. As diferenças entre os métodos foram comparadas por ANOVA de uma via ou duas vias seguido de pós-teste, Newman-Keuls (SNK) ou Bonferroni. Foram realizadas análises de dados usando o software GraphPad Prisma<sup>®</sup> (versão 5,00) (Mackiev<sup>TM</sup>) e a significância estatística foi a média e erro padrão da média, sendo  $P < 0,05$  aceito como sendo estatisticamente significativo.

## 6.6 Resultados e discussão

### 6.6.1 Rendimento

Ao avaliar os diferentes métodos de extração, detectou-se um maior rendimento (g extrato/100 g de folha seca) nas extrações por refluxo (25,37 g) e infusão (23,77 g) seguido do decocto (20,87 g), sendo esse último o que apresentou menor rendimento. Os processos de secagem, liofilização e rotavapor não apresentaram diferença significativa no rendimento em massa entre eles (Figura 41).

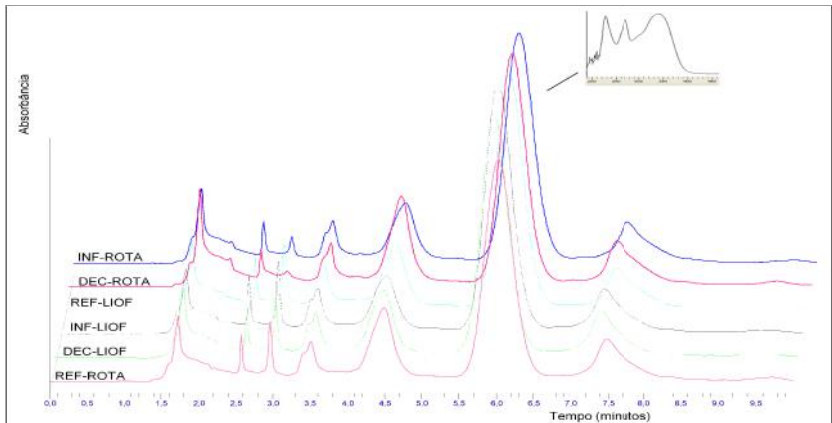


**Figura 41:** Rendimento entre os diferentes métodos de extração e secagem (ANOVA uma via/SNK,  $p < 0,05$ ). Os dados representam a média de três experimentos independentes. Letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas.

## 6.6.2 Perfil químico

Avaliando os compostos presentes em *P. alata* através de comparação com amostras autênticas pode se confirmar, como previamente citado por Langassner (2010), que o constituinte majoritário das folhas dessa espécie é VIT-R, sendo os flavonóides tipo C-glicosídeos isoorientina, orientina e isovitexina detectados em traços. Considerando que VIT-R não foi identificada em teores significativos em outras espécies de *Passiflora*, este composto pode constituir um eficiente marcador químico para *P. alata*, especialmente se for considerado a maior facilidade de detecção dos flavonóides quando comparados com compostos terpênicos, como o quadrangulosídeo, saponina majoritária descrita para *P. alata* e proposta pelos autores como marcador químico para a espécie (REGINATTO et al., 2004).

O perfil qualitativo de flavonóides manteve-se inalterado entre os diferentes métodos de extração e secagem avaliados (Figura 42).



**Figura 42:** Cromatogramas dos diferentes extratos das folhas de *P. alata* com detecção UV/DAD em  $\lambda = 340$  nm (condições cromatográficas, item 6.3).

### 6.6.3 Validação

A curva de calibração foi preparada com sete soluções-padrão na faixa de concentrações de 3,12-200 µg/mL. A curva foi construída através da relação das concentrações de soluções-padrão conhecidas (µg/mL) e suas respectivas áreas nos cromatogramas. As amostras apresentaram relação linear entre a concentração e a área do pico ( $r^2 > 0,999$ ). O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram definidos por DPR > 5% e por sinal: ruído; 3:1, respectivamente.

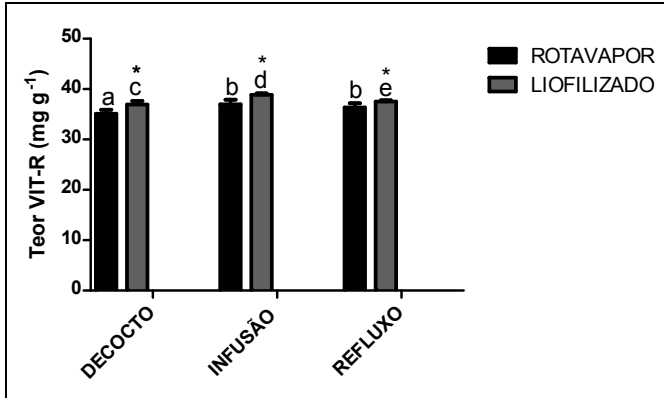
Determinou-se a repetibilidade e precisão intermediária (inter-dia) sendo ambas feitas em triplicata. O ensaio de repetibilidade avaliou amostras de solução-padrão de três concentrações diferentes. Observou-se uma boa repetibilidade, pois para todas as análises o DPR < 0,42%, esteve dentro do preconizado (CASS; DEGANI, 2001; ICH, 2005). Os extratos avaliados apresentaram boa exatidão (entre 99,9% à 102,2%) sendo essa determinada pela adição 200 µL de uma mistura de acetonitrila:água, (10:90 v/v) à 200 µL de amostra com a solução padrão. As amostras e soluções padrão com suas respectivas concentrações e recuperações médias e todos os outros valores de validação estão apresentados na Tabela 8.

Os resultados indicaram que o teor do composto VIT-R ( $\text{mg.g}^{-1}$  de extrato seco) é influenciado pelos métodos de extração e secagem do extrato, pois comparativamente, os processos de decocção, infusão e refluxo apresentaram diferenças significativa entre si (Figura 43).

**Tabela 8:** Resultados da validação

<b>VALIDAÇÃO</b>	<b>VIT-R</b>	<b>DEC-R</b>	<b>DEC-L</b>	<b>INF-R</b>	<b>INF-L</b>	<b>REF-R</b>	<b>REF-L</b>	<b>LIMÍTES</b>
Linearidade	0,9999	-	-	-	-	-	-	R>0,9990
Repetibilidade (µg/mL)	<u>25,0±0,42</u>	-	-	-	-	-	-	D.P.R. < 5%
MÉDIA ± D.P.R	<u>100,0±0,15</u>							
	<u>200,0±0,04</u>							
Precisão intermediária (µg/mL)	40,0±1,36	-	-	-	-	-	-	D.P.R. < 5%
MÉDIA ± D.P.R								
Exatidão (recuperação% )	-	99,9±	101,4±	102,2±	101,6±	103,2±	101,3±	100±5%
MÉDIA ± D.P.R.		0,2	0,2	0,2	0,1	1,1	0,3	
LQ (µg/mL)	1,56	-	-	-	-	-	-	-
LD (µg/mL)	0,39	-	-	-	-	-	-	-

\* A porcentagem de recuperação foi determinada através da injeção em triplicata de amostras contaminadas com soluções padrão.



**Figura 43:** Comparação do teor de VIT-R entre os diferentes métodos de extração e secagem (ANOVA uma via/SNK  $p < 0,05$ ), letras diferentes referem-se a diferenças estatísticas significativas, valores expressos em média  $\pm$ DP. Análise comparativa do mesmo método de extração seco de maneiras diferentes (ANOVA duas via/Bonferroni  $p < 0,05$ ,  $\pm$ DP,  $n = 9$ ), \* representa diferenças estatísticas significativas.

Bott et al (2010) também evidenciaram diferença nos extratos secos com diferentes processos tecnológicos. Segundo os autores há um perfil distinto de degradação para vitexina nos dois métodos de secagem avaliados (*spray* e *spotted bed-dried*) sendo que o método *spotted bed-dried* resultou também em um extrato com maior teor de flavonóides (10%) e menor teor de umidade (1,6%), o que sugere que o extrato seco por *spotted bed-dried* é mais estável.

No entanto, este estudo de estabilidade com extratos de folhas de *P. alata*, utiliza como marcador químico vitexina, embora este composto seja detectado somente em traços em *P. alata* (LANGASSNER, 2010; MÜLLER et al., 2005). Sabe-se que vitexina e vitexina-2"-O-ramnosídeo embora apresentem um açúcar de diferença na molécula e possuam polaridade semelhante e mesmo perfil no UV, são passíveis de separação por CLAE (LANGASSNER, 2010).

Neste âmbito, existem trabalhos na literatura avaliando métodos de extração e secagem adequados para se obter um maior teor de compostos de interesse em derivados de droga vegetal.

Komes e colaboradores (2010) caracterizaram a eficiência da extração e estabilidade de compostos bioativos do chá verde durante a sua preparação. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas na composição química destes chás e, por conseqüência, suas propriedades farmacológicas dependem fortemente das condições de extração.

O efeito de cinco métodos de secagem das folhas de diferentes espécies de gengibre sobre as propriedades antioxidantes foi investigado. Todos os métodos de secagem térmica (microondas, forno e secagem ao sol) resultaram em uma redução significativa do teor de fenólicos totais, enquanto as secagens não térmicas (liofilização e ao ar livre) resultaram em maior atividade antioxidante e no teor de fenólicos totais (CHAN et al., 2009).

O método mais eficiente para obter altos teores de flavonóides em extratos de folhas frescas de *Cosmos caudatus*, foi decocção em água. Os autores verificaram também que a temperatura de secagem das folhas (entre 30 e 100°C) afeta o teor de flavonóides de folhas de *Cosmos caudatus* (SUKRASNO et al., 2011). Porém, tanto Chan et al (2009) quanto Sukrasno et al (2011) avaliam a influência do processo de secagem das folhas e não de extrato frente seus constituintes como realizado nesse trabalho.

Já Raal e Kuznetsova (2007) analisaram a interferência de diferentes métodos e tempo de extração (infusão, decocção, *Thermos bottle*) no teor de compostos ativos de diferentes espécies vegetais. Os autores concluíram que cada metabólito exige métodos distintos para se obter um melhor rendimento, pois para a espécie vegetal avaliada o maior teor de flavonóides foi assegurado pela extração de 12h em *Thermos bottle*.

O rendimento de hiperosideo, vitexina e vitexina-2"-O-ramnosideo de *Crataegus monogyna* foi avaliado em diferentes modos de extração (soxhlet, maceração, ultrassom e microondas) comparando esses métodos sobre diversas condições experimentais (variando solvente, temperatura e tempo). Os resultados indicaram que o melhor método para extração desses compostos foi por microondas, com 50% MeOH em água à 120°C e 120 W (MARTINO et al., 2008).

Os resultados relatados nesse trabalho e nos artigos descritos acima demonstram um impacto significativo das condições de extração e secagem sobre as propriedades do produto confirmando a real necessidade de mais pesquisas voltadas a esta temática.

## **6.7 Conclusão**

O método de extração mais adequado para se obter extratos ricos em VIT-R é a infusão e o método de secagem mais apropriado para todos os extratos avaliados é liofilização.

Este estudo é o primeiro a relatar que o extrato seco por liofilização apresenta um maior teor de VIT-R comparado ao rotavapor.

Estudos de estabilidade posteriores devem ser feitos para afirmações mais precisas sobre possíveis modificações sofridas pelo flavonóide avaliado nos diferentes processos empregados.



## 6.8 Referências

BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**. v. 28, n. 11, p. 1255-1265, 2010.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Paulo: UFSCar, 2001. 77 p.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**. v. 113, n. 1, p. 166-172, 2009.

DEGINANI, N. B. Passifloraceae. In: **Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II (Dicotyledoneae)**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1999. v.74, p.908-910.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. In: **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: uma visão geral**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005, p.187-202.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa. 2010. 836 p.

ICH. **International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2(R1)**. London. Disponível em: <[www.ich.org/UrlGrpServer.html](http://www.ich.org/UrlGrpServer.html)>. Acesso em: junho de 2009.

KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**. v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010.

LANGASSNER, S. M. Z. **Avaliação da Composição Química e Atividades Farmacológicas de Espécies de Passiflora** (Doutorado em Farmácia). 2010. 131 p. Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2010.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of chromatography B**. v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.

MARTINO, E.; COLLINA, S.; ROSSI, D.; BAZZONI, D.; GAGGERI, R.; BRACCO, F.; AZZOLINA, O. Influence of the extraction mode on the yield of hyperoside, vitexin and vitexin-2-O-rhamnoside from *Crataegus monogyna* Jacq. (Hawthorn). **Phytochemical Analysis**. v. 19, n. 6, p. 534-540, 2008.

MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.

RAAL, A.; KUZNETSOVA, I. The effect of the method and duration of extraction on the content of biologically active compounds in herbal teas. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences**. v. 56, n. 1, p. 53-56, 2007.

RAGHAVAN, G. S. V.; ORSAT, V. Electro-technology in drying and processing of biological materials. **Proc. 11th Int. Drying Symp.** v., p. 73-84, 1998.

REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPEMA, J.; SCHENKEL, E. P. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 3, p. 195-197, 2004.

SACCO, J. C. **Passifloráceas**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, 1980. 132 p.

SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Powder properties and system behavior during spray drying of *Bauhinia forficata* link extract. **Drying Technology**. v. 24, n. 6, p. 735-749, 2006.

SUKRASNO, S.; FIDRIANY, I.; ANGGADIREDA, K.; HANDAYANI, W. A.; ANAM, K. Influence of drying method on flavonoid content of *Cosmos caudatus* (Kunth) leaves. **Research Journal of Medicinal Plant**. v. 5, n. 2, p. 189-195, 2011.

---

---

## Discussão geral

---

---



## 7. DISCUSSÃO GERAL

Entre as espécies mais difundidas no Brasil temos *P. alata* e *P. edulis* sendo os frutos dessa última amplamente empregada na preparação de sucos (especialmente *P. edulis* var. *flavicarpa*), enquanto os frutos de *P. alata* são mais consumidos *in-natura*. O uso do chá das folhas dessas espécies é popularmente utilizado principalmente como remédio calmante e tranqüilizante. Essas duas espécies e também *P. incarnata* encontram-se presentes em várias formulações fitoterápicas.

As espécies selecionadas para a elaboração da revisão da literatura (apêndice 1 e 2) foram escolhidas devido o interesse do nosso grupo de pesquisa por espécies difundidas na Colômbia, por possuímos um convênio bilateral com a Universidad de Bogotá. Atualmente dois doutorandos desenvolvem pesquisas com espécies de *Passiflora* dessa região focando em atividade no sistema nervoso central e investigação dos constituintes químicos dessas espécies.

*P. tripartita*, *P. quadrangularis* e *P. ligularis* são freqüentemente usadas na preparação de sucos e sobremesas na Colômbia, sendo que em 2005 a INVIMA órgão regulador da Colômbia, aprovou preparações farmacêuticas dessa espécie como sedativo e hipnótico (COLÔMBIA, 2009).

Especificamente *P. alata*, espécie central do presente trabalho, possui nove flavonóides e cinco saponinas relatadas, entre as atividades descritas as que possuem mais relatos são as atividades sobre o SNC. No entanto, assim como para outras espécies, não existe um consenso sobre quais compostos ou classes de compostos são responsáveis por determinada atividade. Embora alguns autores descrevam os compostos C-glicosídeos como responsáveis pelas atividades (COLETA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; ZUCOLOTTO et al., 2009b), existem na literatura trabalhos que reforçam a hipótese de ação sinérgica entre os compostos (WAGNER, 2011).

De todas as partes aéreas de *P. alata* avaliadas por CLAE-DAD, o pericarpo foi o que apresentou a maior variedade de flavonóides, estando presentes os flavonóides já descritos para as folhas (isoorientina, orientina, vitexina-2"-O-ramnosideo, isovitexina), mas em concentrações inferiores. Pode-se observar também que o flavonóide majoritário das folhas (vitexina-2"-O-

ramnosideo) não é o composto majoritário detectado nas outras partes investigadas.

Ao comparar as diferentes partes por CCD pode-se observar um perfil distinto para compostos terpênicos polares, revelados com anisaldeído sulfúrico (AS), estando esses compostos em maior quantidade nas folhas e pericarpo de *P. alata*.

Além dos compostos flavonóidicos previamente descritos para as folhas de *P. alata*, essa possui uma substância, mais apolar de núcleo luteolina, que não foi identificada pelos métodos aqui empregados.

Foi mensurado o teor de compostos fenólicos nas diferentes partes aéreas de *P. alata*. De todas as partes avaliadas a semente foi a que apresentou o teor mais elevado (3,93 g EAG /100 g de extrato) tornando-a promissora para análises químicas e biológicas futuras.

A vitexina-2"-*O*-ramnosideo, flavonóide majoritário das folhas de *P. alata*, foi isolado do pericarpo de *P. alata*, fato ainda não descrito na literatura para essa parte da planta.

Das folhas de *P. alata* foi isolado uma saponina de núcleo ciclolanostano e com três açúcares ligados á aglicona, para a qual foram propostas três estruturas. No entanto, mais experimentos devem ser feitos para confirmar a posição dos açúcares e estabelecer a correta estrutura para o composto.

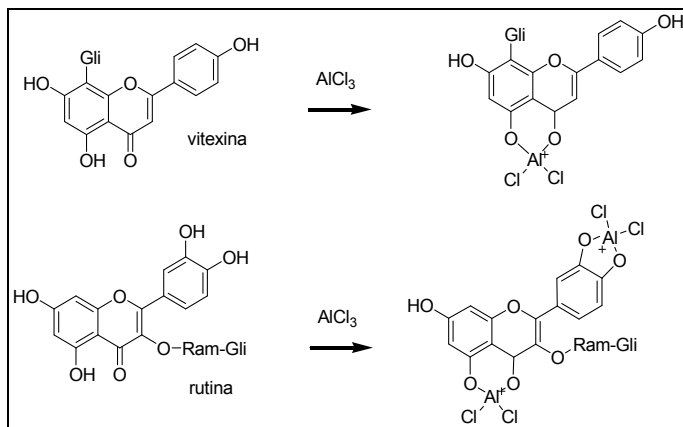
Em parceria com o Laboratório coordenado pela Prof. Dr. Thereza Christina Monteiro de Lima a aluna de doutorado Andressa Gazola orientada pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e co-orientada pela Profa. Dra. Thereza, avaliou o extrato obtido por infusão aquosa das folhas e frutos de *P. alata* sobre atividade hipno-sedativa, pelo modelo do sono induzido por éter etílico. Os resultados desses ensaios segerem atividade hipno-sedativa promissora do pericarpo de *P. alata*, o qual foi mais efetivo quando comparado aos extratos das outras partes avaliadas.

Especificamente sobre o capítulo que avaliou a influência dos processos de extração e secagem no perfil de flavonóides e teor de vitexina-2"-*O*-ramnosideo alguns estudos relacionados estão compilados no capítulo IV e discutidos abaixo.

Bott et al. (2010) realizaram um estudo de estabilidade com extratos das folhas de *P. alata*, no qual utilizaram a vitexina como marcador químico, afirmando ser esse o constituinte

majoritário das folhas. No entanto, sabe-se que vitexina é encontrada somente em traços na *P. alata* (MÜLLER et al., 2005). Outro fato destacado pelos autores foi a utilização de rutina como substância de referência, a qual possui menor custo quando comparada à vitexina (padrão indicado nas Farmacopéias Francesa e Européia) e também, segundo os autores, com estrutura química próxima aos flavonóides glicosilados presentes nas espécies estudadas (CHABARIBERI et al., 2009).

No caso de doseamentos realizados em espectrofotômetro UV, sabe-se que a rutina trata-se de um flavonol glicosilado derivado da quercetina enquanto a vitexina pertence à classe das flavonas do tipo apigenina. Logo, vitexina possui apenas um local para formação de quelatos, sendo esses complexos envolvendo a carbonila cetônica (C-4) e hidroxila vicinal (C-5) com o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) ao contrário do observado para a rutina (Figura 44). Essa complexação causa um deslocamento batocrômico, o qual depende do padrão de oxidação dos flavonóides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Em 1960 Christ e Muller preconizaram a utilização do  $\text{AlCl}_3$  para doseamento de flavonóides, mas para um método especificamente desenvolvido para o doseamento de flavonóis. Para cada extrato é recomendável aperfeiçoar as condições de reação, considerando o tempo de reação e a concentração de  $\text{AlCl}_3$ , além de outros fatores pertinentes (PETRY et al., 1998).



**Figura 44:** Formação de quelatos da vitexina e da rutina com  $\text{AlCl}_3$  (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Ao avaliar a influência de diferentes métodos de extração (infusão, decocção, refluxo) das folhas e secagem (liofilização e rotavapor) dos extratos de *Passiflora alata* Curtis, constatou-se que o método de extração mais adequado para se obter extratos com maior teor de VIT-R é a infusão e o método de secagem mais apropriado para todos os extratos avaliados é liofilização.

Komes et al. (2010) caracterizaram a estabilidade de compostos bioativos do chá verde durante a sua preparação, todos por infusão variando a temperatura da água, tempo e extrações múltiplas. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas na composição química destes chás disponíveis comercialmente na Europa, onde a extração máxima dos compostos foi alcançada durante a extração aquosa a  $80^\circ\text{C}$ , por 5' (pó), 15' (empacotado) e 30' (folhas soltas).

Embora o chá verde seja uma rica fonte de compostos bioativos, polifenóis e metilxantinas (KOMES et al., 2010) a eficiência da extração destes compostos e, por consequência das suas propriedades farmacológicas, depende fortemente das condições de extração.

Os resultados relatados no capítulo IV e nos artigos descritos demonstram um impacto significativo das condições de extração e secagem sobre as propriedades do produto, confirmando a real necessidade de mais pesquisas voltadas a esta temática.



---

---

## CONCLUSÕES

---

---



## 8. CONCLUSÕES

- Os metabólitos secundários mais descritos para o gênero são os flavonóides, as saponinas e os alcalóides, sendo a presença dos alcalóides controversa.
- Dentre as atividades mais descritas para as espécies de *Passiflora* destacam-se as sobre o SNC.
- De todas as partes aéreas de *P. alata* avaliadas por CLAE-DAD, o pericarpo foi o que apresentou a maior variedade de flavonóides, estando presentes os flavonóides já descritos para as folhas (isoorientina, orientina, vitexina-2"-O-ramnosideo, isovitexina), mas em concentrações inferiores.
- O flavonóide majoritário detectados para das folhas (vitexina-2"-O-ramnosideo) não é o composto majoritário detectado para as demais partes investigadas.
- A fração *n*-BuOH da semente apresentou um composto majoritário com perfil característico de derivado cafeoilquínico.
- Das partes aéreas avaliadas a semente foi a que apresentou maior teor de fenólicos.
- Foi isolado do pericarpo de *Passiflora alata*, o flavonóide vitexina-2"-O-ramnosideo, substância previamente descrita para as folhas de *P. alata* e ainda não relatada para o fruto desta espécie.
- A partir das folhas de *Passiflora alata* foi isolada uma saponina (R9) para a qual é possível afirmar:
  - a aglicona desse composto é o 9,19-ciclolanostano.
  - existem 3 moléculas de glicose na estrutura dessa substância, sendo uma ligada ao C3 e outro ao C26.
- O método de extração mais adequado obtenção de extratos ricos em VIT-R é a infusão e o método de secagem mais apropriado para todos os extratos avaliados é liofilização.



---

---

## PERSPECTIVAS

---

---



## 9. PERSPECTIVAS

Investigar atividade antioxidante das sementes devido seu alto teor de compostos fenólicos. Isolar e Identificar o composto majoritário presente na semente de *P. alata*

Identificar os compostos majoritários do pericarpo de *P. alata* através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a massas no intuito de focar no isolamento de compostos inéditos.

Definir a estrutura do composto R9a e elaborar uma proposta de publicação com os constituintes isolados da folha e pericarpo de *P. alata* junto com atividade hipno-sedativa apresentada pelo pericarpo.

Realizar estudos de estabilidade posteriores visando avaliar possíveis modificações estruturais sofridas pelos compostos sob diferentes processos de extração e secagem.





---

---

## REFERÊNCIAS

---

---



## 10. REFERÊNCIAS

BADE, R.; CHAN, H. F.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 12, p. 5646-5652, 2010.

BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**. v. 28, n. 11, p. 1255-1265, 2010.

BRASIL. **Consulta de medicamentos**. Disponível em: [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp). Acesso em: 23 de fev de 2011.

CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F. Morfologia Externa e Taxonomia. In: BRUCKNER, C.; PICANÇO, M. **Maracujá. Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Agroindústria, Mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.33-49.

CHABARIBERI, R. D. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**. v. 113, n. 1, p. 166-172, 2009.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; DE LIMA, T. C. M.; DA CUNHA, A. P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 12, p. 1067-1073, 2006.

COLÔMBIA. **Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos**. Disponível em: <http://www.invima.gov.co/Invima/normatividad/farmaceuticas.jsp?digo=190>. Acesso em: 29 de maio de 2009.

DEGINANI, N. B. Passifloraceae. In: ZULOAGA, F. A.; MORRONE, O. **Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II**

- (Dicotyledoneae)**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1999. v.74, p.908-910.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3 ed. Stransbour: Council of Europe. 1996. 1234 p.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: uma visão geral**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.187-202.
- FARMACOPEA ESPAÑOLA.**Real Farmacopea Española**. 3 ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.p.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa. 2010. 836 p.
- FARMACOPEIA PORTUGUESA. VII ed. Lisboa: 2002.p.
- GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 100, n. 1-2, p. 43-49, 2005.
- GONZÁLEZ-ORTEGA, G. S., E. P.; ATHAYDE, M. L.; MENTZ, L. A. Brasilianische Phytotherapeutika. Ihre Rolle im Arzneimittelmarkt. **Deutsche Apotheker Zeitung**. v. 35, p. 1847-1848, 1989.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: [www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja\\_Brasil\\_2007.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2007.pdf). Acesso em: 20 abril de 2009.
- KOMES, D.; HORZIC, D.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; VULIC, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**. v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010.
- LEONEL, S.; SAMPAIO, A. C. **Maracujá doce**. v 1. São Paulo: Unesp, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970. 354 p.

- MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização em São Paulo**: Campinas: IAC, 1996. 26 p.
- MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; AZEVEDO FILHO, J. A.; MARTINS, A. L. M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**: Algomic-Michigan: Reference Publications, 2000.
- MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, n. 2, p. 399-403, 2005.
- PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos hidroalcoolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 79, p. 7-10, 1998.
- PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.
- REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEF, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.
- SACCO, J. C. **Passifloráceas**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, 1980. 132 p.
- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 7, n. 3, p. 283-294, 2010.
- SANTOS, K. C.; KURTZ, S. M. T. F.; MÜLLER, S. D.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R. M. M. W.; SANTOS, C. A. M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, p. 565-573, 2006.

SOARES, E. L. C.; VENDRUSCOLO, G. S.; EISINGER, S. M.; ZÁCHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. I–Origem e fluxo do conhecimento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 6, n. 3, p. 69-95, 2004.

SUKRASNO, S.; FIDRIANY, I.; ANGGADIREDDA, K.; HANDAYANI, W. A.; ANAM, K. Influence of drying method on flavonoid content of *Cosmos caudatus* (Kunth) leaves. **Research Journal of Medicinal Plant**. v. 5, n. 2, p. 189-195, 2011.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**. v. 82, p. 34-37, 2011.

YOSHIMITSU, H.; NISHIDA, M.; NOHARA, T. Two new cycloartane glycosides from the underground parts of *Aquilegia vulgaris*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 56, n. 11, p. 1625-1627, 2008.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**. v. 75, p. 1221-1226, 2009.

---

---

## APÉNDICES

---

---





## APÊNDICE I

ESPÉCIE		CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. actinia</i>		Folhas		isoschaftosideo; isovitexina, schaftosideo	(ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002)
				isovitexina	(SANTOS et al., 2006)
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	Flavonóides	Folhas	luteolina-6-C-fucosídeo e luteolina-6-C-quinovosídeo	(MARECK et al., 1991)
				6,8-di-C-glicosilcrisina, isoorientina, spinosina, vicensina-2	(ZUCOLOTTO et al., 2009b)
			Fruto	flavonóides	(LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975)
			Pele	isoorientina e isovitexina	(ZERAIK; YARIWAKE, 2010)
	Polpa		isoorientina e isovitexina	(ZERAIK; YARIWAKE, 2010).	
var. <i>edulis</i>		Fruto	flavonóides totais	(LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975)	

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA	
<i>P. edulis</i>	<i>var. edulis</i>	Flavonóides	Pericarpo	ácido edulínico, ácido protocatéquico, catequina, cianidina-3-O-glicosídeo, epicatequina, kaempferol, kaempferol-3-O-glicosídeo, luteolina-8-C-neohesperosídeo, luteolina-8-C-digitoxosídeo, prunasina, quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo	(ZIBADI et al., 2007)
	<i>var. não especificada</i>	Flavonóides	Folhas	isovitexina, orientina, rutina e vitexina	(MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997)
isoorientina, isovitexina, orientina, vitexina				(PETRY et al., 1998)	
isoorientina, orientina, rutina, vitexina				(PEREIRA et al., 2004)	
Pericarpo			C-deoxihexosil flavona	(FERRERES et al., 2007a)	
				ácido- $\gamma$ -aminobutírico, luteolina, luteolina-6-C-glicosídeo (isoorientina)	(ICHIMURA et al., 2006)

ESPÉCIE		CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	var. não especificada	Alcalóides	Diferentes partes aéreas	Presença de alcalóides (expressos em harmana) em todas as partes da planta, exceto nas folhas	(LUTOMSKI; MALEK, 1976)
				harmana, harmina, harmalina e harmol	(LUTOMSKI; MALEK, 1975).
	var. <i>flavicarpa</i>	Triterpenos	Folhas	$3\beta$ , $16\beta$ -diacetoxiurs-12-eno	(ZUCOLOTTO; PALERMO; SCHENKEL, 2006)
	var. não especificada			passiflorina (28-O- $\beta$ -D-glicosilpiranosilester do ácido (22R), (24S)-22,31-epoxi-24-metil- $1\alpha$ , $3\beta$ , 24, 31-tetrahidroxi-9, 19-ciclo- $9\beta$ -lanostano-20-óico). Também isolada por Yoshikawa et al. (2000a).	(BOMBARDELLI et al., 1975)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA	
<i>P. edulis</i>	var. não especificada	Triterpenos	Folhas	Quatro triterpenóides cicloartano: ácido ciclopasifloico A (1), B (2), C (3) e D (4), e seis saponinas, denominadas ciclopasiflosídeos I, II, III, IV, V, VI.	(YOSHIKAWA et al., 2000a)
				Três cicloartano triterpenico (E, F, G) e suas saponinas denominadas ciclopasiflosídeos codificadas VII, VIII, IX, X e XI	(YOSHIKAWA et al., 2000b)
	var. <i>edulis</i> e var. <i>flavicarpa</i>	Terpenos	Polpa	2,5-dimetil-4-hidroxi-3-(2H) furanona (furaneol). Vários terpenos diois: 2,6-dimetil-1,8-octanediol ( <i>E</i> ) e ( <i>Z</i> )-2,6-dimetilocta-2,7-dien-1,6-diol, 2,6-dimetilocta-3,7-dien-2,6-diol e 2,6-dimetilocta-1,7-dien-3,6-diol, $\alpha$ -ionol e $\beta$ -ionol norisoprenoides	(CHASSAGNE; BOULANGER; CROUZET, 1999)

ESPÉCIE		CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	Glicosídeos cianogênicos	Folhas	$\beta$ -D-glicopiranosídeo e $\alpha$ -L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo	(CHASSAGNE; BOULANGER; CROUZET, 1999)
			Todas as partes	Glicosídeos cianogênico em todas as partes exceto nas sementes.	(SPENCER; SEIGLER, 1983)
	var. <i>edulis</i>		Folhas e polpa	<i>R</i> -L-arabinopiranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de linalool, benzil álcool e 3-metilbut-2-en-1ol.	(CHASSAGNE et al., 1995)
	var. não especificada		Fruto	mandelonitrilo $\beta$ -rutinosídeo (( <i>R</i> )-mandelonitrilo- $\alpha$ -L-ramnopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) e passiedulina	(CHASSAGNE et al., 1998)
			Polpa	Glicosídeos cianogênicos: (2 <i>R</i> )- $\beta$ -D-alopiranosiloxi-2-fenilacetonnitrila e (2 <i>S</i> )- $\beta$ -D-allopiranosiloxi-2-fenilacetonnitrila	(SEIGLER et al., 2002)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA	
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	Compostos voláteis	Polpa	96 compostos foram identificados, entre eles 2-metilbutil hexanoato, hexil hexanoato; 1,3-dimetil bezeno.	(JORDÁN; GOODNER; SHAW, 2002)
	var. <i>flavicarpa</i>	Compostos voláteis	Fruto	48 compostos: os predominantes pertencem a classe de ésteres (59,24%)	(NARAIN et al., 2004)
	var. <i>edulis</i>		-	3-hidroxi-retro- $\alpha$ -ionol	(HERDERIEH; WINTERHALTER, 1991)
	var. <i>edulis</i>	Compostos voláteis	Polpa	6-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosideo de linalol, benzil 6-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosideo e 3-metil-but-2-en-1-ol-6-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosideo	(CHASSAGNE et al., 1995)
	var. <i>flavicarpa</i>	Carotenóides	Polpa	$\gamma$ -caroteno, 13-E- $\beta$ -caroteno, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, <i>cis</i> - $\zeta$ -caroteno, $\beta$ -criptoxantina, prolicopeno, nerospreno	(DA SILVA; MERCADANTE, 2002)

ESPÉCIE		CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	var. <i>edulis</i>	Proteína	Polpa	passiflim	(LAM; NG, 2009)
	var. não especificada	Tioester	Semente	tioésteres	(TAPP et al., 2008)
	var. <i>flavicarpa</i>	Fibras	Pericarpo	fibras	(YAPO, 2009)
		Ácido graxo	Semente	ácido graxo	(SANT'ANNA; TORRES; PORTO, 2001)
	var. não especificada	Carotenóides	-	anteraxantina, $\beta$ -caroteno, $\zeta$ -caroteno, $\beta$ -citraurina, $\beta$ -criptoxantina, fitoeno, fitoflueno, neurosporeno, licopeno, prolicopeno, monoepoxi- $\beta$ -caroteno, violaxantina	(MERCADANTE; BRITTON; RODRIGUEZ-AMAYA, 1998)
			Polpa	$\beta$ -apocarotenol, $\alpha$ -carotene, $\gamma$ -carotene, $\alpha$ -cryptoxanthin	(GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA, 1994)
	Antocianidinas	Casca	cianidina 3-glicosido, cianidina 3-(6"-malonilglicosido) e pelargonidina-3-glicosido	(KIDOY et al., 1997)	
<i>P. foetida</i>		Folhas		passicol	(BIRNER; NICOLLS, 1973)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE	FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. foetida</i>	Folhas	Ácido graxo linoleico	(HASAN et al., 1980)
		flavonoides: 7,4'-dimetoxiapigenina, 4',7-O-dimetil-naringenina, 3,5-dihidroxi-4,7-dimetoxi flavanona, ermanin, pacipodol,	(ECHEVERRI; SUAREZ, 1985)
		flavonóide apigenina, C-glicosil crisoeriol, isovitexina, kaempferol, luteolina-7-β-D-glicosideo, vitexina, 2'-xilosilvitexina	(ULUBELEN, 1982)
		flavonóide ermanin	(ECHEVERRI et al., 1991)
		cianohidrina glicosilada: deidaclina, tetrafilina A, tetrafilina B, sulfato de tetrafilina B e volcenina	(ANDERSEN; ADSERSEN; JAROSZEWSKI, 1998)
		Policetideos α-piranos: passifloricins (A, B e C)	(ECHEVERRI et al., 2001)



ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. foetida</i>	Folhas		schaftosideo, isoschaftosideo; isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina	(ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002)
			vitexina	(PONGPAN; LUANRATANA; SUNTORNSUK, 2007)
	Partes aéreas		flavonóides totais e taninos totais	(DE SOUSA ARAÚJO et al., 2008)
<i>P. incarnata</i>	Flavonóides	Folhas	apigenina, kaempferol, luteolina, quercetina	(GAVASHELI; MONIAVA; ERISTAVI, 1974)
			C-glicosil-vitexina, isovitexina	(LUTOMSKI et al., 1981)
			vicenin-2	(GEIGER; MARKHAM, 1986)
			isoschafitosideo, isovitexina-2''-O-glicopiranosideo e isoorientina-2''-O-glicopiranosideo, schafitosideo	(QIMIN et al., 1991)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	Flavonóides	Folhas	isorientina, isovitexina, isoschaftosideo, schaftosídeo e swertisina	(REHWALD; MEIER; STICHER, 1994)
			isovitexina, orientina, rutina e vitexina	(MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997)
			isorientina, isovitexina, orientina, vitexina	(SOULIMANI et al., 1997)
			isoscoparina-2"-O-glicosídeo	(RAHMAN et al., 1997)
			apigenina-6-C-glicosil-8-β-D-ribo-furanosídeo, isorientina, isorientina-2"-O-β-D-glicopiranosídeo, isoscoparina-2"-O-β-D-glicopiranosídeo, isovitexina-2"-O-β-D-glicopiranosídeo, isoschafitosídeo, isovitexina, lucenina-2, orientina, schafitosídeo, swertsina, vicenina-2, vitexina	(MARCHART; KRENN; KOPP, 2003)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	Flavonóides	Folhas	apigenina-7-glicosídeo, escoparina, isoorientina-2-O-glicosídeo, orientina, isoschafitosídeo, isoscoparina, isoorientina, isovitexina, isovitexina-2-O-glicosídeo, lucenina-2, schafitosídeo, swertisina, vicenina-2, vitexina	(VOIRIN et al., 2000)
			isoorientina, orientina, rutina, vitexina	(PEREIRA et al., 2004)
			isoorientina-2"-O-β-D-glicopiranosídeo, isoorientina, isoschafitosídeo, isovitexina-2"-O-β-D-glicopiranosídeo, orientina, schafitosídeo, swertisina, isovitexina, vicenina-2, vitexina	(RAFFAELLI et al., 1997)
			homoorientina, isovitexina, orientina, vitexina	(GRUNDMANN et al., 2008)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	Flavonóides	Folhas	apigenina, isoorientina-2"- O- $\beta$ - glicopiranosídeo, isoorientina, isoshaftosídeo, isovitexina, isovitexina-2"-O- $\beta$ -glicopiranosídeo, orientina, quercetina, vitexina, vicenina-2 e sete compostos não identificados	(ELSAS et al., 2010)
		Folhas, pecíolos e gavinhas	isovitexina, isoschafitosídeo, schafitosídeo, swertisina, vitexina	(WOHLMUTH et al., 2010)
	Alcalóides	Folhas	harmana, harmalina, harmalol, harmina e harmol	(POETHKE; SCHWARZ, 1970)
			harmana, harmina	(BENNATI, 1971 )
Traços de alcalóides harmanicos			(REHWALD; STICHER; MEIER, 1995)	
			harmana, harmalina, harmalol, harmina e harmol	(SOULIMANI et al., 1997)
<i>P. incarnata</i>	Alcalóides		alcalóides $\beta$ -carbolínico	(TSUCHIYA et al., 1999)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE		FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	Maltol	Folhas	$\gamma$ - benzo-pirona	(AOYAGI; KIMURA; MURATA, 1974)
			maltol	(SOULIMANI et al., 1997)
	Carboidratos		rafinose, sacarose, D-glicose e D-sacarose	(GAVASHELI; MONIAVA; ERISTAVI, 1975)
	Óleo essencial		ácido 2-hidroxi-benzoico metil-éster, $\alpha$ -bergamotol, benzil-alcool, linalol, carvona, eugenol, 2-fenil-etil-alcool, fitol, isoeugenol, $\beta$ -ioneno e trans-anetol	(BUCHBAUER et al., 1992)
	Aminoácidos		Vinte e um aminoácidos	(GAVASHELI; MONIAVA; ERISTAVI, 1974)
	Glicosídeos cianogênico		ginocardin	(SPENCER; SEIGLER, 1984)
<i>P. ligularis</i>	Polpa	vários compostos voláteis foram isolados, dentre eles os majoritários foram: eugenol, 2-feniletanol, metil salicilato	(CHASSAGNE; BOULANGER; CROUZET, 1999)	

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE	FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. ligularis</i>	Pele do fruto	polissacarídeo, diferentes resíduos de açúcares ligados a esse polissacarídeo: galactose, galactosamina, glicose, xilose	(TOMMONARO et al., 2007)
<i>P. quadrangularis</i>	Folhas	9,19-ciclolanostano-24Z-en-3 $\beta$ ,21,26-triol-3,26-di-O-gentiobiosídeo	(ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985)
		9,19-ciclolanostano-22,25-epoxi-3 $\beta$ -21,22(R)-triol-3 $\beta$ -O-gentiobiosídeo, 9,19-ciclolanostano-21,24-epoxi-3 $\beta$ -25,26-triol-3 $\beta$ -O-gentiobiosídeo e ácido oleanólico -3-sophorosídeo	(ORSINI et al., 1987)
<i>P. quadrangularis</i>	Folhas	Sulfato éster de tetrafilina B (1S, 4S)-1-( $\beta$ -D-glicopiranosiloxi)-4-hidroxi-2-ciclopenteno-1-carbonitrila-4-O-sulfato.	(JAROSZEWSKI; FOG, 1989)
	Polpa	(3E)-3,7-dimetil-3-octano-1,2,6,7-tetraol	(OSORIO et al., 1999)

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE	FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. quadrangularis</i>	Polpa	Monoterpenóides: ácido (2E)-2,6-dimetil-2,5-heptadienoico (1), β-D-glicopiranosil éster (2), (5E)-2,6-dimetil-5,7-octadiene-2,3-diol (3) e (3E)-3,7-dimetil-3-octano-1,2,6,7-tetrol (4); 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona β-D-glicopiranosídeo	(OSORIO; DUQUE; FUJIMOTO, 2000)
		Constituintes voláteis	(OSORIO et al., 2001)
<i>P. tripartita var molissima</i>	Folhas	isovitexina	(ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002)
<i>P. tripartita var molissima</i>	Folhas	orientina	(RAMOS et al., 2010)
	Polpa	β-D- glicopiranosídeo	(CHASSAGNE et al., 1998)
geraniol; (Z)-2,6-dimetilocta-2,7-dien-1,6-diol; norisoprenoide		(CHASSAGNE; BOULANGER; CROUZET, 1999)	

ESPÉCIE	CLASSE / PARTE	FITO CONSTITUINTE	REFERÊNCIA
<i>P. tripartita</i> var <i>molissima</i>	Fruto	Constituintes voláteis	(FROEHLICH; DUQUE; SCHREIER, 1989)



## Referência

- ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**. v. 40, n. 2, p. 81-91, 2002.
- ANDERSEN, L.; ADSESEN, A.; JAROSZEWSKI, J. W. Cyanogenesis of *Passiflora foetida*. **Phytochemistry**. v. 47, n. 6, p. 1049-1050, 1998.
- AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 22, n. 5, p. 1008-1013, 1974.
- BENNATI, E. Quantitative determination of harman and harmine in *P. incarnata* extract **Bollettino Chimico Farmaceutico** v. 110, p. 664-669, 1971
- BIRNER, J.; NICOLLS, J. M. Passicol, an antibacterial and antifungal agent produced by *Passiflora* plant species: preparation and physicochemical characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 3, n. 1, p. 105-109, 1973.
- BOMBARDELLI, E.; BONATI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G.; DANIELI, B. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**. v. 14, n. 12, p. 2661-2665, 1975.
- BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; REMBERG, B.; REMBERG, G.; NINIFOROV, A. Head space analysis of the dried herb of passion flower (Herba Passiflorae) and dried flowers of lime tree (Flores Tiliae). **Flavor Fragrance Journal**. v. 7, p. 329-332, 1992.
- CHASSAGNE, D.; BOULANGER, R.; CROUZET, J. Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. **Food Chemistry**. v. 66, n. 3, p. 281-288, 1999.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L. Identification of passion fruit glycosides by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 10, p. 4352-4357, 1998.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J.; BAYONOVE, C. L.; BRILLOUET, J. M.; BAUMES, R. L. 6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides as

- aroma precursors from passion fruit. **Phytochemistry**. v. 41, n. 6, p. 1497-1500, 1995.
- DA SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. Composição de Carotenóides de Maracujá-amarelo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, n. 3, p. 254-258, 2002.
- DE SOUSA ARAÚJO, T. A.; ALENCAR, N. L.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- ECHEVERRI, F.; ARANGO, V.; QUIONES, W.; TORRES, F.; ESCOBAR, G.; ROSERO, Y.; ARCHBOLD, R. Passifloricins, polyketides  $\alpha$ -pyrones from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry**. v. 56, n. 8, p. 881-885, 2001.
- ECHEVERRI, F.; CARDONA, G.; TORRES, F.; PELAEZ, C.; QUIÑONES, W.; RENTERIA, E. Ermanin: An insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry**. v. 30, n. 1, p. 153-155, 1991.
- ECHEVERRI, F.; SUAREZ, G. E. Flavonoids from the surface of *Passiflora foetida* L.(Passifloraceae). **Actual Biology**. v. 14, p. 58–60, 1985.
- ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and anticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. **Phytomedicine**. v. 17, n. 12, p. 940-949, 2010.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1161, n. 1-2, p. 214-223, 2007.
- FROELICH, O.; DUQUE, C.; SCHREIER, P. Volatile constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** v. 37, n. 2, p. 421-425, 1989.

GAVASHELI, N. M.; MONIAVA, I. I.; ERISTAVI, L. I. Aminoacids from *P. incarnata* cultivated in the Georgian SSR. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii** v. 10, p. 266-266, 1974.

GAVASHELI, N. M.; MONIAVA, I. I.; ERISTAVI, L. I. Oligosaccharides of *P. incarnata*. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii** v. 11, p. 84-85, 1975.

GEIGER, H.; MARKHAM, K. R. The C-glycosylflavone pattern of *P. incarnata*. **Zeitschrift fuer Naturforschung C Biosciences**. v. 41, p. 949-950, 1986.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 42, n. 6, p. 1306-1313, 1994.

GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, G. P.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Med.** v. 74, p. 1769-1773, 2008.

HASAN, S. Q.; AHMAD, I.; SHERWANI, M. R. K.; ANSARI, A. A.; OSMAN, S. M. Studies on herbaceous seed oils X. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**. v. 82, n. 5, p. 204-205, 1980.

HERDERIEH, M.; WINTERHALTER, P. 3-Hydroxy-retro- $\alpha$ -ionol: A natural precursor of isomeric edulans in purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 39, n. 7, p. 1270-1274, 1991.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

JAROSZEWSKI, J. W.; FOG, E. Cyclopentenoid cyanohydrin glycosides Part 10. Sulfate esters of cyclopentenoid cyanohydrin glycosides. **Phytochemistry**. v. 28 p. 1527-1528, 1989.

JORDÁN, M. J.; GOODNER, K. L.; SHAW, P. E. Characterization of the aromatic profile in aqueous essence and fruit juice of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degner) by GC-MS and GC/O. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n. 6, p. 1523-1528, 2002.

KIDOY, L.; NYGARD, A. M.; ANDERSEN, O. M.; PEDERSEN, A. T.; AKSNES, D. W.; KIREMIRE, B. T. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 10, n. 1, p. 49-54, 1997.

LAM, S. K.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**. v. 16, n. 2-3, p. 172-180, 2009.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Phytochemical studies of drugs from *Passiflora edulis* Sims. forma *flavicarpa*. **Herba Hungarica**. v. 15, n. 2, p. 7-11, 1976.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. II. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* (German). **Planta Medica**. v. 27, n. 2, p. 112-121, 1975.

LUTOMSKI, J.; SEGIET, E.; SZPUNAR, K.; GRISSE, K. Die Bedeutung der *Passionsblume* in der Heilkunde. Importance of Passion flower in the therapeutics. **Pharmazie in Unserer Zeit**. v. 10, n. 2, p. 45-49, 1981.

MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. **Planta Medica**. v. 69, n. 5, p. 452-456, 2003.

MARECK, U.; HERRMANN, K.; GALENSA, R.; WRAY, V. The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 10, p. 3486-3487, 1991.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 10, p. 4102-4106, 1998.

MORAES, M. D. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**. v. 8, n. 5, p. 257-260, 1997.

NARAIN, N.; DAS NEVES ALMEIDA, J.; DE SOUZA GALVÃO, M.; MADRUGA, M. S.; DE BRITO, E. S. Compostos voláteis dos frutos de maracujá (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 2, p. 212-216, 2004.

- ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**. v. 25, n. 1, p. 191-193, 1985.
- ORSINI, F.; PELLIZZONI, F.; RICCA, G.; VEROTTA, L. Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**. v. 26, n. 4, p. 1101-1105, 1987.
- OSORIO, C.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. **Phytochemistry**. v. 53, n. 1, p. 97-101, 2000.
- OSORIO, C.; DUQUE, C.; KOAMI, T.; FUJIMOTO, Y. Stereochemistry of (3E)-3,7-dimethyl-3-octene-1,2,6,7-tetraol isolated from *Passiflora quadrangularis*. **Tetrahedron Asymmetry**. v. 10, n. 22, p. 4313-4319, 1999.
- OSORIO, C.; DUQUE, C.; SUÁREZ, M.; SALAMANCA, L. E.; URUEÑA, F. Free, glycosidically bound, and phosphate bound flavor constituents of badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. **Journal of Separation Science**. v. 25, n. 3, p. 147-154, 2001.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**. v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.
- PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos hidroalcoolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 79, p. 7-10, 1998.
- POETHKE, V. W.; SCHWARZ, C., GERLACH, H. Substances of *Passiflora incarnata* 1. (Constituents of *Passiflora bryonioides*). **Alkaloids Planta Medica** v. 18, p. 303-314, 1970.
- PONGPAN, N.; LUANRATANA, O.; SUNTORNSUK, L. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatography for vitexin analysis and fingerprint of *Passiflora foetida*. **Current Science**. v. 93, n. 3, p. 378-382, 2007.

QIMIN, L.; VAN DEN HEUVEL, H.; DELORENZO, O.; CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A. C.; VLIETINCK, A. J.; CLAYES, M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography - Biomedical Applications**. v. 562, n. 1-2, p. 435-446, 1991.

RAFFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCATI, V.; TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**. v. 777, n. 1, p. 223-231, 1997.

RAHMAN, K.; KRENN, L.; KOPP, B.; SCHUBERT, Z. M.; MAYER, K. K.; KUBELKA, W. Isoscoparin-2"-O-glucoside from *P. incarnata*. **Phytochemistry** v. 45, p. 1093-1094, 1997.

RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; LÓPEZ, C.; PALACIOS, L.; DUQUE, C.; PACHECO, R.; GUZMÁN, A. An orientin derivative isolated from *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 29, n. 1, p. 141-143, 2010.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 69, n. 3, p. 153-158, 1994.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 6, n. 2, p. 96-100, 1995.

SANT'ANNA, E.; TORRES, R. C.; PORTO, A. C. S. Avaliação de diferentes métodos cromatográficos na determinação de ácidos graxos em sementes de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v. 19, n. 1, p. 85-94, 2001.

SANTOS, K. C.; KURTZ, S. M. T. F.; MÜLLER, S. D.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R. M. M. W.; SANTOS, C. A. M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, p. 565-573, 2006.

SEIGLER, D. S.; PAULI, G. F.; NAHRSTEDT, A.; LEEN, R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. **Phytochemistry**. v. 60, p. 873-882, 2002.

SEIGLER, D. S.; SPENCER, K. C. Corrected structures of passicoriacin, epicoriacin and epitetraphyllin B and their distribution in the Flacourtiaceae and Passifloraceae. **Phytochemistry**. v. 28, n. 3, p. 931-932, 1989.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 57, n. 1, p. 11-20, 1997.

SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 31, n. 4, p. 794-796, 1983.

SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Gynocardin from *Passiflora*. **Planta Medica** v. 51, p. 356-357, 1984.

TAPP, E. J.; CUMMINS, I.; BRASSINGTON, D.; EDWARDS, R. Determination and isolation of a thioesterase from passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) that hydrolyzes volatile thioesters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 15, p. 6623-6630, 2008.

TOMMONARO, G.; SEGURA RODRÍGUEZ, C. S.; SANTILLANA, M.; IMMIRZI, B.; DE PRISCO, R.; NICOLAUS, B.; POLI, A. Chemical composition and biotechnological properties of a polysaccharide from the peels and antioxidative content from the pulp of *Passiflora ligularis* fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 18, p. 7427-7433, 2007.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; LINUMA, M. Quantitative analysis of all types of beta-carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. **Phytochemical Analysis**. v. 10, p. 247-253, 1999.

ULUBELEN, A. T., G.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora foetida* var. *hispida* and *P. foetida* var. *hibiscifolia*. **Journal of Natural Products**. v. 45, n. 1, p. 103-103, 1982.

VOIRIN, B.; SPORTOUCH, M.; RAYMOND, O.; JAY, M.; BAYET, C.; DANGLES, O.; EL HAJJI, H. Separation of flavone C-glycosides and

qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**. v. 11, n. 2, p. 90-98, 2000.

WOHLMUTH, H.; PENMAN, K. G.; PEARSON, T.; LEHMANN, R. P. Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.

YAPO, B. M. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. **Food Research International**. v. 42, n. 8, p. 1197-1202, 2009.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 9, p. 1229-1234, 2000a.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 10, p. 1377-1380, 2000b.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**. v. 96, n. 1, p. 86-91, 2010.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; ULREICH, J. B.; WATSON, R. R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**. v. 27, n. 7, p. 408-416, 2007.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**. v. 75, p. 1221-1226, 2009.

ZUCOLOTTO, S. M.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma flavicarpa Degener. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 25, n. 1, p. 5-9, 2006.



## APÊNDICE II

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. actinia</i>		<i>IN VIVO</i>	folhas	Indução da catalepsia em camundongos	(SANTOS; SANTO DE OLIVEIRA, 200
				Sedativo e ansiolítico	(DOS SANTOS et al., 2006)
				Ansiolítico	(LOLLI et al., 2007)
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	<i>IN VITRO</i>	sementes	Propriedade antifúngica de proteínas isoladas da semente	(AGIZZIO et al., 2006)
			raízes	Atividade anti-herpética (HSV-1)	(MÜLLER et al., 2007)
			frutos	Antioxidante	(TALCOTT et al., 2003)
		Antioxidante		(VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008)	
		<i>IN VIVO</i>	folhas	Catalepsia; sedativo e ansiolítico	(VALE; LEITE, 1983)
				Depressão do sistema nervoso central	(SILVA; FREIRE, 2000)

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	IN VIVO	folhas	Efeito inibitório da função digestora, atividade analgésica e antiinflamatória	(SILVA; NUNES; FREIRE, 2001)
				Anti-hipertensivo	(ROJAS et al., 2006)
				Antiinflamatório	(BENINCÁ et al., 2007)
				Antiinflamatório	(MONTANHER et al., 2007)
				Ansiolítico	(BARBOSA et al., 2008)
				Antiinflamatória	(ZUCOLOTTO et al., 2009a)
				Ansiolítica e sedativa	(DENG et al., 2010)
				Ansiolítica	(LI et al., 2011)
			pericarpo	Hipnótico, anticonvulsivante	(SENA et al., 2009)
			frutos	Anti-hipertensivo	(ROJAS et al., 2006)

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	var. <i>flavicarpa</i>	<i>IN VIVO</i>	suco dos frutos	Sedativa	(LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975)
		<i>IN VIVO</i>	suco processado	Hipoglicemiante	(JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN SM, 2002)
		Estudo clínico fase II	pericarpo	Hipocolesterolêmico	(RAMOS et al., 2007)
				Redução dos níveis de Triglicerídeos e aumento do HDL.	(JANEBRO et al., 2008)
	Estudo clínico fase I	farinha da casca	Ensaios toxicológicos clínicos, em voluntários saudáveis	(MEDEIROS et al., 2009)	
var. <i>edulis</i>	<i>IN VITRO</i> ; <i>IN VIVO</i> ; Estudo clínico fase II	pericarpo	Antihipertensivo	(ZIBADI et al., 2007)	

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	<i>var. edulis</i>	Estudo clínico fase II	pericarpo	Redução dos sintomas de pacientes asmático	(WATSON et al., 2008)
				Alívio nos sintomas de osteoartrite	(FARID et al., 2010)
	variedade não especificada	IN VITRO	folhas	Antioxidante	(FERRERES et al., 2007b)
				Atividade leishmanicida	(BEZERRA et al., 2006)
		<i>in vitro; ex vivo</i>		Antioxidante	(RUDNICKI et al., 2007a)
		IN VITRO	sementes	Inibição enzimática	(PURICELLI et al., 2003)
		IN VITRO	frutos	Atividade anti-oxidante	(STANGELAND; REMBERG; LYE, 2009)
		IN VITRO		Inibição da melanogenesis e promoção da síntese de colágeno	(MATSUI et al., 2010)
		IN VIVO	folhas	Depressor SNC	(DO; NITTON; LEITE, 1983)
				Hipnótico e sedativo	(MALUF et al., 1991)

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	variedade não especificada	<i>IN VIVO</i>	folhas	Efeito ansiolítico	(PETRY et al., 2001)
				Ansiolítico	(COLETA et al., 2001)
				Efeito ansiolítico	(DHAWAN et al., 2001)
				Ansiolítico e sedativa	(DE-PARIS et al., 2002)
				Cicatrização de anastomose colônica em ratos	(BEZERRA et al., 2006)
				Ansiolítico	(COLETA et al., 2006)
				Efeito ansiolítico	(REGINATTO et al., 2006)
				Antiinflamatória	(VARGAS et al., 2007)
			Ansiolítica	(LI et al., 2011)	
pericarpo	Catalepsia (catatonia) em ratos	(BRUSCHI; CARDOSO; MILANI, 2002)			

ESPÉCIE		ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. edulis</i>	variedade não especificada	<i>IN VIVO</i>	pericarpo	Efeito anti-hipertensivo	(ICHIMURA et al., 2006)
				Anti-hiperglicemiante	(BRAGA; DE MEDEIROS; DE ARAÚJO, 2010)
			sementes	Hipocolesterominate	(CHAU; HUANG, 2005)
		<i>EX VIVO</i>	fruto	Atividade espermicida de espermatozóides humanos	(ALVAREZ-GÓMEZ et al., 2010)
		Estudo clínico fase I	folhas	Hipnótico e sedativo	(MALUF et al., 1991)
<i>P. foetida</i>		<i>IN VITRO</i>	folhas	Antioxidante e antimicrobiana	(BENDINI et al., 2006)
				Antimicrobiana	(THAAKUR et al., 2009)
				Antiepilepsia, analgesia	(PAVAN et al., 2009)
				Antimicrobiana	(BABY et al., 2010)

ESPÉCIE	ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. foetida</i>	IN VITRO	folhas	Antidepressiva	(SANTOSH et al., 2011)
		fruto	Inibição da matriz-metaloprotease MMP-2 e MMP-9 (inibição enzimática)	(PURICELLI et al., 2003)
		folhas e frutos	Antibacteriana	(MOHANASUNDARI et al., 2007)
	IN VIVO	folhas	Antidepressiva	(SANTOSH et al., 2011)
<i>P. incarnata</i>	IN VIVO	folhas	Atividade neurofarmacológica (prolonga o tempo de sono, protege de um efeito convulsivo do pentilentetrazol e afeta a atividade locomotora)	(SPERONI; MINGHETTI, 1988)
			Atividade antiinflamatória	(BORRELLI et al., 1996)
			Sedativo	(SPERONI et al., 1996)
			Sedativa e ansiolítica	(SOULIMANI et al., 1997)
			Antitussígeno	(DHAWAN et al., 2001)

ESPÉCIE	ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	IN VIVO	folhas	Prevenção da cronicidade do álcool e nicotina induzida por azospermia, diminuição da esterilidade e libido por uma nova benzoflavona trissubstituída modificada isolada de frações da <i>P. incarnata</i> .	(DHAWAN; SHARMA, 2002b)
			Redução da dependência ao $\Delta^9$ -THC	(DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002)
			Anti-tussígeno	(DHAWAN; SHARMA, 2002a)
			Efeito sedativo e hipnótico	(CAPASSO; SORRENTINO, 2005)
			Ansiolítico	(MCCALL, 2007)
			Ansiolítico	(GRUNDMANN et al., 2008)
			Ação ansiogênica e anticonvulsivante	(ELSAS et al., 2010)



ESPÉCIE	ENSAIO	PLANTA	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>P. incarnata</i>	IN VIVO	folhas	Antidepressivo	(FIEBICH et al., 2011)
		folhas, caule, flores e planta toda	Ansiolítica	(DHAWAN et al., 2001)
		folhas, flores e frutos	Anticonvulsivante	(NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008)
<i>P. ligularis</i>	IN VITRO	polpa	Atividade antioxidante	(TOMMONARO et al., 2007)
<i>P. quadrangularis</i>	IN VITRO	folhas	Antiofídico (neutraliz em 63% o veneno de <i>Bothrops atrox</i> )	(OTERO et al., 2000)
			Atividade hemolítica colesterol-dependente	(YULDASHEVA et al., 2005)
	Atividade antioxidante- cultura de calos		(ANTOIGNONI et al., 2007)	
	IN VIVO		Ansiolítico	(DE CASTRO et al., 2007)
<i>P. tripartita var molissima</i>	IN VIVO	folhas	atividade anti hiperglicêmica	(EDWIN et al., 2007)



**Referência**

- AGIZZIO, A. P.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, S. F. F. ; GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant science**. v. 171, n. 4, p. 515-522, 2006.
- ALVAREZ-GÓMEZ, A. M.; CARDONA-MAYA, W.; FORERO, J. ; CADAVID, A. P. Human spermicidal activity of *Passiflora edulis* extract. **Journal of Reproduction and Contraception**. v. 21, n. 2, p. 95-100, 2010.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F. ; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**. v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.
- BABY, E.; BALASUBRAMANIAM, A.; MANIVANNAN, R.; JOSE, J. ; SENTHILKUMAR, N. Antibacterial activity of methanolic root extract of *Passiflora foetida* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 2, n. 1, p. 38-40, 2010.
- BARBOSA, P. R.; VALVASSORI, S. S.; BORDIGNON JR, C. L.; KAPPEL, V. D.; MARTINS, M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. ; REGINATTO, F. H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**. v. 11, n. 2, p. 282-288, 2008.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; PIZZOLANTE, L.; TOSCHI, T. G.; GUZZO, F.; CEOLDO, S.; MARCONI, A. M.; ANDREETTA, F. ; LEVI, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **European Food Research and Technology**. v. 223, n. 1, p. 102-109, 2006.
- BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P. ; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**. v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S. ; NASCIMENTO, F. R. F.

Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais.

**Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. Suppl.0, p. 631-637, 2006.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V. ; TOJA, E. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**. v. 10, p. 104-106, 1996.

BRAGA, A.; DE MEDEIROS, T. P. ; DE ARAÚJO, B. V. Investigation of antihyperglycemic activity of *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, in alloxan-induced diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 2, p. 186-191, 2010.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C. ; MILANI, H. Pharmacological evaluation of a *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* extract. **Revista de Ciência Farmacêutica**. v. 23, n. 2, p. 263-276, 2002.

CAPASSO, A. ; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora* extracts combination. **Phytomedicine**. v. 12, n. 1-2, p. 39-45, 2005.

CHAU, C. F. ; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 49, n. 8, p. 786-790, 2005.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; DE LIMA, T. C. M. ; DA CUNHA, A. P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 12, p. 1067-1073, 2006.

COLETA, M.; CAMPOS, M. G.; COTRIM, M. D. ; PROENÇA DA CUNHA, A. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. **Pharmacopsychiatry**. v. 34, n. suppl 1, p. 20-21, 2001.

DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. ; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DE CASTRO, P. C. F.; HOSHINO, A.; DA SILVA, J. C. ; MENDES, F. R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytotherapy Research**. v. 21, n. 5, p. 481-484, 2007.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H. ; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 128, n. 1, p. 148-153, 2010.

DHAWAN, K.; KUMAR, R.; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Correct identification of *Passiflora incarnata* Linn., a promising herbal anxiolytic and sedative. **Journal of Medicinal Food**. v. 4, n. 3, p. 137-144, 2001.

DHAWAN, K.; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Reversal of cannabinoids ( $\Delta^9$ -THC) by the benzoflavone moiety from methanol extract of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice: a possible therapy for cannabinoid addiction. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 54, n. 6, p. 875-881, 2002.

DHAWAN, K. ; SHARMA, A. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**. v. 73, n. 5, p. 397-399, 2002a.

DHAWAN, K. ; SHARMA, A. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. **Life sciences**. v. 71, n. 26, p. 3059-3069, 2002b.

DO, V.; NITTON, B. ; LEITE, J. R. Psychopharmacological effects of preparations of *Passiflora edulis* (Passion flower). **Cience Culture**. v. 35, p. 11-24, 1983.

DOS SANTOS, K. C.; KURTZ, S. M. T. F.; MÃ¼LLER, S. D.; BIAVATTI, M. W.; DE OLIVEIRA, R. M. M. W. ; SANTOS, C. A. D. M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 4, p. 565-573, 2006.

EDWIN, E.; SHEEJA, E.; DHANABAL, S. ; SURESH, B. Antihyperglycemic activity of *Passiflora mollissima* bailey. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 69, n. 4, p. 570-571, 2007.

ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T. ; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in

hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and anticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. **Phytomedicine**. v. 17, n. 12, p. 940-949, 2010.

FARID, R.; REZAEYAZDI, Z.; MIRFEIZI, Z.; HATEF, M. R.; MIRHEIDARI, M.; MANSOURI, H.; ESMAELLI, H.; BENTLEY, G.; LU, Y.; FOO, Y.; WATSON, R. R. Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. **Nutrition Research**. v. 30, n. 9, p. 601-606, 2010.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 25, p. 10187-10193, 2007.

FIEBICH, B. L.; KNÖRLE, R.; APPEL, K.; KAMMLER, T.; WEISS, G. Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): In vitro and in vivo evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia**. v. 82, n. 3, p. 474-480, 2011.

GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, G. P.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Med**. v. 74, p. 1769-1773, 2008.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

JANEIRO, D. I.; QUEIROZ, M. S. R.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 724-732, 2008.

JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN SM, S. A. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, Deg.) cv amarelo na alimentação de ratos (*Rattus norvegicus*) normais e diabéticos. **Revista Cadernos do Centro Universitário São Camilo** v. 10, p. 213-218, 2002.

LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L. ; ZHAO, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, n. 3, p. 1085-1090, 2011.

LOLLI, L. F.; SATO, C. M.; ROMANINI, C. V.; VILLAS-BOAS, L. D. B.; SANTOS, C. A. M. ; OLIVEIRA, R. M. W. D. Possible involvement of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 308-314, 2007.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. ; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. II. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* (German). **Planta Medica**. v. 27, n. 2, p. 112-121, 1975.

MALUF, E.; BAROS, H. M. T.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BENTI, R. ; LEITE, J. R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytotherapy Research**. v. 5, n. 6, p. 262-266, 1991.

MATSUI, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y. ; ITO, T. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 20, p. 11112-11118, 2010.

MCCALL, S. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. **American Association of Nurse Anesthetists Journal**. v. 75, n. 5, p. 333-337, 2007.

MEDEIROS, J. D. S.; MELO DINIZ, M. D. F. F.; SRUR, A. U. O. S.; PESSOA, M. B.; CARDOSO, M. A. A. ; DE CARVALHO, D. F. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2 A, p. 394-399, 2009.

MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S. ; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. - A common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n. 23, p. 2650-2653, 2007.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P. ; FRÖDE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTO, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; ZANETTI, C. R. ; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**. v. 21, n. 10, p. 970-974, 2007.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S. ; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 32, n. 4, p. 989-993, 2008.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M. ; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia - Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

PAVAN, K. R. K.; BHAGAVAN, R. M.; SREEDEVI, P.; PANDIT, P.; VEENA, R. I. ; VEENA, G. Phytochemical screening antiepileptic& analgesic activity of leaf extract of *Passiflora foetida*. **Pharmacologyonline**. v. 3, p. 576-580, 2009.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G. ; SCHENKEL, E. P. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 148-152, 2001.

PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S. ; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**. v. 74, n. 3, p. 302-304, 2003.

RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; PIRES, V. C. F.; CARDOSO, M. A. A.; DINIZ, M. D. F. M. ; MEDEIROS, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 592-597, 2007.



- REGINATTO, F. H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**. v. 20, n. 5, p. 348-351, 2006.
- ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO, R.; TOMÁS, G.; CHENGUAYEN, J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracujá) en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**. v. 67, n. 3, p. 206-13, 2006.
- RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; VEIGA PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; FONSECA MOREIRA, J. C. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**. v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.
- SANTOS, K. C.; SANTOS, C. A. M.; DE OLIVEIRA, R. M. W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n. 3, p. 306-309, 2005.
- SANTOSH, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, A. S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 1, p. 112-115, 2011.
- SENA, L. M.; ZUCOLOTO, S. M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; DE LIMA, T. C. M. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**. v. 234, n. 8, p. 967-975, 2009.
- SILVA, B. T. F.; FREIRE, S. M. F. Estudos farmacológicos do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) em ratos e camundongos. **Revista Ciência e Saúde**. v. 2, p. 4-21, 2000.
- SILVA, B. T. F.; NUNES, S.; FREIRE, S. M. F. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (maracujá amarelo). **Caderno de Pesquisa**. v. 12, p. 28-37, 2001.
- SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its

indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse.

**Journal of Ethnopharmacology**. v. 57, n. 1, p. 11-20, 1997.

SPERONI, E. ; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Med.** v. 54, n. 6, p. 488-491, 1988.

STANGELAND, T.; REMBERG, S. F. ; LYE, K. A. Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables. **Food Chemistry**. v. 113, n. 1, p. 85-91, 2009.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J. ; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 4, p. 935-941, 2003.

THAAKUR, S. R.; MONIKA, C.; BODDU, S. R. ; VENI, A. K. Antimicrobial activity of *Passiflora foetida* leaf extract on human pathogens. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**. v. 11, n. 1, p. 165-168, 2009.

TOMMONARO, G.; SEGURA RODRÍGUEZ, C. S.; SANTILLANA, M.; IMMIRZI, B.; DE PRISCO, R.; NICOLAUS, B. ; POLI, A. Chemical composition and biotechnological properties of a polysaccharide from the peels and antioxidative content from the pulp of *Passiflora ligularis* fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 18, p. 7427-7433, 2007.

VALE, N. B. ; LEITE, J. R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). **Ciência e Cultura**. v. 35, n. 1, p. 11-24, 1983.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. ; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**. v. 78, n. 2, p. 112-119, 2007.

VASCO, C.; RUALES, J. ; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**. v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

WATSON, R. R.; ZIBADI, S.; RAFATPANAH, H.; JABBARI, F.; GHASEMI, R.; GHAFARI, J.; AFRASIABI, H.; FOO, L. Y. ; FARIDHOSSEINI, R. Oral administration of the purple passion fruit peel

extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. **Nutrition Research**. v. 28, n. 3, p. 166-171, 2008.

YULDASHEVA, L. N.; CARVALHO, E. B.; CATANHO, M. T. J. A. ; KRASILNIKOV, O. V. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, n. 7, p. 1061-1070, 2005.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; ULREICH, J. B. ; WATSON, R. R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**. v. 27, n. 7, p. 408-416, 2007.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. ; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**. v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009.