

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GEISON MODESTI COSTA

**ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS E
COLOMBIANAS DO GÊNERO *Passiflora***

DOUTORADO

Florianópolis
2013

Geison Modesti Costa

**ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS E
COLOMBIANAS DO GÊNERO *Passiflora***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Coorientadores: Prof. Dr. Flávio H. Reginatto; Prof. Dr. Freddy A. Ramos.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Geison Modesti

ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS E COLOMBIANAS DO
GÊNERO Passiflora / Geison Modesti Costa ; orientador,
Eloir Paulo Schenkel ; co-orientador, Flávio Henrique
Reginatto. - Florianópolis, SC, 2013.
291 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Passiflora. 3. flavonoides C-
glicosídeos. 4. saponinas. 5. técnicas cromatográficas. I.
Schenkel, Eloir Paulo. II. Reginatto, Flávio Henrique.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Dedico esse trabalho a minha mãe, Dianete. Por todo incentivo, carinho, ajuda, compreensão e, sobretudo, amor. Fundamentais para que eu pudesse trilhar o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Eloir Paulo Schenkel, por ser um exemplo de profissional, e que ao longo do período em que estivemos trabalhando juntos, me ajudou a obter um grande conhecimento que me auxiliará por toda minha vida como profissional. Obrigado por compartilhar esses grandes ensinamentos como professor e pesquisador. Toda sua dedicação, entusiasmo, atenção e paciência comigo foram essenciais ao longo desses “quase” quatro anos. Foi uma grande honra pertencer ao hall de seus orientados. Muito obrigado.

Aos meus coorientadores Prof. Flávio Henrique Reginatto e Prof. Freddy Alejandro Ramos, que sempre me auxiliaram quando necessário, nas diversas áreas do meu trabalho, e mais do que isso, que por muitas vezes assumiram papéis de amigo.

Ao Prof. Leonardo Castellanos, pela ajuda essencial durante meu estágio doutoral, fornecendo-me inclusive um teto durante os dois primeiros meses, gesto pelo qual serei eternamente grato.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, com os quais tive o prazer de aprender e conviver nos últimos seis anos. Em especial, agradeço aos professores do grupo no qual tive o privilégio de participar: Prof^ª. Maique Biavatti, Prof^ª. Miriam Falkenberg, Prof^ª Lillian Bernardes.

Agradeço também a Prof^ª. Cláudia Simões, Prof. Marcos Segatto, Prof^ª. Simone Cardoso e Prof^ª. Ângela Campos, com os quais também tive a oportunidade de conviver, aprender, e por que não dizer, compartilhar bons momentos juntos tomando um café ou uma cerveja.

Às técnicas dos laboratórios Cláudia (Claudinha) e Solange, que sempre me auxiliaram com a maior paciência do mundo. A Claudinha, um muito obrigado por sempre me deixar tomar seu refrigerante ou água.

Agradeço imensamente a todos os amigos que ganhei ao longo dos anos em que vivi em Florianópolis:

Aqueles que vejo todos os dias, que são mais do que colegas de laboratório, são amigos! Carlos, Caroline, Karen, Vitor, Tatiana, Simone, Maria Izabel, Ana (ou Anas... da gnosis, QF, Central), Lara, Fernanda, Rafael, Solomon, Layzon, Tamires, Tauana, Teca, Éverson, Luiz, Dani... (estou esquecendo alguém?). Todos! Inclusive aqueles que aqui possam não estar citados. Foram ótimos todos os momentos juntos e todas as conversas, trabalhos, ensinamentos, bobagens, festas, jantares e diversão que tivemos ao longo desses anos. Sentirei saudades!

Aqueles colegas e amigos do CIF: Rafael, Jadel, Paulo, Lari, Cristian, Talitha, Mariana, Bruno, Gis, Manoela, Vivi, Gabi, Andrea, Ana, Camila, Cinira, Luis, Paola... entre outros tantos amigos que fiz ao rodar pelos laboratórios do bloco J/K do CCS, a trabalho ou apenas para jogar uma conversa fora.

Aos amigos e colegas que já passaram pelo laboratório, e que agora, estão aí espalhados pelo Brasil, cada um seguindo seu caminho.

A todos meus IC's, que ao longo desses anos facilitaram e muito o meu trabalho de bancada: Caro, Carize, Lara, Thais, Aline, Guilherme, Natália, Andrés e até o Carlos! Espero que eu tenha contribuído um pouquinho na formação de vocês, o mínimo que seja, pois na minha, vocês com certeza ajudaram. Obrigado.

À Alyne, que nesses últimos meses, foi uma grande companheira ao me aceitar para dividir apartamento, e aguentar esses meses mais "puxados". A sua companhia (e da sua mãe, Dona Teresinha), foi fundamental para manter o meu equilíbrio. Muito obrigado!

À Silvana (agora, Prô Silvana), que foi a primeira pessoa do laboratório que conheci, e da qual acabei herdando o tema desta tese. Aprendi muito contigo, e fico muito feliz em seguir com a nossa parceria, da qual continuamos e continuaremos colhendo bons frutos.

À Andressa, minha amigona e grande parceira dos 'maracujás'. Sempre me ajudou quando precisei, seja no trabalho ou na vida pessoal. Desde que estou em Florianópolis, me ensinou muito, me ajudou muito, tanto com o trabalho quanto com o ombro amigo. Muito obrigado por esse companheirismo ao longo desses anos.

Aos amigos do "poker night", que me proporcionaram grandes momentos de felicidade e boas risadas.

Aos demais amigos aqui não citados, mas que passaram pela minha vida, uns mais tempo outros menos, mas que me fizeram ser quem sou hoje.

Agradeço também a todos da Universidad Nacional de Colombia, em especial aos professores Carmenza Duque, Humberto Mayorga e Oscar Osorno, juntamente com os já citados Freddy Ramos e Leonardo Castellanos, que abriram as portas de seu laboratório e possibilitaram a realização do meu estágio doutoral no exterior. Foi um aprendizado de vida incrível e uma grande honra poder trabalhar com vocês.

Aos amigos do laboratório de Productos Naturales Marinos da UNAL, Angela, José, Diana, Andrés, Edison, Alonso, Coco, Lina,

Sandra, Fábio, Jairo, Eduardo. Muchas gracias por la amistad, la ayuda y la paciencia que ustedes tuvieron conmigo cuando llegué a Bogotá. Les agradezco también todos los buenos momentos que tuvimos juntos en el laboratorio y también afuera de la U.

À minha família, em especial minha tia Eoly e minha tia Elaine, que são muito especiais em minha vida.

Ao meu irmão, que para mim é apenas Júnior, e que sempre foi um grande companheiro em tudo que eu precisei em minha vida. Sou muito feliz porque vejo que você construiu uma família linda, e acabou de me dar um sobrinho. Você vai ser um grande pai!

Ao meu pai, Eoil, onde quer que esteja, espero que esteja orgulhoso, vendo mais essa conquista. O amor pela docência e pela pesquisa com certeza herdei de você e da mãe.

À minha mãe, Dianete, que sempre fez o melhor por mim. Ensinou-me muito da vida e mais. E é a ela que dedico esta tese. Amo você.

À minha noiva Marcela, que entrou na minha vida quando eu menos esperava e despertou uma paixão e um amor que nos fez superar várias coisas, inclusive à distância. Mesmo longe, me dá amor, tranquilidade e força para seguir adiante. Além da grande paciência comigo nesses últimos meses. “O universo conspira”. Eu amo você.

*"In order to have a good idea, you must
have lots of ideas"*

(Linus Pauling)

*"Pois a vitória de um homem às vezes se
esconde num gesto forte que só ele pode
ver"*

*(Trecho da música Lado A Lado B,
O Rappa)*

RESUMO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família Passifloraceae e suas espécies são conhecidas popularmente no Brasil como ‘maracujás’. As folhas de várias espécies de *Passiflora* são usadas sob a forma de chá, como calmante e suave indutor do sono. O fruto de algumas espécies, além do uso terapêutico popular, é amplamente utilizado pela indústria alimentícia para fabricações de sucos e derivados. Além das espécies de ocorrência no Brasil, a Colômbia também representa o centro de dispersão de muitas espécies de *Passiflora*, das quais algumas também apresentam elevada importância econômica, etnofarmacológica e terapêutica. Contudo, apesar do grande número de espécies de *Passiflora* na América Latina, muitas ainda carecem de estudos a respeito de seus constituintes químicos. O presente trabalho teve como objetivo principal investigar a composição química de extratos aquosos das folhas de algumas espécies de *Passiflora* de ocorrência no Brasil (*P. alata*) e outras de ocorrência predominante na Colômbia (*P. quadrangularis*, *P. bogotensis*, *P. tripartita* var. *mollissima*). Foram realizadas análises qualitativas por técnicas cromatográficas (Cromatografia Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência) e eletroforéticas (Eletroforese Capilar) dos perfis de flavonoides, saponinas, alcaloides e aminoácidos nos extratos aquosos das espécies de *Passiflora* supracitadas. Foi observada a presença de flavonoides e aminoácidos nos extratos das quatro espécies analisadas, com destaque para a grande diversidade de flavonoides glicosilados visualizados para *P. tripartita* var. *mollissima*. Saponinas foram observadas somente nos extratos aquosos das espécies *P. alata* e *P. quadrangularis* enquanto que a presença de alcaloides do tipo harmano não foi detectada nos extratos aquosos de nenhum das quatro espécies em concentrações superiores a 0,0187 ppm. Também foi utilizada a técnica de Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade em modo de eluição em gradiente para o isolamento de flavonoides glicosilados a partir dos extratos aquosos das folhas de *P. quadrangularis* e *P. bogotensis*. Da primeira espécie, foram isolados quatro flavonoides C-glicosídeos, identificados por técnicas espectroscópicas e espectrofotométricas como 2''-O-xilosil-vitexina, 2''-O-glicosil-vitexina, 2''-O-xilosil-orientina e 2''-O-glicosil-orientina. Da segunda espécie, foram isoladas e elucidadas seis flavonoides C-glicosídeos, dois deles ainda não descritos na literatura: 6-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-acetil)- β -D-glicopiranosil-apigenina e 6-C- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-acetil)- β -D-glicopiranosil-luteolina, além de isovitexina, isoorientina, 2''-O-ramnosil-isovitexina e

2''-*O*-ramnosil-isoorientina. Por técnicas cromatográficas diversas, foram isoladas três saponinas do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, para as quais suas estruturas foram elucidadas por técnicas espectroscópicas como 3-*O*-β-D-glicopiranosil-9,19-ciclolanost-24Z-en-1α,3β,21,26-tetraol e 3-*O*-β-D-glicopiranosil-9,19-ciclolanost-24Z-en-1β,3β,21,26-tetraol, saponinas ainda não descritas na literatura, além do 3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico. Adicionalmente, uma análise comparativa entre as espécies *P. alata* e *P. quadrangularis*, as quais apresentam grande similaridade morfológica, indicou que os flavonoides *C*-glicosídeos majoritários dos extratos aquosos das folhas de cada espécie (2''-*O*-ramnosil-vitexina para *P. alata* e 2''-*O*-xilossil-vitexina para *P. quadrangularis*) podem ser utilizados como marcadores químicos na diferenciação dessas duas espécies.

Palavras-chave: *Passiflora*, flavonoides *C*-glicosídeos, saponinas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, Eletroforese Capilar, Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade.

ABSTRACT

The genus *Passiflora* is the most important in the family Passifloraceae and its species are popularly known in Brazil as ‘maracujás’. The leaves of several species of *Passiflora* are used in the form of tea, as calming and smooth sleep inducing. The fruits of some species, beside the use in the folk medicine, are widely used by the food industry for juices fabrications and derivatives. In addition to the species occurring in Brazil, Colombia is also the dispersion center of many species of *Passiflora*, some of which also have high economic, ethnopharmacological and therapy importance. However, despite the large number of species of *Passiflora* in Latin America, many of them does not present enough studies about its chemical constituents. The aim of this study as to investigate the chemical composition of aqueous extracts from the leaves of some species of *Passiflora* occurring in Brazil (*P. alata*) and others with prevalent occurrence in Colombia (*P. quadrangularis*, *P. bogotensis*, *P. tripartita* var . *mollissima*). Qualitative analyzes by chromatographic (Thin Layer Chromatography, High Performance Liquid Chromatography, Ultra Performance Liquid Chromatography) and electrophoretic techniques (Capillary Electrophoresis) were realized for the flavonoids, saponins, alkaloids and amino acids fingerprints in aqueous extracts of *Passiflora* species described above. The presence of flavonoids and amino acids was observed in the extracts of all the four analyzed species, highlighting the great diversity of flavonoid glycosides shown in *P. tripartita* var. *mollissima*. Saponins were observed only in aqueous extracts of the species *P. alata* and *P. quadrangularis*, while the presence of harmane alkaloids was not detected in the aqueous extracts of any of the four species in concentrations greater than 0.0187 ppm. Also, we employed High-Speed Countercurrent Chromatography on gradient elution mode for the isolation of flavonoid glycosides from the aqueous extracts of the leaves of *P. quadrangularis* and *P. bogotensis*. From the first species, four C-glycosylflavonoids were isolated and identified by spectroscopic and spectrophotometric techniques as vitexin-2"-O-xyloside, vitexin-2''-O-glicoside, orientin-2''-O-xiloside and orientin-2''-O-glicoside. From the second species were isolated and elucidated six C-glycosylflavonoids, two of them not yet described in the literature: 6-C- α -L-ramnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-acetyl)- β -D-glucopyranosyl-apigenin and 6-C- α -L-ramnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-acetyl)- β -D-glycopyranosyl-luteolin, beside isovitexin, isoorientin, isovitexin-2''-O-ramnoside, isoorientin-2''-O-ramnoside. By several chromatographic techniques three saponins were isolated from the aqueous extract of the leaves of *P.*

quadrangularis, for which their structures were elucidated by spectroscopic techniques such as 9,19-ciclanost-24Z-en-1 α ,3 β ,21,26-tetrahydroxy-3-O- β -D-glucopyranoside and 9,19-ciclanost-24Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetrahydroxy-3-O- β -D-glucopyranoside, saponins not yet described in the literature, beside 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-oleanolic-acid. Additionally, a comparative study between the species *P. alata* and *P. quadrangularis*, which exhibit great morphological similarity, indicated that the mayor C-glycosylflavonoids from the aqueous extracts of each species (vitexin-2"-O-ramnoside for *P. alata* and vitexin-2"-O-xyloside for *P. quadrangularis*) could be used as chemical markers in the differentiation between these two species.

Keywords: *Passiflora*, C-glycosylflavonoids, saponins, High Performance Liquid Chromatography, Ultra Performance Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis, High-Speed Countercurrent Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flor, frutos e folhas de <i>P. alata</i>	42
Figura 2 - Flor, folhas e frutos de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	43
Figura 3 - Flor, fruto e folhas de <i>P. quadrangularis</i>	44
Figura 4 - Folha, flores e frutos de <i>P. bogotensis</i>	44
Figura 5 - Exemplos de estruturas de flavonoides <i>O</i> - e <i>C</i> -glicosídeos ..	52
Figura 6 - Rearranjo de Wessley-Moser em flavonoides <i>C</i> -glicosídeos	56
Figura 7 – Estruturas dos possíveis metabólitos originários de flavonoides <i>C</i> -glicosídeos. (HATTORI et al., 1988; ZHANG et al., 2007).....	57
Figura 8 – Estrutura do flavonoide <i>C</i> -glicosídeo aspalatina	58
Figura 9 – Estruturas dos flavonoides <i>C</i> -glicosídeos descritos <i>P. incarnata</i> e <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , listados na Tabela 1.....	61
Figura 10 - Estruturas das unidades de açúcares descritas para os flavonoides <i>C</i> -glicosídeos em <i>Passiflora</i> . (CHOPIN; BOUILLANT, 1975).....	63
Figura 11 - Flavonoides <i>C</i> -glicosídeos descritos para <i>P. alata</i>	64
Figura 12 - Flavonoides <i>C</i> -glicosídeos identificados para a espécie <i>P. quadrangularis</i>	65
Figura 13 - Flavonoides identificados para a espécie <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	66
Figura 14 - Dois principais núcleos encontrados em saponinas	68
Figura 15 - Estruturas da saponina ‘passiflorina’ e dos ciclopasiflosídeos I – XI.....	69
Figura 16 - Estruturas das saponinas descritas para <i>P. alata</i>	71
Figura 17 - Saponinas descritas para <i>P. quadrangularis</i>	72
Figura 18 - Alcaloides do tipo harmano relatados para espécies do gênero <i>Passiflora</i>	74
Figura 19 - Curva de van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e ≤ 2 μm	76
Figura 20 - Microscopia das partículas de sílica.....	77
Figura 21 - Diagrama esquemático da EC.....	80
Figura 22 - Representação esquemática da interface capilar/solução....	81
Figura 23 - Representação esquemática do processo de eletroforese capilar.....	82
Figura 24 - Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos das espécies analisadas.....	89
Figura 25 - Cromatogramas dos padrões e extratos aquosos das folhas das espécies de <i>Passiflora</i> para análise de flavonoides por CLAE.....	91

Figura 26 - Cromatograma obtido a partir do aprimoramento do gradiente para análise de flavonoides por CLAE no extrato aquoso das folhas de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> .	94
Figura 27 - Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de <i>Passiflora</i> para análise de flavonoides por CLUE.	96
Figura 28 - Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> para análise de flavonoides por CLUE.	97
Figura 29 - Eletroferograma do extrato aquoso das folhas de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> por EC nas condições iniciais empregadas.	99
Figura 30 - Eletroferogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de <i>Passiflora</i> para análise de flavonoides por EC.	100
Figura 31 - Perfil do fluxo obtido por CLAE e EC.	100
Figura 32 - Comparação dos perfis de flavonoides do extrato aquoso das folhas de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> obtidos por CLAE (A), CLUE (B) e EC (C), respectivamente.	102
Figura 33 - Cromatografia em camada delgada para análise de saponinas nos extratos aquosos brutos das espécies analisadas.	103
Figura 34 - Cromatogramas dos extratos aquosos de espécies de <i>Passiflora</i> para análise de saponinas por CLAE.	105
Figura 35 - Cromatografia em camada delgada para análise de alcaloides do tipo harmano nos extratos aquosos brutos das espécies analisadas.	106
Figura 36 - Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas de espécies de <i>Passiflora</i> para análise de alcaloides do tipo harmano por CLAE.	107
Figura 37 - Cromatogramas dos padrões e extratos aquosos de espécies de <i>Passiflora</i> para análise de alcaloides do tipo harmano por CLUE.	108
Figura 38 - Eletroferogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de <i>Passiflora</i> para análise de alcaloides por EC.	109
Figura 39 - Cromatografia em camada delgada de padrões de aminoácidos.	112
Figura 40 - Cromatografia em camada delgada para análise de aminoácidos em extratos aquosos das folhas de espécies de <i>Passiflora</i> .	113
Figura 41 - Aminoácidos observados nas espécies de <i>Passiflora</i> estudadas.	114
Figura 42 - Equipamento de Craig-Post de Distribuição em Contracorrente (CCD).	118
Figura 43 - Equipamentos DCCC (a) e RLCCC (b).	120
Figura 44 - Ilustração esquemática do movimento de rotação da coluna do HSCCC, e a distribuição das fases em seu interior.	121
Figura 45 - Ilustração representativa das partes que compõem o HSCCC.	121

Figura 46 - Fotos do equipamento de HSCCC.	122
Figura 47 - Cromatograma do extrato aquoso bruto (A) e do extrato hidrolisado (B) das folhas de <i>P. quadrangularis</i> por CLAE.	131
Figura 48 - Cromatografia em camada delgada dos flavonoides isolados das folhas de <i>P. quadrangularis</i> obtidos por HSCCC.	133
Figura 49 - Cromatograma do extrato aquoso das folhas de <i>P. quadrangularis</i> por CLAE, com destaque para os flavonoides isolados.	134
Figura 50 - Espectro ampliado de ^1H RMN do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).	137
Figura 51 - Espectro ampliado de ^{13}C RMN do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 75 MHz).	138
Figura 52 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 / 75 MHz).	139
Figura 53 - Sequencia de hidrogênios da glicose determinados pelas correlações viciniais observadas no espectro COSY.	140
Figura 54 - Sequencia de hidrogênios da xilose determinados pelas correlações viciniais observadas no espectro COSY.	140
Figura 55 - Espectro de correlação COSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).	141
Figura 56 - Ampliação do espectro de correlação COSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).	141
Figura 57 - Espectro de correlação TOCSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).	142
Figura 58 - Estrutura do flavonoide PqF1: 2''- <i>O</i> -xilosil-vitexina	144
Figura 59 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PqF2 (CD $_3$ OD; 300 MHz).	147
Figura 60 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF2 (CD $_3$ OD; 300 / 75 MHz).	148
Figura 61 - Espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF2 (CD $_3$ OD; 300 / 75 MHz).	149
Figura 62 - Ampliação do espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF2 (CD $_3$ OD; 300 / 75 MHz),	150
Figura 63 - Estrutura do flavonoide PqF2: orientina-2''- <i>O</i> -xilósideo.	152
Figura 64 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PqF3 (CD $_3$ OD; 300 MHz).	154
Figura 65 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF3 (CD $_3$ OD; 300 / 75 MHz).	155
Figura 66 - Ampliação do espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF3 (CD $_3$ OD; 300 / 75 MHz)	155

Figura 67 - Ampliação do espectro de correlação COSY do flavonoide PqF3 (CD ₃ OD; 300 MHz).....	156
Figura 68 - Espectro de correlação TOCSY do flavonoide PqF3 (CD ₃ OD; 300 MHz).....	157
Figura 69 - Estrutura do flavonoide PqF3: 2''-O-glicosil-vitexina	159
Figura 70 - Espectro de ¹ H RMN do flavonoide PqF4 (CD ₃ OD; 300 MHz).....	161
Figura 71 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF4 (CD ₃ OD; 300 / 75 MHz).....	162
Figura 72 - Estrutura do flavonoide PqF4: 2''-O-glicosil-orientina....	164
Figura 73 - Esquema do isolamento e purificação das substâncias PqS1, PqS2 e PqS3.....	168
Figura 74 - Esquema do isolamento e purificação das saponinas PqS4, PqS5 e PqS6.....	169
Figura 75 - Cromatografia em camada delgada para análise do extrato aquoso bruto e das frações BuOH e AcOEt das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	170
Figura 76 - Cromatografia em camada delgada para análise das substâncias isoladas da fração AcOEt (A) e da fração BuOH (B).....	171
Figura 77 - Sequência de hidrogênios determinados por meio das correlações observadas no espectro COSY para a glicose da saponina PqS1.....	173
Figura 78 - Espectro ampliado de ¹ H RMN da saponina PqS1 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 MHz).....	174
Figura 79 - Espectro de correlação HSQC da saponina PqS1 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 / 75 MHz).....	175
Figura 80 - Espectro de correlação HMBC da saponina PqS1 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 / 75 MHz).....	176
Figura 81 - Espectro ampliado de correlação COSY da saponina PqS1 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300).....	177
Figura 82 - Valores atribuídos inicialmente a alguns hidrogênios (A) e carbonos (B) da agliconas da saponina PqS1 [†]	180
Figura 83 - Correlações C-H observadas no espectro de correlação HMBC (a) e correlações H-H observadas no espectro de correlação COSY (b) para o anel A e B da saponina PqS1.....	181
Figura 84 - Estrutura proposta para a saponina PqS1: 3-O-β-D-glicopiranosil-9,19-ciclolanost-24Z-en-1α,3β,21,26-tetraol.....	183
Figura 85 - Cromatograma em camada delgada das saponinas PqS1 e PqS2, em diferentes sistemas cromatográficos.....	183
Figura 86 - Espectro de ¹ H RMN da saponina PqS2 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 MHz).....	187

Figura 87 - Espectro de HSQC da saponina PqS2 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 MHz).....	188
Figura 88 - Espectro de HMBC da saponina PqS2 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 MHz).....	189
Figura 89 - Espectro de COSY da saponina PqS2 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 300 MHz).....	190
Figura 90 - Correlações H-H observadas no espectro de correlação COSY (a) e correlações C-H observadas no espectro de correlação HMBC (b) para o anel A e B da saponina PqS2.....	191
Figura 91 - Sequencia de hidrogênios determinados por meio das correlações observadas no espectro COSY para a glicose da saponina PqS2.....	191
Figura 92 - Estrutura proposta para a saponina PqS2: 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-1β,3β,21,26-tetrahidroxi-9,19-ciclolanost-24 <i>Z</i> -eno.....	193
Figura 93 - Espectro de ¹³ C RMN da saponina PqS3 (piridina- <i>d</i> ₅ ; 75 MHz).....	195
Figura 94 - Estrutura da saponina PqS3: 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico.....	198
Figura 95 - Espectro de ¹ H RMN do flavonoide PbF2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).....	239
Figura 96 - Espectro de HSQC do flavonoide PbF2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 / 75 MHz).....	240
Figura 97 - Espectro de HMBC do flavonoide PbF2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 / 75 MHz).....	241
Figura 98 - Espectro de ¹ H RMN do flavonoide PbF4 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).....	242
Figura 99 - Espectro de ¹³ C RMN do flavonoide PbF4 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 75 MHz).....	243
Figura 100 - Espectro de HSQC do flavonoide PbF4 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 / 75 MHz).....	244
Figura 101 - Espectro de HMBC do flavonoide PbF4 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 / 75 MHz).....	245
Figura 102 - Ampliação do espectro de HMBC do flavonoide PbF4 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 / 75 MHz).....	245
Figura 103 - Comparação dos perfis de flavonoides do extrato aquoso das folhas de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> na mesma escala de tempo.....	250
Figura 104 - Estruturas químicas dos flavonoides <i>C</i> -glicosídeos isolados das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	251
Figura 105 - Estruturas químicas dos flavonoides <i>C</i> -glicosídeos isolados das folhas de <i>P. bogotensis</i>	253

Figura 106 - Estruturas químicas das saponinas isoladas das folhas de <i>P. quadrangularis</i>	255
Figura 107 - Estruturas dos ácidos mólico e quadrangulárico.....	256
Figura 108 - Cromatograma do extrato aquoso de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i> por CLUE, com e sem a adição do padrão de harmano.....	258

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos principais dos flavonoides C-glicosídeos e exemplos de estruturas.....	54
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Flavonoides <i>C</i> - glicosídeos descritos para <i>P. incarnata</i> e <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	60
Tabela 2 - Espécies de <i>Passiflora</i> analisadas, com seus respectivos nomes populares, locais de coleta, identificação e depósito.....	83
Tabela 3 – Flavonoides <i>C</i> -glicosídeos observados nos extratos aquosos das espécies analisadas, por meio de comparações cromatográficas por CCD e CLAE.....	92
Tabela 4 - Variáveis eletroforéticas avaliadas para a separação de flavonoides no extrato aquoso de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	99
Tabela 5 - Dados de linearidade e de sensibilidade para o alcaloide harmano.....	111
Tabela 6 - Condições cromatográficas para o fracionamento e/ou isolamento de flavonoides <i>C</i> -glicosídeos por CCC.....	124
Tabela 7 - Sistemas de solventes testados para a separação de flavonoides a partir do extrato aquosos das folhas de <i>P. quadrangularis</i> por HSCCC.....	128
Tabela 8 - Gradiente do sistema de solventes usados para a separação de flavonoides a partir do extrato aquosos das folhas de <i>P. quadrangularis</i> por HSCCC (em v/v/v).....	129
Tabela 9 - Valores de deslocamento químico dos hidrogênios observados para PqF1 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz) e para orientina e isoorientina ligados em C-6 e C-8 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).....	135
Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos dos carbonos C-2'' da unidade de glicose observados para PqF1, vitexina e 2''- <i>O</i> -glicosil-vitexina.....	143
Tabela 11 - Dados de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF1 em DMSO- <i>d</i> ₆ , e comparação com valores da literatura para 2''- <i>O</i> -xilossil-vitexina.....	143
Tabela 12 - Dados de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF2 em CD ₃ OD, em comparação com o flavonoide PqF1, identificado como vitexina-2''- <i>O</i> -xilossídeo, em DMSO- <i>d</i> ₆	151
Tabela 13 - Dados de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF3 em CD ₃ OD, em comparação com o flavonoide já elucidado PqF1 (em DMSO- <i>d</i> ₆).....	158
Tabela 14 - Valores dos deslocamentos químicos (δ ppm) dos carbonos do flavonoide PqF4 comparados com os valores para PqF2 e PqF3 (CD ₃ OD; 75 MHz).....	163
Tabela 15 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ¹ H RMN e HSQC (300 MHz / 75 MHz) para a saponina PqS1 e	

comparação com os valores de ^{13}C RMN para o quadrangulosídeo, ambos em piridina- d_5	178
Tabela 16 – Correlações observadas dos grupamentos metilas, no espectro HMBC, em piridina- d_5 , da saponina PqS1.....	180
Tabela 17 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN para os hidrogênios geminais do grupo ciclopropano (C-19) da saponina PqS1, quando avaliada a orientação da hidroxila.	182
Tabela 18 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN e HSQC da saponina PqS2, em piridina d_5 , comparativamente aos observados para PqS1 (75 MHz).	185
Tabela 19 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN para os hidrogênios geminais do grupo ciclopropano (C-19) da saponina PqS2, quando avaliada a orientação da hidroxila.	192
Tabela 20 - Comparação entre núcleo urseno e oleaneno para a posição C-12 e C-13 com dados da literatura.	194
Tabela 21 - Deslocamentos químicos de ^{13}C RMN do ácido oleanólico e da saponina PqS3, para as posições C-3 e C-17.	196
Tabela 22 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H e ^{13}C RMN da saponina PqS3, em piridina d_5 , em comparação com dados da literatura ^A	196
Tabela 23 - Flavonoides C-glicosídeos identificados nos extratos aquosos das espécies analisadas, por meio de comparações cromatográficas por CCD, CLAE e CLUE e eletroforéticas por EC...	249

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C RMN = Ressonância Magnética Nuclear de carbono
 ^1H RMN = Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ACN = Acetonitrila
AcOEt = Acetato de etila
BuOH = Butanol
CCC = Cromatografia Contracorrente
CCD = Cromatografia em Camada Delgada
CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE = Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COSY = “*Correlated Spectroscopy*”
DAD = Detecção por arranjo de diodos
DCCC = Cromatografia Contracorrente em Gotas (do inglês ‘*Droplet Countercurrent Chromatography*’)
EC = Eletroforese Capilar
EM = Espectrometria de Massas
EtOH = Etanol
HMBC = “*Heteronuclear multiple bond correlation*”
HSCCC = Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (do inglês ‘*High Speed Countercurrent Chromatography*’)
HSQC = “*Heteronuclear Single Quantum Coherence*”
iPrOH = Isopropanol
MeOH = Metanol
RLCCC = Cromatografia Contracorrente de Rotação Locular (do inglês ‘*Rotation Locular Countercurrent Chromatography*’)
RMN = Ressonância Magnética Nuclear
TOCSY = “*Total correlation spectroscopy*”
UV = Ultravioleta

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	35
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: <i>PASSIFLORA</i> E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUENTES QUÍMICOS.	41
1.1 INTRODUÇÃO	41
1.2 PRODUÇÃO COMERCIAL	45
1.3 DADOS ETNOFARMACOLÓGICOS	46
1.4 DADOS FARMACOLÓGICOS	47
1.5 DADOS QUÍMICOS	51
1.5.1 FLAVONOIDES C-GLICOSÍDEOS	52
1.5.1.1 Generalidades	52
1.5.1.2 Subdivisão dos flavonoides C-glicosídeos	54
1.5.1.3 Estabilidade dos flavonoides C-glicosídeos	55
1.5.1.4 Metabolismo e biodistribuição dos flavonoides C-glicosídeos	57
1.5.1.5 Flavonoides C-glicosídeos em espécies de <i>Passiflora</i>	59
1.5.2 SAPONINAS	67
1.5.2.1 Generalidades	67
1.5.2.2 Saponinas em espécies de <i>Passiflora</i>	68
1.5.3 ALCALOIDES	74
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DOS PRINCIPAIS CONSTITUENTES QUÍMICOS DE ESPÉCIES DE <i>PASSIFLORA</i> POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ELETROFORÉTICAS	75
2.1 INTRODUÇÃO	75
2.1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (CLUE)	75
2.1.2 ELETROFORESE CAPILAR (EC)	78
2.2 OBJETIVOS	82
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.3.1 MATERIAL VEGETAL	83
2.3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	84
2.3.2.1 Preparação das amostras	84
2.3.3 EQUIPAMENTOS	84
2.3.4 PROCEDIMENTOS GERAIS	85
2.3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	85
2.3.5.1 Análises por CCD	85
2.3.5.2 Análises por CLAE	86
2.3.5.3 Análises por CLUE	87
2.3.6 ANÁLISES ELETROFORÉTICAS POR EC	87
2.3.7 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES	88
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
2.4.1 ANÁLISE DE FLAVONOIDES	89

2.4.1.1	Análise por CCD	89
2.4.1.2	Análises por CLAE	90
2.4.1.2.1	<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	93
2.4.1.3	Análises por CLUE	95
2.4.1.4	Análises por EC	98
2.4.2	ANÁLISE DE SAPONINAS	103
2.4.2.1	Análise por CCD	103
2.4.2.2	Análise por CLAE	104
2.4.3	ANÁLISE DE ALCALOIDES	105
2.4.3.1	Análise por CCD	105
2.4.3.2	Análise por CLAE	106
2.4.3.3	Análise por CLUE	107
2.4.3.4	Análise por EC	109
2.4.3.5	Determinação dos limites de detecção e quantificação	110
2.4.4	ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	111
2.5	CONCLUSÕES	114
CAPÍTULO 3 – ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS DAS FOLHAS DE <i>PASSIFLORA QUADRANGULARIS</i> POR HSCCC		
		117
3.1	INTRODUÇÃO	117
3.1.1	CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE ALTA VELOCIDADE	118
3.1.1.1	Princípios	118
3.1.1.2	Seleção do sistema de solventes para HSCCC.	122
3.1.1.2.1	Tempo de equilíbrio	123
3.1.1.2.2	Coefficiente de partição	123
3.1.1.3	HSCCC no fracionamento e isolamento de flavonoides C-glicosídeos.	124
3.2	OBJETIVOS	125
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	125
3.3.1	MATERIAL VEGETAL	125
3.3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	125
3.3.3	EQUIPAMENTOS	126
3.3.4	PROCEDIMENTOS GERAIS	126
3.3.5	HIDRÓLISE ÁCIDA	126
3.3.6	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	127
3.3.7	ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA CONTRACORRENTE DE ALTA VELOCIDADE	127
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
3.4.1	HIDRÓLISE ÁCIDA	130
3.4.2	ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS DE <i>P. QUADRANGULARIS</i>	132

3.4.2.1	Análise do flavonoide PqF1	134
3.4.2.2	Análise do flavonoide PqF2	145
3.4.2.3	Análise do flavonoide PqF3	152
3.4.2.4	Análise do flavonoide PqF4	159
3.5	CONCLUSÕES	164
CAPÍTULO 4 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE SAPONINAS DAS FOLHAS DE <i>PASSIFLORA QUADRANGULARIS</i> .		165
4.1	INTRODUÇÃO	165
4.2	OBJETIVOS	165
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	166
4.3.1	MATERIAL VEGETAL	166
4.3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	166
4.3.3	EQUIPAMENTOS	166
4.3.4	PROCEDIMENTOS GERAIS	166
4.3.5	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	167
4.3.6	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS SAPONINAS DE <i>P. QUADRANGULARIS</i>	167
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	169
4.4.1	ANÁLISE DA SUBSTÂNCIA PQS1	171
4.4.2	ANÁLISE DA SUBSTÂNCIA PQS2	183
4.4.3	ANÁLISE DA SUBSTÂNCIA PQS3	193
4.5	CONCLUSÕES	198
CAPÍTULO 5 - ANÁLISES COMPARATIVAS ENTRE <i>P. ALATA</i> E <i>P. QUADRANGULARIS</i>		201
5.1	INTRODUÇÃO	201
5.2	OBJETIVO	202
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	202
5.3.1	PUBLICAÇÃO	202
5.4	CONCLUSÕES	214
CAPÍTULO 6 – ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS DAS FOLHAS DE <i>PASSIFLORA BOGOTENSIS</i> POR HSCCC		215
6.1	INTRODUÇÃO	215
6.1.1	<i>PASSIFLORA BOGOTENSIS</i> BENTH.	215
6.2	OBJETIVOS	216
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	216
6.3.1	PROPOSTA DE PUBLICAÇÃO	216
6.4	CONCLUSÕES	246
DISCUSSÃO GERAL		247
CONCLUSÕES GERAIS		263
REFERÊNCIAS		265

APRESENTAÇÃO

A origem da investigação de produtos naturais na área química e farmacêutica teve como um dos marcos iniciais o isolamento da morfina, em 1805, a partir do látex do ópio. A descoberta dessa substância estimulou o descobrimento de diversas outros compostos de importância terapêutica em um curto espaço de tempo, como a atropina (1819), a quinina (1820), a cafeína (1820) e a digoxina (1841) (GILANI; RAHMAN, 2005; PATWARDHAN, 2005; POTTERAT; HAMBURGER, 2008).

Um levantamento realizado em 2012 mostrou que aproximadamente 40% dos novos fármacos desenvolvidos nos últimos 30 anos são de origem natural ou derivados de substâncias oriundas de metabolismo de vegetais ou de organismos marinhos. O interesse na investigação de produtos naturais segue de modo expressivo, seja com vistas à identificação de compostos bioativos, sendo estes também possíveis de serem utilizados como modelos para o desenvolvimento de fármacos, seja com vistas ao desenvolvimento de fitoterápicos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nesse contexto estão as espécies do gênero *Passiflora*, que constitui o gênero mais importante da família Passifloraceae e cujas espécies são conhecidas popularmente no Brasil como ‘maracujás’. Este gênero, de ocorrência principal em continentes de clima tropical como o Americano e o Africano, possui aproximadamente 500 espécies descritas, sendo aproximadamente 150 nativas do Brasil. (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; FLORA BRASILEIRA, 1984; PIO CORREA, 1978). Os maracujás, também conhecidos como “flor-da-paixão”, são tradicionalmente descritos na medicina popular brasileira por possuírem propriedades calmantes. O fruto de algumas espécies, além do uso terapêutico popular, é amplamente utilizado pela indústria alimentícia para fabricações de sucos e derivados (PIO CORREA, 1978).

Na literatura há relatos de vários estudos que avaliaram principalmente atividades relacionadas ao sistema nervoso central do extrato das folhas e/ou partes aéreas de espécies de *Passiflora* (COLETA et al., 2006; MALUF et al., 1991; OGA et al.,

1984; REGINATTO et al., 2006; SPERONI; MINGUETTI, 1988; VALE; LEITE, 1983). No entanto, a atribuição da ação sedativa de espécies do gênero *Passiflora* a um grupo específico de constituintes químicos ainda é objeto de estudo. Alguns trabalhos têm correlacionando as atividades do tipo-ansiolítica de espécies de *Passiflora* com os flavonoides C-glicosídeos presentes em sua composição (COLETA et al., 2006; DE PARIS, 2002; SENA et al., 2009). Dessa forma, o interesse em caracterizar a constituição química destas espécies e também qual composto ou grupo de substâncias que poderiam ser responsáveis pela atividade neurofarmacológica mantém-se atual e relevante.

A maior parte dos estudos relatados na literatura, tanto químicos quanto farmacológicos, são para a espécie *P. incarnata*. Contudo, trabalhos de investigação química de diferentes espécies de *Passiflora* apontam que as espécies apresentam composição química diferenciada entre si (LI et al., 2011; WOHLMUTH et al., 2010; ZUCOLOTTI et al., 2012). Esse fato sugere que os resultados obtidos com *P. incarnata* em relação as suas atividades farmacológicas não possam ser extrapolados para as demais espécies utilizadas na América Latina.

Desta maneira, devido ao amplo emprego popular, o uso na indústria alimentícia e o emprego terapêutico de diferentes espécies de *Passiflora*, torna os estudos químicos e farmacológicos aprofundados destas espécies ainda necessários.

Para o presente trabalho foi estabelecido como objetivo principal a investigação da composição química das folhas de espécies de *Passiflora*, de ocorrência no Brasil (*P. alata*) e de ocorrência predominante na Colômbia (*P. quadrangularis*, *P. bogotensis* e *P. tripartita* var. *mollissima*), por meio de cooperação estabelecida com o “Grupo de Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”, do Departamento de Química da Universidad Nacional de Colombia.

Como objetivos específicos, foram estabelecidos:

- Investigar, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e Eletroforese Capilar (EC), a composição química de folhas de *P.*

quadrangularis, *P. alata*, *P. bogotensis*, *P. tripartita* var. *mollissima*, com ênfase em flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos;

- Isolar e identificar flavonoides C-glicosídeos presentes nos extratos aquosos das folhas das espécies *P. quadrangularis* e *P. bogotensis*;
- Isolar e identificar saponinas presentes nos extratos aquosos das folhas da espécie *P. quadrangularis*;
- Sugerir possíveis marcadores químicos para a diferenciação entre os extratos aquosos das folhas de *P. alata* e *P. quadrangularis*.

Esses objetivos foram estabelecidos considerando a grande diversidade de *Passifloras* de ocorrência colombiana, mas também pelo fato de que poucas destas espécies apresentam estudos na literatura.

A investigação química realizada neste trabalho buscou, por meio de técnicas cromatográficas analíticas e preparativas, a análise e o isolamento de diferentes classes de metabolitos secundários a partir destas espécies, especialmente flavonoides C-glicosídeos e saponinas. De modo paralelo a essa tese, vem sendo desenvolvida pela doutoranda Andressa Córneo Gazola, também pertencente a nosso grupo de investigação e sob coorientação da Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima, outra tese que investiga as potenciais atividades neurofarmacológicas das espécies aqui descritas. Desse modo, os resultados obtidos através da investigação química complementarão os resultados farmacológicos.

Adicionalmente, durante o desenvolvimento dessa tese, foi realizado um estágio doutoral no exterior em Bogotá, Colômbia, na Universidad Nacional de Colombia, junto ao grupo supracitado, liderado pelo Prof. Dr. Leonardo Castellanos, e sob a coorientação do Prof. Dr. Freddy Ramos. O estágio doutoral teve duração de sete meses, com início em maio de 2011 e término em novembro do mesmo ano, e teve como principal meta o isolamento de flavonoides C-glicosídeos das espécies aqui investigadas por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade em quantidades adequadas para a realização dos ensaios farmacológicos, assim como a análise dos extratos e compostos isolados por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas e por Ressonância Magnética Nuclear.

Diante dos objetivos expostos, a tese foi organizada em seis capítulos, brevemente introduzidos a seguir:

O capítulo 1 apresenta uma revisão sobre espécies do gênero *Passiflora*, abordando aspectos etnofarmacológicos, químicos e farmacológicos, em especial sobre as espécies analisadas nesta tese, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. bogotensis*, *P. tripartita* var. *mollissima*. Nesse capítulo também é apresentada uma revisão sucinta sobre os metabólitos de estudo deste trabalho, os flavonoides C-glicosídeos e saponinas, apresentando dados a respeito das características químicas e propriedades farmacológicas destes metabólitos.

O capítulo 2 apresenta análises dos principais constituintes químicos das diversas espécies de *Passiflora*, com foco em flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos, analisados pelas técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e Eletroforese Capilar (EC).

O capítulo 3 descreve o uso da Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC), no isolamento de flavonoides C-glicosídeos a partir das folhas de *P. quadrangularis*. Complementarmente, é descrita a identificação das substâncias isoladas, com a utilização das técnicas de Ultravioleta (UV), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O capítulo 4 apresenta o estudo fitoquímico de *P. quadrangularis* direcionado ao isolamento de saponinas presentes nessa espécie com o uso de técnicas cromatográficas diversas. A identificação e elucidação estrutural são discutidas por meio de análises detalhadas de RMN.

O capítulo 5 é constituído da análise comparativa entre as espécies *P. quadrangularis* e *P. alata* por CLAE. É discutida a utilização de flavonoides C-glicosídeos como marcadores químicos na diferenciação das ditas espécies.

O capítulo 6 descreve o uso da HSCCC no isolamento de flavonoides C-glicosídeos a partir das folhas de *P. bogotensis*. A identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas são discutidas por meio de UV, EM e RMN.

Ao final, é apresentada uma discussão geral dos resultados obtidos, assim como possíveis perspectivas para a continuidade do tema deste trabalho.

CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica: *Passiflora* e seus principais constituintes químicos.

Nessa revisão de literatura serão abordados, em um primeiro momento, dados gerais a respeito do gênero *Passiflora*, principalmente sobre as quatro espécies de trabalho dessa tese, *P. alata*, espécie de ocorrência no Brasil, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis* e *P. bogotensis*, espécies de ocorrência predominante colombiana. São apresentados sequencialmente dados a respeito da composição química concernentes às espécies de *Passiflora*, com uma maior ênfase em flavonoides C-glicosídeos e saponinas.

1.1 INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu e Augustin Pyramus de Candolle em 1805 e inclui 18 gêneros com um número estimado de 630 espécies. O gênero *Passiflora* constitui-se no mais importante da família Passifloraceae, com ocorrência principalmente em continentes de clima tropical como o Americano e o Africano. Possui aproximadamente 500 espécies descritas, sendo aproximadamente 150 nativas do Brasil. (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; FLORA BRASILEIRA, 1984; SACCO, 1980).

As espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas popularmente no Brasil como ‘maracujá’, ocorrendo variações nos nomes populares conforme as espécies. Essa palavra, de origem tupi-guarani, teria o significado de “alimento em cuia”. De modo geral, essas espécies (especialmente *P. incarnata*) também são conhecidas como ‘flor-da-paixão’, ou *passionflower*, na língua inglesa (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

No país, são duas as espécies que apresentam maior interesse comercial: *Passiflora alata*, descrita nas 3ª e 5ª edições da Farmacopeia Brasileiras (BRASIL, 1976, 2010) e *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, que foi incluída na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) e constitui a espécie mais cultivada no país principalmente para a produção de suco industrializado (REIS et al., 2000; SATO et al., 1992).

A espécie *P. alata* Curtis., objeto de estudo deste trabalho, é nativa no Brasil, sendo conhecida popularmente no país como ‘maracujá-doce’. Apresenta folhas inteiras, ovadas ou ovado-oblongas, com 11-18 cm de comprimento e 8-10 cm de largura. As flores possuem

pétalas e sépalas roxas na fase dorsal e carmim na fase ventral, com elementos filamentosos, chamados de coroa, de coloração vermelha, branca e roxa. Os frutos apresentam formato oval (8-10 cm de comprimento e 4-6 cm de diâmetro) e coloração amarelo, quando maduros (**Figura 1**). A polpa dos frutos é doce, o que favorece o consumo da fruta fresca. Tal fato está diretamente relacionado à comercialização dos frutos do ‘maracujá-doce’ a preços muito superiores aos praticados para o ‘maracujá-azedo’ (*P. edulis* var. *flavicarpa*), o que tem atraído a atenção por parte dos produtores. *P. alata* possui grande semelhança com *P. quadrangularis* no que diz respeito especialmente a folhas e flores. Por outro lado, os frutos dessas espécies são facilmente distinguíveis pelo seu tamanho e cor (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; MELETTI, 1996; SACCO, 1980).

Figura 1 - Flor, frutos e folhas de *P. alata*.



Fonte: <http://www.jardimteogeno.com>.

Especificamente na Colômbia, há registro de aproximadamente 140 espécies da família Passifloraceae, distribuídas entre três gêneros, sendo que *Passiflora* representa 97% do total de espécies. Na Região Andina está presente o maior número de espécies, cerca de 70%, com ocorrência geralmente em altitudes superiores a 1500 metros (ESCOBAR, 1988). Dessa forma, essa região representa o centro de dispersão de muitas espécies de *Passiflora*, das quais algumas apresentam elevada importância econômica, em virtude da comercialização de seus frutos comestíveis. Dentre elas destacam-se as espécies: *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. ligularis* (ARBELAEZ, 1996).

A espécie de maior uso na Colômbia, seja na preparação de sucos, seja na medicina popular é *P. tripartita* var. *mollissima* Holm-Nielsen & Moller Jorgensen, anteriormente descrita como *P. mollissima* (Kunth) Bailey. Essa espécie é chamada popularmente de ‘curuba’ ou

‘curuba-de-castilla’ e cultivada na Venezuela, Colômbia, Bolívia e Peru, geralmente em altitudes entre 2000-3600 m. As folhas são partidas em três lóbulos ovados, agudos no ápice, com 6-17 cm de comprimento e 7 a 22 cm de largura. As flores são do tipo tubulosas, com pétalas e sépalas de coloração rosa e os frutos apresentam um formato diferenciado da maioria das outras espécies de *Passiflora*, sendo oblongos e ovoides (até 12 cm), com um formato similar a banana, o que faz que esta espécie também seja conhecida em alguns países como ‘banana passionflower’ (**Figura 2**). Os seus frutos são amplamente utilizados na Colômbia, principalmente para a preparação de sucos (ASTURIZAGA et al., 2006; ESCOBAR, 1988; PRIMOT et al., 2005; RAMÍREZ, GONZÁLEZ, 1997).

Figura 2 - Flor, folhas e frutos de *P. tripartita* var. *mollissima*.



Fonte: autor.

P. quadrangularis Linn, (**Figura 3**) espécie cultivada na América tropical, inclusive na Colômbia e no Brasil, é conhecida como ‘badea’ (Colômbia) ou ‘maracujá-gigante’ (Brasil). Geralmente é cultivada em regiões de clima quente e úmido, com altitude entre 400 e 1500 metros. As folhas são inteiras, ovadas ou ovado-oblongas, com 10-20 cm de comprimento e 8-15 cm de largura. As flores apresentam pétalas e sépalas lilás na fase dorsal e carmim na fase ventral, com uma série de elementos filamentosos (coroa), de coloração roxa-avermelhada e branca na parte inferior, roxo a azul na parte superior. Os frutos são grandes quando comparados aos demais frutos de espécies de *Passiflora* (aproximadamente 30 cm de comprimento e 12 cm de largura) e apresentam coloração verde-amarelada, quando maduros e uma polpa de sabor ácido, utilizada para a preparação de sucos e sobremesas. Na medicina popular brasileira, as folhas dessa espécie são utilizadas no tratamento de hipertensão, diabetes, como calmante e descongestionante

(CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; OSÓRIO; DUQUE; FUJIMOTO, 2000; PIO CORREA, 1978).

Figura 3 - Flor, fruto e folhas de *P. quadrangularis*.



Fonte: <http://www.tradewindsfruits.com>; autor.

P. bogotensis Benth. (**Figura 4**) é uma espécie silvestre que, de modo geral, não é empregada de forma ornamental e nem com fins alimentícios. Descrita como espécie nativa da região de Bogotá, raramente é encontrada fora dessa região. As flores apresentam pétalas de coloração branca em ambas as faces, e seus frutos são redondos e pequenos (aproximadamente 2 cm de diâmetro), com coloração verde escura quando imaturos e cor marrom escura quando maduros. Dados da literatura sobre *P. bogotensis* são escassos, tendo sido encontrado apenas algumas referências populares sobre a possível toxicidade de seus frutos (PASSIFLORA, 2012). Destaca-se, entretanto, outro relato etnofarmacológico o qual descreve que “seus pequenos frutos são consumidos apenas por crianças em seus passeios” (ARBELAEZ, 1996).

Figura 4 - Folha, flores e frutos de *P. bogotensis*.



Fonte: <http://www.passionflow.co.uk/passiflora-bogotensis.htm>

1.2 PRODUÇÃO COMERCIAL

No Brasil, as espécies de *Passiflora* que apresentam maior interesse econômico são *P. alata* (maracujá-doce) e *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracujá-amarelo), ambas descritas na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), e que constituem as espécies mais cultivadas no país, para o consumo da fruta *in natura* (*P. alata*) e para a produção de sucos industrializados (*P. edulis* var. *flavicarpa*) (REIS et al., 2000). Entretanto, apenas *P. edulis* var. *flavicarpa* (espécie não investigada nesta tese) é amplamente cultivada em todo o Brasil para fins industriais e representa 95 % dos pomares comerciais do Brasil, considerado o maior produtor mundial deste fruto. Embora seja originária do Brasil, esta espécie é amplamente cultivada em vários outros países, inclusive na Colômbia (COLOMBIA, 2011; REIS et al., 2000; SATO et al., 1992).

Em 2002, Brasil e Colômbia já figuravam entre os principais países produtores de maracujá, principalmente *P. edulis* var. *flavicarpa*, representando 66% (450.000 toneladas) e 11% (75.000 toneladas) respectivamente da produção mundial de 640.000 toneladas (NATIONAL JUICE PRODUCTS ASSOCIATION, 2003). Dados mais recentes do IBGE (2007) mostram que a produção brasileira de maracujá em 2007 foi superior a 660 mil toneladas, com 47.032 hectares de área plantada.

A maior parte da produção mundial de maracujá se destina a satisfazer o consumo interno dos países produtores, sendo o comércio exterior relativamente residual. As exportações da Colômbia, por exemplo, representam menos de 2% do total da produção de frutos frescos. Entretanto, o comércio mundial de suco concentrado de maracujá possui maior peso que o de frutas frescas. Nesse caso, Brasil e Colômbia também se sobressaem pelas exportações desses produtos, possuindo como principais mercados consumidores países da União Europeia (CCI, 2002).

Dados mais recentes sobre a produção de espécies de *Passiflora* em território colombiano mostram que as espécies mais cultivadas são *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracuyá), *P. ligularis* (granadilla) e *P. tripartita* var. *mollissima* (curuba), com áreas plantadas de, respectivamente, 5.950, 4.709 e 3.010 hectares (COLOMBIA, 2011).

A importância econômica do fruto do maracujazeiro está principalmente centrada na produção de suco concentrado, porém outros alimentos são elaborados a partir do fruto, tais como: polpa para a

elaboração de doces e outras formulações, néctares, concentrados para sucos e refrigerantes, xaropes, sorvetes e geleias, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2002).

1.3 DADOS ETNOFARMACOLÓGICOS

O uso de *Passiflora* na medicina tradicional é relatado pela primeira vez pelos exploradores espanhóis, quando chegaram à América Central e do Sul, em especial junto à cultura Azteca, no México (LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1977). Acredita-se que a primeira descrição seja de missionários espanhóis que estiveram no Peru, no ano de 1569, onde encontraram uma planta muito singular, e que mais tarde veio a ser nomeada por Lineu como *P. incarnata* (DER MARDEROSIAN, 2004).

A construção peculiar de suas flores fez com que os missionários espanhóis nomeassem o gênero por visualizarem elementos representativos do calvário de Jesus. A coroa simbolizaria a coroa de espinhos, os cinco estames as feridas (chagas), os três estigmas os pregos na cruz, o ovário representaria o martelo, a gavinha simbolizaria o chicote que açoitou Cristo e as cinco pétalas e as cinco sépalas os dez verdadeiros apóstolos. Por essa razão, o nome popular '*passionflower*' (do inglês, 'flor-da-Paixão') (BLUMENTHAL; GOLDBERG, BRINCKMANN, 2000; DER MARDEROSIAN, 2004).

Várias espécies do gênero *Passiflora* são tradicionalmente conhecidas no âmbito da medicina popular de quase todos os países ocidentais. Além do amplo uso do fruto de algumas espécies pela indústria alimentícia para fabricações de sucos e derivados, conforme já citado anteriormente, também há diversos relatos do uso terapêutico popular dessas espécies em especial para as folhas (BARRIGA, 1975; GHEDIRA; GOETZ; LE JEUNE, 2007; GUPTA, 1995; HOFFMANN, 2003; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

Em relação a dados etnofarmacológicos, o uso das folhas de espécies de *Passiflora* ocorre sob a forma de chá, principalmente como calmante e suave indutor do sono (HOFFMANN, 2003; LORENZI; MATOS, 2008; PIO CORRÊA, 1978; SACCO, 1980).

Em literaturas do século XIX e XX, as espécies desse gênero costumam ser frequentemente citadas entre as plantas de grande emprego terapêutico popular. Martius (1854) descreve o uso de algumas espécies de *Passiflora* em banhos e cataplasmas contra a erisipela e afecções inflamatórias da pele. Da Cunha (1941) aponta que ervateiros do estado da Bahia, desde muito, já indicavam folhas e sementes de maracujá como sedativo e cardiotônico.

Orth (1937), em um trabalho sobre o uso da flora medicinal do Herbário Anchieta - Brasil, descreve que *P. foetida* era usada contra moléstias de pele, *P. alata* juntamente com *Aloe vera* seriam de grande utilidade contra o “marasmo”, *P. ocellata*, utilizada como anti-helmíntica e “anti-histérica” e ainda *P. quadrangularis* como emética, sem citar contudo, a parte do vegetal utilizada.

Lewis e Elvin-Lewis (1977) descrevem que as folhas de *P. incarnata* costumam ser prescrita como sedativa, para aliviar quadros de insônia, para o tratamento de certos tipos de convulsões e espasmos.

Também de modo popular, outros usos são descritos para as folhas, tais como vermífuga, abortiva, anti-hemorrágico, para o tratamento da tosse e para combater quadros de febre (MARTIUS, 1854; PIO CORREA, 1978; TOURSARKISSIAN, 1980).

Contudo, apesar do grande número de espécies de *Passiflora* com uso popular, poucas estão incluídas em Farmacopeias e são utilizadas como componentes de medicamentos, destacando-se *P. alata* Curtis. e *P. edulis* no Brasil, *P. tripartita* var. *mollissima* na Colômbia e *P. incarnata* L., na América do Norte e na Europa. (BLUMENTHAL; GOLDBERG, BRINCKMANN, 2000; BRASIL, 2010; INVIMA, 2009).

1.4 DADOS FARMACOLÓGICOS

Com relação às atividades farmacológicas descritas para as espécies de *Passiflora*, há vários estudos em nível pré-clínicos, mas poucos ensaios clínicos que avaliem essas atividades.

A grande maioria dos estudos é realizada com extratos das folhas, podendo-se citar as atividades anti-inflamatórias de *P. incarnata* (BORRELLI et al., 1996), *P. edulis* var. *flavicarpa* (BENINCÁ et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007; ZUCOLOTTI et al., 2009), *P. alata* (VARGAS et al., 2007) e *P. foetida* (SASIKALA et al., 2011); atividade antioxidante para *P. alata* e *P. edulis* Sims. (FERRERES et al., 2007; DA SILVA et al., 2013; DE SOUZA et al., 2012; RUDNICK et al., 2007a); hepatoprotetora para *P. alata* (RUDNICK et al., 2007b); atividade anti-hiperglicêmica de *P. mollissima* (EDWIN et al., 2007) e *P. incarnata* (GUPTA et al., 2012).

Poucos são os trabalhos que avaliam atividades dos frutos de *Passiflora*, ocorrendo estudos que descrevem a atividade anti-hipertensiva do pericarpo de *P. edulis* Sims var. *edulis* (ICHIMURA et al., 2006; ZIBALDI et al., 2007) e de *P. edulis* var. *flavicarpa* (KONTA

et al., 2013) e, ainda, a redução dos níveis de colesterol a partir da ingestão da farinha da casca de *P. edulis* (RAMOS et al., 2007).

Resultados obtidos pelo nosso grupo na avaliação da atividade neurofarmacológica em camundongos para o pericarpo dos frutos da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* demonstraram efeitos tipo-ansiolítico e sedativo do extrato aquoso e fração butanólica, sendo observada correlação dessas atividades com a presença de flavonoides C-glicosídeos nesses extratos, entre os quais isoorientina, vicenina-2, spinosina e 6,8-di-C-glicosil-crisina (SENA et al., 2009).

Apesar das diversas propriedades farmacológicas atribuídas às espécies do gênero *Passiflora*, a investigação de suas ações junto ao Sistema Nervoso Central (SNC) é descrita com maior frequência, apresentando inclusive um número crescente de trabalhos (BARBOSA et al., 2008; DENG et al., 2010; DE PARIS et al., 2002; GRUNDMANN et al., 2008; LOLLI et al., 2007; MALUF et al., 1991; OGA et al., 1984; REGINATTO et al., 2006; SAMPATH et al., 2011; SANTOS et al., 2006; SENA et al., 2009; SPERONI; MINGHETTI, 1988).

A espécie *P. incarnata* é a que apresenta maior quantidade de estudos acerca de atividades neurofarmacológicas, sendo a única espécie para qual já foram realizados estudos clínicos, ainda que modestos em sua quantidade.

Em nível pré-clínico, extratos das folhas dessa espécie apresentaram efeitos anticonvulsivante (ELSAS et al., 2010; NASSIRI-ASL et al., 2007; SPERONI et al., 1996b), tipo-ansiolítico (CHITRA et al., 2009; SPERONI et al., 1996b) e sedativo (SPERONI et al., 1996). Extratos das flores de *P. incarnata* também apresentaram atividade tipo-ansiolítica (GRUNDMANN et al., 2008; SAMPATH et al., 2011).

Especificamente para as espécies estudadas nesta tese, os dados farmacológicos são descritos a seguir:

O primeiro trabalho sobre avaliação de atividade farmacológica de *P. alata* foi realizado por Oga e colaboradores (1984), o qual descreveu algumas atividades neurofarmacológicas em ratos, com administração via intraperitoneal. Foi observado que o extrato fluído das folhas promoveu redução da atividade locomotora na dose de 150 mg/kg. Os autores também descrevem um prolongamento do sono induzido por pentobarbital sódico e um aumento do tempo de latência das convulsões induzidas por pentilenotetrazol, ambos os resultados nas doses de 75 e 150 mg/kg. Em relação à toxicidade, os autores encontraram como valor de DL₅₀ para o extrato de 456 mg/kg, também via i.p..

Um estudo comparativo entre extratos hidroetanólicos das folhas das espécies *P. alata* e *P. edulis* avaliou a atividade tipo-ansiolítica em ratos, ambos administrados intraperitonealmente. Os resultados mostraram que os extratos de ambas as espécies foram ativos nas doses 100 e 150 mg/kg, no entanto, o extrato de *P. edulis* também foi ativo em menor dose (50 mg/kg). Ao mesmo tempo, a análise quantitativa por espectrometria no UV indicou que o extrato de *P. edulis* possuía o dobro de teor de flavonoides totais, o que poderia estar relacionado à diferente resposta farmacológica observada (PETRY et al., 2001). Estudo semelhante foi realizado por De-Paris e colaboradores (2002), diferenciando-se por avaliar o efeito de extratos aquosos dessas mesmas espécies, ao invés de extratos hidroetanólicos. Os resultados obtidos também se assemelham, no que condiz a via de administração, ao efeito farmacológico e dose, ao trabalho anterior de Petry e colaboradores (2001).

Posteriormente, outro estudo do mesmo grupo avaliou o efeito ansiolítico do extrato aquoso das folhas de *P. alata* seco por ‘spray-dried’ em ratos, por via oral, com ou sem a utilização de excipientes. Tanto o extrato puro (640 mg/kg) como o que recebeu a adição de excipientes (800 mg/kg) apresentou atividade tipo-ansiolítica (REGINATTO et al., 2006).

Provensi e colaboradores (2008) observaram efeitos tipo-ansiolíticos para o extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata*, na dose de 300 mg/kg, via oral em camundongos. No entanto, para o extrato aquoso não foi observado esse efeito, nas doses de 300 e 600 mg/kg. Neste mesmo trabalho, os autores observaram atividade sedativa, tanto para o extrato hidroetanólico como para o extrato aquoso, nas doses de 300 e 600 mg/kg, administrados via oral, no teste do sono induzido por pentobarbital. Os efeitos sedativos observados corroboram com outro estudo realizado previamente por Romanini e colaboradores (2006), que já haviam descrito esse efeito para o extrato hidroetanólico das folhas de *P. alata*, na dose de 300 mg/kg, nos modelos de labirinto em cruz elevada e no teste do campo aberto.

Barbosa e colaboradores (2008) avaliaram a ação tipo-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 labirinto em cruz elevada e de esquiwa inibitória, respectivamente. *P. alata* induziu efeito ansiolítico somente nas doses mais altas de 100 e 150 mg/kg enquanto *P. edulis* foi ativo também na dose de 50 mg/kg, de forma semelhante aos resultados apresentados por Petry e colaboradores (2001). 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, sem afetar o processo de formação da memória.

Extratos hidroetanólicos das folhas de *P. alata* também foram avaliados em relação à atividade antioxidante, sendo observado efeitos em modelos *in vitro* (TRAP) e *ex vivo* (usando FeSO_4 como indutor de estresse oxidativo em fatias de fígado) (RUDNICKI, 2007a). Os mesmos autores também descrevem efeito hepatoprotetor deste mesmo extrato quando administrados via oral em ratos nas doses de 1 e 5 mg/kg, previamente a administração de tetracloreto de carbono (RUDNICKI, 2007b). A atividade antioxidante do extrato metanólico da polpa de *P. alata* é descrita na captação de espécies reativas de oxigênio em modelo de neutrófilos estimulados (ZERAİK et al., 2011).

Estudos farmacológicos de toxicidade da espécie *P. alata* descrevem a avaliação da toxicidade reprodutiva de extratos aquosos das folhas desta espécie em ratos fêmeas, não sendo observado efeitos tóxicos na dose de 800 mg/kg/dia, via oral (AMARAL; SCHENKEL, 2001). Mais recentemente, Boeira e colaboradores (2010) demonstraram ausência de efeitos tóxicos em doses de até 4800 mg/kg em dose única via oral em camundongos, ou 300 mg/kg via oral em ratos, durante 14 dias. Entretanto indícios de genotoxicidade foram observados com a administração aguda do extrato (150 – 600 mg/kg, v.o.), que provocou aumento significativo no índice e frequência de dano no DNA em células de cérebro, fígado e sangue periférico e medula de camundongos avaliados no ensaio cometa. Estudo posterior, com administração repetida do extrato por via oral durante 15 dias não alterou parâmetros comportamentais em camundongos, entretanto, animais tratados com dose de 250 mg/kg apresentaram alteração no comportamento alimentar, o que comprometeu seu ganho de peso quando comparado aos demais grupos, apresentando inclusive indícios de toxicidade hepática (BRAGA et al., 2013).

Para *P. quadrangularis*, são escassos os trabalhos na literatura sobre suas atividades farmacológicas. Foi encontrado apenas um estudo sobre atividades no SNC, no qual é relatada a atividade tipo-ansiolítica do extrato hidroetanólico das folhas dessa espécie quando administrada por via oral em ratos, na dose de 100, 250 e 500 mg/kg, não sendo esse mesmo efeito observado para o extrato aquoso (CASTRO et al., 2007).

Também raros são os trabalhos na literatura para a espécie *P. tripartita* var. *mollissima*, tendo sido encontrado apenas um estudo

farmacológico para essa espécie, o qual descreve atividade anti-hiperglicêmica do extrato etanólico das partes aéreas em ratos, administrado via intraperitoneal, nas doses de 100 e 200 mg/kg. (EDWIN et al., 2007).

Os poucos estudos clínicos que ocorrem para o gênero *Passiflora*, dizem respeito às atividades sedativa e ansiolítica de *P. incarnata*.

Um estudo duplo-cego controlado com placebo com 41 pacientes mostrou efeito sedativo observado pela melhora na qualidade do sono, após a ingestão do extrato aquoso padronizado a partir de diversas partes da planta, na forma de bolsas contendo planta moída para o preparo de chá, durante uma semana (NGAN; CONDUIT, 2011).

A atividade ansiolítica em nível clínico foi avaliada em dois estudos. Em um estudo duplo-cego randomizado, 36 pacientes receberam um medicamento a base de *P. incarnata* (Passipay® gotas), via oral, tendo sido observado uma melhora no controle do transtorno de ansiedade generalizada (AKHONDZADEH et al., 2001). Outro estudo demonstrou que o mesmo medicamento (Passipay® gotas) também apresentou redução da ansiedade pré-operatória em pacientes ambulatoriais (n = 60), em um estudo do tipo duplo-cego, controlado por placebo (MOVAFEGH et al., 2008).

1.5 DADOS QUÍMICOS

As espécies de maracujá apresentam grande diversidade na composição química, destacando-se entre os principais componentes descritos os flavonoides (LI et al., 2011; ULUBELEN et al., 1982b,c; ZUCOLOTTI et al., 2012), saponinas (DOYAMA et al., 2005; ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985; REGINATTO et al., 2001), alcaloides (LUTOMSKI, MALEK, 1975; LUTOMSKI, MALEK, RYBACKA, 1975) e glicosídeos cianogênicos (JAROSZEWSKI et al., 2002; SEIGLER et al., 2002; SPENCER; SEIGLER, 1983).

As espécies que possuem maior número de estudos na literatura sob o ponto de vista químico são *P. incarnata* e *P. edulis* Sims, enquanto outras espécies foram menos investigadas, como *P. tripartita* var. *mollissima* e *P. bogotensis*. Em uma revisão sobre o gênero *Passiflora*, Dhawan e colaboradores (2004) citam os principais metabólitos secundários relatados para estas espécies. Destacam-se os trabalhos com a espécie *P. incarnata*, havendo também estudos químicos para as espécies *P. quadrangularis*, *P. foetida*, *P. actinia*, *P. alata* e *P. edulis*. Cabe destacar que para a espécie *P. edulis*, a maioria

dos trabalhos não fazem menção a variedade investigada (*P. edulis* var *flavicarpa* ou *P. edulis* var *edulis*).

A seguir são apresentadas as principais classes de metabólitos secundários presentes em *Passiflora*, descrevendo de maneira mais detalhada os flavonoides C-glicosídeos e saponinas, principais metabólitos de estudo dessa tese.

1.5.1 Flavonoides C-glicosídeos

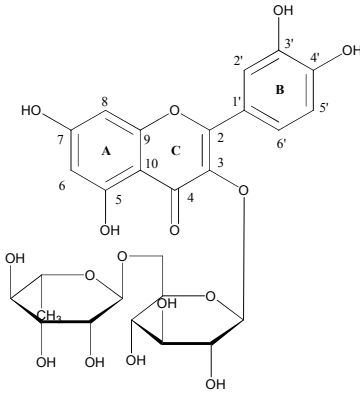
Entre os principais metabólitos secundários de interesse farmacêutico destacam-se os flavonoides. Esses compostos fenólicos são de grande distribuição no reino vegetal, estando presentes em uma ampla diversidade de frutas, vegetais, sementes e bebidas. Estudos indicam que o consumo diário destes compostos seja de 0,5 a 2 g por indivíduo (DESCHNER, 1992; GALATI; O'BRIEN, 2004).

Revisões sobre a classe dos flavonoides de um modo geral podem ser encontradas na literatura (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; HARBONE; MABRY; MABRY, 1975; HARBONE; WILLIAMS, 2000; QUIDEAU et al., 2011; STALIKAS, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2011). Em continuação, serão abordados aspectos específicos sobre flavonoides C-glicosídeos.

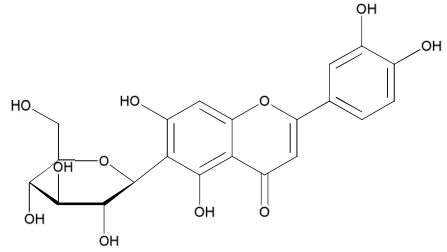
1.5.1.1 Generalidades

Apesar de uma enorme gama de variações estruturais, a natureza dos diversos núcleos flavônicos apresenta 15 átomos de carbono distribuídos em três anéis, com distribuição do tipo C₆-C₃-C₆ e identificados como anéis A, C e B, respectivamente (**Figura 5**). Nas espécies vegetais, os núcleos dos flavonoides, também chamados agliconas ocorrem na forma livre ou, mais frequentemente, sob a forma de glicosídeos, nos quais se encontram conjugados com unidades de açúcar. Essa ligação pode ocorrer através de uma hidroxila, normalmente nas posições C-3, C-4' ou C-7, originando os chamados O-glicosídeos ou ainda através de um átomo de carbono, principalmente nas posições C-6 ou C-8, originando os C-glicosídeos, como mostrado na **Figura 5** (JAY, VIRICEL, GONNET 2006; TALHI; SILVA, 2012).

Figura 5 - Exemplos de estruturas de flavonoides O- e C-glicosídeos

Flavonoide *O*-glicosídeo**Rutina**

Referência: Jay, Viricel, Gonnet (2006).

Flavonoide *C*-glicosídeo**Isoorientina**

A primeira descrição de flavonoides *C*-glicosilados ocorreu por volta no século XIX com o isolamento de escoparina em 1851, da espécie *Sarothamnus scoparius*, entretanto sua identificação estrutural ocorreu quase um século depois (CHOPIN et al., 1968). Um estudo mais intensivo de flavonoides *C*-glicosídeos ocorreu somente ao final dos anos 1950, com o isolamento de orientina e seu isômero isoorientina a partir de *Polygonum orientale* (HORHAMMER; WAGNER; GLOGGENLESSER, 1958 *apud* BANDYUKOVA; YUGIN, 1981).

Flavonoides *C*-glicosídeos são amplamente distribuídos no reino vegetal, havendo sido relatados em briófitas, pteridófitas, gimnospermas, angiospermas monocotiledônias e angiospermas dicotiledônias. Também é descrita a presença dessas substâncias em algas verdes. Qualquer parte do vegetal pode ser fonte de flavonoides *C*-glicosídeos, mas eles são mais frequentemente encontrados nas partes aéreas. Em diversos casos, ocorre que os flavonoides *C*-glicosídeos coexistem nos vegetais com flavonoides *O*-glicosídeos (TALHI; SILVA, 2012).

A rota biossintética de flavonoides tem sido um dos sistemas metabólicos mais intensivamente estudados em plantas. Entretanto, a biossíntese para a classe dos flavonoides *C*-glicosídeos ainda não é

totalmente clara. Estudos recentes tem demonstrado que a glicosilação dos flavonoides ocorre por meio de enzimas específicas, chamadas *C*-glicosiltransferase ou *O*-glicosiltransferase, originando os flavonoides *C* e *O*-glicosídeos, respectivamente (HAMILTON et al., 2009).

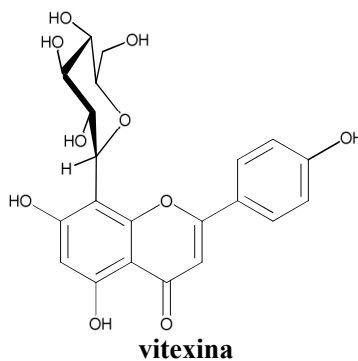
1.5.1.2 Subdivisão dos flavonoides *C*-glicosídeos

Os flavonoides *C*-glicosídeos podem ser divididos em quatro grupos principais: mono-*C*-glicosilflavonoides, di-*C*-glicosilflavonoides, *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides e *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides (**Quadro 1**). Entre os flavonoides mono-*C*-glicosídeos, cinco tipos são descritos, as *C*-glicosilflavonas, tipo mais importante e amplamente descrito, além de *C*-glicosilflavonols, *C*-glicosilflavanonas, *C*-glicosilisoflavonas e *C*-glicosildihidrochalconas. Já os demais grupos de flavonoides *C*-glicosídeos, são em sua grande maioria, derivados do núcleo flavona (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; JAY; VIRICEL; GONNET, 2006).

Quadro 1 – Grupos principais dos flavonoides *C*-glicosídeos e exemplos de estruturas

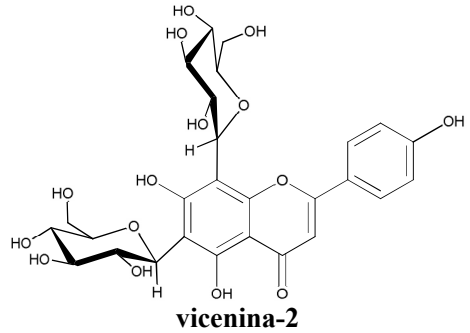
Mono-*C*-glicosilflavonoides:

Caracteriza-se por possuir uma única unidade de açúcar unida a agliconas por meio de uma ligação carbono-carbono, principalmente nas posições C-6 e C-8.

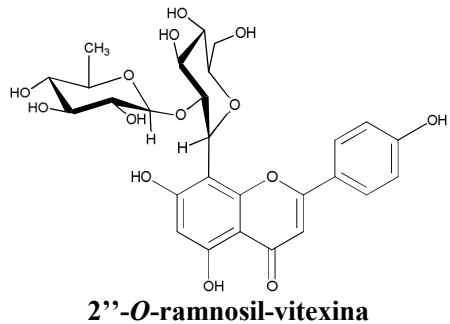


Di-C-glicosilflavonoides:

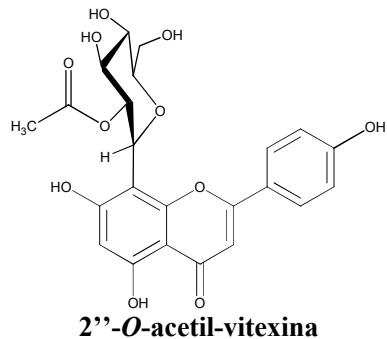
Caracteriza-se por possuir duas moléculas de açúcar conjugadas a aglicona.

**O-glicosil-C-glicosilflavonoides:**

Caracteriza-se por substituição *O*-glicosídica através de uma hidroxila fenólica pertencente ao núcleo do flavonoide e/ou através de uma hidroxila da unidade *C*-glicosídica.

**O-acil-C-glicosilflavonoides:**

Caracteriza-se por pelo menos um grupamento acila conjugado a molécula do flavonoide *C*-glicosídeo em várias posições possíveis.



Fonte: Jay, Viricel, Gonnet (2006).

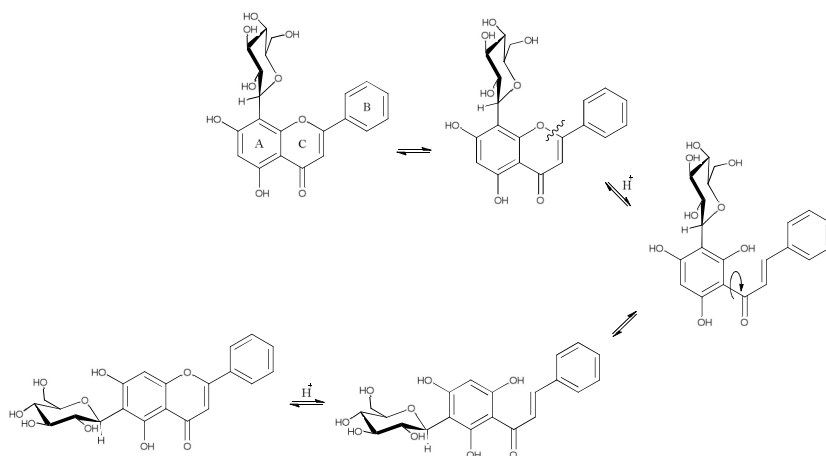
1.5.1.3 Estabilidade dos flavonoides *C*-glicosídeos

Uma das características químicas mais específicas dessas substâncias é a resistência à hidrólise ácida, a qual resulta da ligação da unidade de açúcar ocorrer diretamente no núcleo flavônico por meio de

uma ligação carbono-carbono (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; JAY; VIRICEL; GONNET, 2006).

O tratamento ácido dessas substâncias, em especial das 5-hidroxi-*C*-glicosilflavonas, ocasiona uma isomerização ácida, resultante de um rearranjo de Wessely-Moser (**Figura 6**), envolvendo a abertura do anel pirona (anel C) seguido do fechamento desse anel, com a participação de uma das duas hidroxilas fenólicas em posição *orto* ao grupo carbonila. Em geral, após esse processo é produzida uma mistura desses dois isômeros (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; MARKHAM, 1982).

Figura 6 - Rearranjo de Wessely-Moser em flavonoides *C*-glicosídeos



Referência: Chopin; Bouillant (1975).

No caso de *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides, com uma segunda unidade de açúcar na molécula, a hidrólise ácida leva a produção, em um primeiro momento, de mono-*C*-glicosilflavonoides. O produto dessa reação pode ser observado por CCD, ou ainda, no caso do *O*-glicosídeo ser em uma hidroxila fenólica, a reação pode ser observada também pelo efeito hipsocrômico do máximo de absorção em seu espectro UV (JAY, VIRICEL, GONNET, 2006; MARKHAM, 1982).

1.5.1.4 Metabolismo e biodistribuição dos flavonoides C-glicosídeos

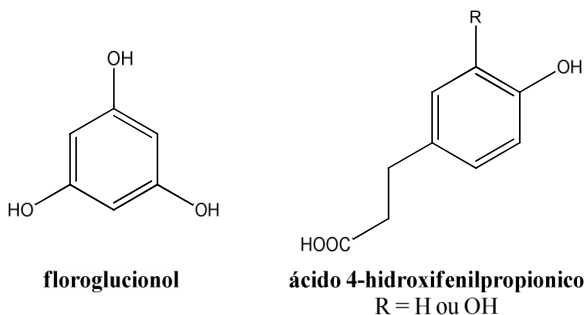
A absorção e metabolização de flavonoides glicosilados ainda não são totalmente claras. Há muitos anos, um dos principais flavonoides estudados em sistemas biológicos é a quercetina e seus glicosídeos, flavonóis presentes em diversas espécies vegetais empregadas na medicina tradicional e na fitoterapia, e também se assumiu que os glicosídeos de quercetina deveriam ser hidrolisados pelas bactérias intestinais previamente a absorção, com a consequente absorção da agliconas quercetina. Atualmente, com o uso de metodologias mais sensíveis e seletivas, sabe-se que de modo geral os flavonoides *O*-glicosídeos sofrem hidrólise seguido de processos de conjugação durante seu processo de absorção e circulação (BHATTARAM et al., 2002).

Já a biodisponibilidade particularmente dos flavonoides *C*-glicosídeos não é muito bem compreendida e existem poucos estudos sobre sua absorção em humanos (TALHI; SILVA, 2012).

O metabolismo e distribuição tecidual de orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, obtidas a partir das folhas do bambu foram investigados em ratos. Após a administração oral do extrato etanólico 30% (1,0 g/kg), as quatro flavonas *C*-glicosídicas foram fracamente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo que mais de 50% destes compostos foram excretados em sua forma original. No entanto, os resultados sugerem que estes compostos permanecem no cólon tempo suficiente para executar ação antioxidante e sequestradora de radicais livres. Além da excreção em sua forma original, algumas moléculas pequenas, como floroglucinol, ácido 3-(4'-hidroxifenil)-propiónico foram identificadas como metabólitos das flavonas *C*-glicosídicas (**Figura 7**) (ZHANG et al., 2007).

Essas moléculas são resultado de hidrólise via deglicosilação e abertura do anel *C* do esqueleto flavônico, realizadas por microrganismos intestinais (HATTORI et al., 1988; ZHANG et al., 2007).

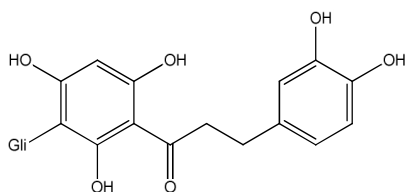
Figura 7 – Estruturas dos possíveis metabólitos originários de flavonoides *C*-glicosídeos. (HATTORI et al., 1988; ZHANG et al., 2007)



Referência: Hattori e colaboradores (1988); Zhang e colaboradores (2007).

Estudos de absorção de aspalatina (di-hidrochalcona-C-glicosídeo, **Figura 8**) em humanos demonstrou que esse flavonoide C-glicosídeo é metilado e glicuronidado *in vivo* em sua forma intacta, ambos os processos ocorrendo a partir de reações enzimáticas no intestino e fígado. Uma das formas metiladas, com ou sem glicuronidação, foi detectado usando CLAE-MS/MS na urina de humanos, demonstrando que a deglicosilação não é um pré-requisito para a absorção deste tipo de flavonoide (COURTS; WILLIAMSON, 2009).

Figura 8 – Estrutura do flavonoide C-glicosídeo aspalatina



Gli = glicose.

Referência: Courts e Williamson (2009).

Alguns estudos vêm buscando desenvolver métodos apropriados para a detecção em plasma sanguíneo ou ainda a biodistribuição de alguns flavonoides C-glicosídeos, após a administração desses por diferentes vias, visando o seus empregos em futuros ensaios de farmacocinética.

Spinosina, um dos flavonoides majoritários de *Semen ziziphi spinosae*, espécie principal da preparação medicinal tradicional chinesa chamada ‘Suanzaoren’, foi determinada no plasma sanguíneo de ratos por CLAE 6 horas após a administração de um decocto de ‘Suanzaoren’ (36 g/kg) por via oral. A concentração máxima desse flavonoide no sangue do animal foi de 400 ng/mL, observada após 6 horas (LI et al, 2003).

Outro estudo buscou detectar, também por CLAE, a concentração dos flavonoides 2’’-*O*-ramnosil-vitexina e 4’’-*O*-glicosil-vitexina no plasma sanguíneo de ratos após a administração intravenosa de uma fração de folhas de *Crataegus* sp. enriquecida em flavonoides. As doses administradas dessa fração foram de 10, 20 e 40 mg/kg (equivalente a 0,61, 1,22, 2,45 mg/kg de 4’’-*O*-glicosil-vitexina e 1,40, 2,80, 5,60 mg/kg de 2’’-*O*-ramnosil-vitexina). Os resultados mostraram que a concentração plasmática desses flavonoides foi proporcional a dose administrada, ao longo de todo o experimento (MA et al., 2007).

Em trabalho posterior, a distribuição tecidual de 2’’-*O*-ramnosil-vitexina, previamente isolada também das folhas de *Crataegus* sp., foi avaliada após a administração de uma dose de 30 mg/kg desse composto, pelas vias oral e intravenosa, em camundongos. Os autores observaram que os maiores níveis desse flavonoide foram detectados na vesícula biliar, quando administrado via intravenosa, e no intestino e estômago, quando administrado via oral (DU et al., 2011).

A distribuição tecidual de isovitexina também foi avaliada, a partir da administração intravenosa em ratos, na dose de 18,75 mg/kg da substância pura. A detecção por CLAE do flavonoide, em sua forma original, foi possível até 60 minutos após administração, em tecidos como rins, fígado, pulmão, coração e cérebro (YAN et al., 2011).

1.5.1.5 Flavonoides C-glicosídeos em espécies de *Passiflora*

Os flavonoides C-glicosídeos estão entre as principais classes de metabólitos secundários descritos para o gênero *Passiflora*, ocorrendo em diversas espécies tais como *P. incarnata*, (MARCHART; KRENN; KOPP, 2003; QIMIN et al., 1991; REHWALD et al., 1994), *P. edulis* (MARECK et al., 1991; ZUCOLOTTO et al., 2009), *P. alata* (DOYAMA et al., 2005; MÜLLER et al., 2005), *P. foetida* (ULUBELEN, 1982c), *P. tripartita* var. *mollissima* (SIMIRGIOTIS et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Na **Tabela 1** são apresentados os flavonoides descritos para as espécies *P. incarnata* e *P. edulis* var. *flavicarpa*, que são as espécies

com maior número de flavonoides C- glicosídeos descritos. A **Figura 9** e **10** apresentam as estruturas desses compostos e suas unidades de açúcar, respectivamente.

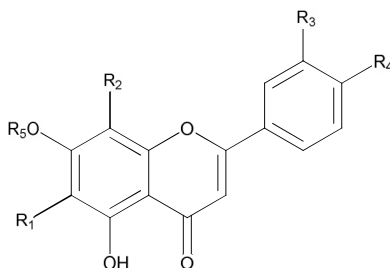
Tabela 1 - Flavonoides C- glicosídeos descritos para *P. incarnata* e *P. edulis* var. *flavicarpa*.

Espécie	Parte da planta	Flavonoide C-glicosídeo	Referencia*
<i>P. incarnata</i>	folhas	vitexina	SCHILCHER, 1968
		isovitexina	
		orientina	
		isoorientina	
		7-O-glicosil- isovitexina	
		schaftosídeo	GEIGER e MARKHAM, 1986; QIMIN et al., 1991.
		isoschaftosídeo	
		2''-O-glicosil- isovitexina	
		2''-O-glicosil- isoorientina	
		vicenina-2 lucenina-2	
swertisina	REHWALD: MEIER; STICHER, 1994		
2''-O-glicosil- isoscoparina	RAHMAN et al., 1997		
6-C-glicosil-8-C- ribopiranosil-apigenina	CHIMICHI et al., 1998		
<i>P. edulis</i>	folhas e frutos	schaftosídeo	MARECK; GALENSA; HERRMANN, 1990
		isoschaftosídeo	
		vitexina	
		isovitexina	MARECK et al., 1991
		orientina	
		isoorientina	
6-C-quinovosil- luteolina	ZUCOLOTTO et al., 2009.		
6-C-fucosil-luteolina			
		6,8-di-C-glicosil-crisina vicenina-2	

	spinosina	
folhas e ramos	4'-O-β-D-glicopiranosil-8-C-β-digitoxosil-luteolina 8-C-β-digitoxopiranosil-apigenina 8-C-β-digitoxopiranosil-luteolina 8-C-β-boivinopiranosil-apigenina 8-C-β-boivinopiranosil-luteolina	XU et al., 2013

*: São mencionados apenas os trabalhos que correspondem às primeiras descrições de cada composto para a respectiva espécie.

Figura 9 – Estruturas dos flavonoides C-glicosídeos descritos *P. incarnata* e *P. edulis* var. *flavicarpa*, listados na **Tabela 1**.



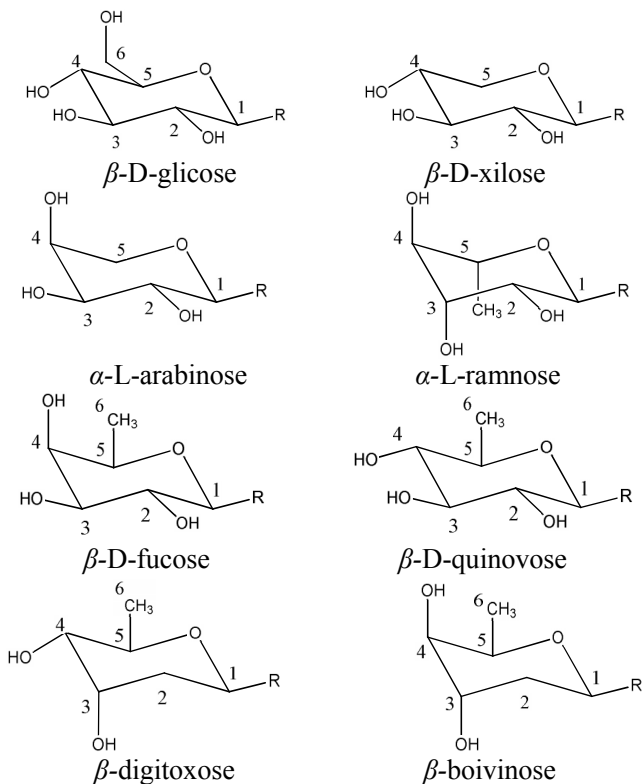
Flavonoide C-glicosídeo	Aglicona	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
vitexina	apigenina	H	gli	H	OH	H
isovitexina	apigenina	gli	H	H	OH	H
orientina	luteolina	H	gli	OH	OH	H
isorientina	luteolina	gli	H	OH	OH	H
schaftosídeo	apigenina	ara	gli	H	OH	H
isoschaftosídeo	apigenina	gli	ara	H	OH	H
swertisina	apigenina	gli	H	H	OH	CH ₃
spinosina	apigenina	gli-O-	H	H	OH	CH ₃

		gli					
saponarina	apigenina	gli	H	H	OH	gli	
2''-O-glicosil-isoescoparina	crisoeriol	gli-O-gli	H	O-CH ₃	OH	H	
2''-O-glicosil-isovitexina	apigenina	gli-O-gli	H	H	OH	H	
2''-O-glicosil-isoorientina	luteolina	gli-O-gli	H	OH	OH	H	
vicenina-2	apigenina	gli	gli	H	OH	H	
lucenina-2	luteolina	gli	gli	OH	OH	H	
7-O-glicosil-apigenina	apigenina	H	H	H	OH	gli	
6-C-quinovosil-luteolina	luteolina	qui	H	OH	OH	H	
6-C-fucosil-luteolina	luteolina	fuc	H	OH	OH	H	
6,8-di-C-glicosil-crisina	crisina	gli	gli	H	H	H	
4''-O-glicopiranosil-8-C-digitoxosil-luteolina	luteolina	H	dig-O-gli	OH	OH	H	
8-C-digitoxopiranosil-apigenina	apigenina	H	dig	H	OH	H	
8-C-digitoxopiranosil-luteolina	luteolina	H	dig	OH	OH	H	
8-C-boivinopiranosil-apigenina	apigenina	H	boi	H	OH	H	
8-C-boivinopiranosil-luteolina	luteolina	H	boi	OH	OH	H	

gli = glicose; ara = arabinose; xil = xilose; qui = quinovose; ram = ramnose; fuc = fucose; dig = digitoxose; boi = boivinoso.

Em relação aos açúcares dos flavonoides *C*-glicosídeos, são encontrados principalmente glicose, entretanto outros açúcares também são descritos, como rarnose e xilose, e ainda, algumas hexoses mais raras são também encontradas, como digitoxose e boivinose, que são 2-deoxiaçúcares de ocorrência mais restrita (**Figura 10**).

Figura 10 - Estruturas das unidades de açúcares descritas para os flavonoides *C*-glicosídeos em *Passiflora*. (CHOPIN; BOUILLANT, 1975)



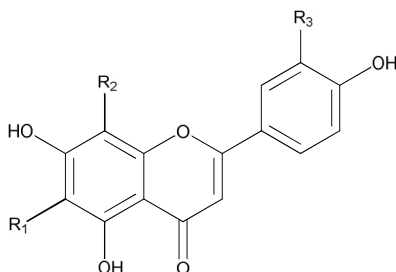
Referência: Chopin; Bouillant (1975).

Especificamente abordando as espécies estudadas nesse trabalho, para as folhas de *P. alata* já foram descritas a presença de isovitexina, vitexina, orientina, 2''-*O*-xilossil-vitexina (ULUBELEN et al., 1982b) rutina, isoorientina (PEREIRA et al., 2004), 2''-*O*-ramnosil-

vitexina, 2''-*O*-ramnosil-escoparina e 2''-*O*-ramnosil-orientina (DOYAMA et al., 2005) (**Figura 11**).

Para o pericarpo do fruto dessa espécie, é descrita a presença de 2''-*O*-ramnosil-vitexina (ZUCOLOTTO et al., 2012).

Figura 11 - Flavonoides *C*-glicosídeos descritos para *P. alata*.



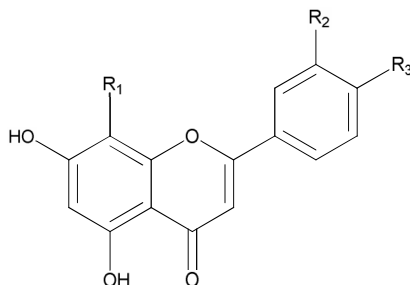
Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃
isovitexina	gli	H	H
vitexina	H	gli	H
orientina	H	gli	OH
isoorientina	gli	H	OH
2''- <i>O</i> -xilosil-vitexina	H	gli- <i>O</i> -xil	H
2''- <i>O</i> -ramnosil-vitexina	H	gli- <i>O</i> -ram	H
2''- <i>O</i> -ramnosil-escoparina	H	gli- <i>O</i> -ram	OCH ₃
2''- <i>O</i> -ramnosil-orientina	H	gli- <i>O</i> -ram	OH

gli = glicose; xil = xilose; ram = ramnose.

Referência: Doyama e colaboradores (2005); Pereira e colaboradores (2004); Ulubelen e colaboradores (1982a).

Para *P. quadrangularis*, até o presente ano não haviam sido descritos flavonoides *C*-glicosídeos em sua composição química. Entretanto, durante a elaboração desta tese, foi publicado um estudo que apresenta análises por CLAE-DAD-ESI-MS/MS de diversas espécies de *Passiflora*, entre elas de *P. quadrangularis*. Nesse trabalho, foram identificados nas folhas dessa espécie os flavonoides 2''-*O*-xilosil-orientina, 2''-*O*-xilosil-vitexina e 2''-*O*-glicosil-vitexina (SAKALEM et al., 2013) (**Figura 12**).

Figura 12 - Flavonoides *C*-glicosídeos identificados para a espécie *P. quadrangularis*.



Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃
2''-O-xilosil-orientina	gli-O-xil	OH	OH
2''-O-xilosil-vitexina	gli-O-xil	H	OH
2''-O-glicosil-vitexina	gli-O-gli	H	OH

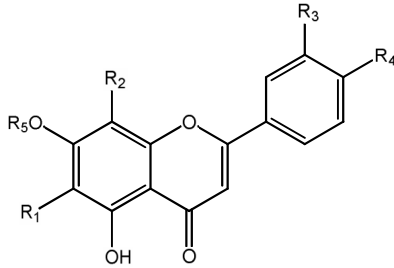
gli = glicose; xil = xilose.

Referência: Sakalem e colaboradores (2013).

Em relação à *P. tripartita* var. *mollissima*, estudos recentes realizados pelo nosso grupo demonstraram a presença de flavonoides *C*-glicosídeos também para essa espécie. Ramos e colaboradores (2010) isolaram e identificaram, a partir das folhas, um derivado de orientina denominado como 4'-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina, descrito pela primeira vez na literatura. Posteriormente, Zucolotto e colaboradores (2012) identificaram os flavonoides isorientina, orientina, isovitexina, vitexina, swertisina e vicenina-2 nas folhas dessa espécie, e isorientina, orientina, isovitexina observadas também no pericarpo dos frutos (**Figura 13**).

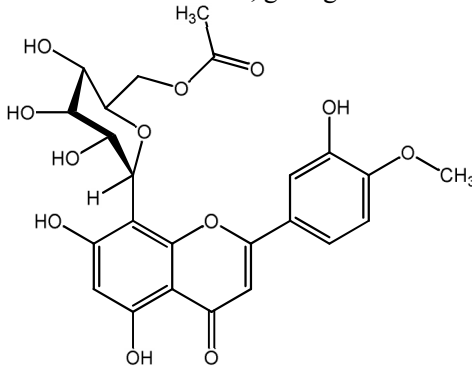
Durante a conclusão desta tese, foi publicado um estudo químico dos frutos dessa espécie, no qual foram isolados os flavonoides 4'-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina, schaftosídeo, vicenina-2, orientina e vitexina a partir da casca dos frutos por Cromatografia Contracorrente, e por CLAE-DAD-ESI-MS, identificou outros dezoito flavonoides *C*-glicosídeos e quatro flavonoides *O*-glicosídeos nas cascas e polpa dessa espécie (**Figura 13**) (SIMIRGIOTIS et al., 2013).

Figura 13 - Flavonoides identificados para a espécie *P. tripartita* var. *mollissima*.



Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
vicenina-2	gli	gli	H	OH	H
swertisina	gli	H	H	OH	CH ₃
orientina	H	gli	OH	OH	H
isoorientina	gli	H	OH	OH	H
vitexina	H	gli	H	OH	H
isovitexina	gli	H	H	OH	H
schaftosídeo	ara	gli	H	OH	H

ara = arabinose, gli = glicose



4'-O-metil-8-C-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina

Referência: Ramos e colaboradores (2010); Simirgiotis e colaboradores (2013); Zucolotto e colaboradores (2012).

1.5.2 Saponinas

Saponinas constituem uma importante classe de metabólitos secundários relatados para algumas espécies do gênero *Passiflora*. Esse grupo de substâncias tem sido de grande interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, componente ativo de drogas vegetais, ou ainda como matéria-prima para síntese de esteroides (SCHENKEL, GOSMANN, ATHAYDE, 2011).

O nome ‘saponina’ deriva da palavra latina ‘*sapo*’ (sabão, em português; ‘soap’, em inglês), e isso se deve a propriedade dessas substâncias de formar espumas estáveis em água. Essa característica fez com que, por muitos anos, espécies ricas em saponinas fossem usadas como sabão, inclusive refletindo em seus nomes científicos e populares: *Saponaria officinalis* (saponária, ‘soapwort’ em inglês), *Quillaja saponaria* (quilaia, ‘soapbark’ em inglês), *Sapindus saponaria* (saboeiro, ‘soapberry’ em inglês), *Sapindus mukurossi* (‘soapnut’ em inglês) (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995).

Revisões abrangentes sobre a classe das saponinas podem ser encontradas na literatura (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995; JASTRZEBSKA, 2012; MAN et al., 2010; OLESZEK, 2002; SPARG; LIGHT; STADEN, 2004). A seguir serão abordados algumas generalidades sobre saponinas.

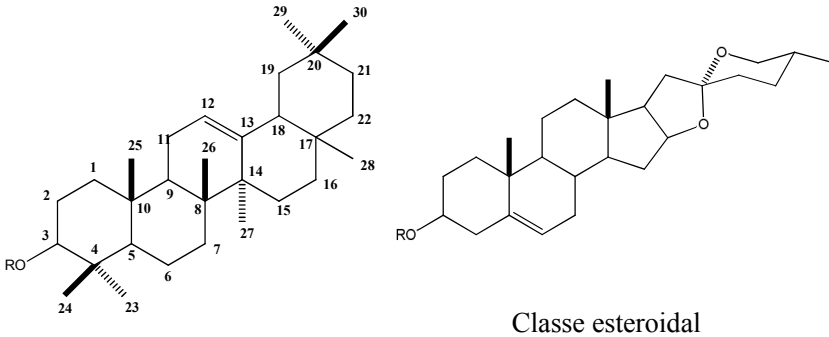
1.5.2.1 Generalidades

A definição clássica de saponinas é baseada em suas propriedades tais como a formação de espuma estável em água, atividade hemolítica, atividade tóxica a peixes (ictiotóxicas) e por seu amargor característico. Entretanto, diversas saponinas não apresentam tais propriedades, sendo que atualmente a sua definição é baseada na sua estrutura química (SCHENKEL, GOSMANN, ATHAYDE, 2011).

Quimicamente as saponinas são glicosídeos de alto massa molecular, formadas por um núcleo apolar, denominado agliconas ou genina, e por uma porção polar, que corresponde a(s) unidade(s) de açúcar ligada ao núcleo. Dependendo do tipo de núcleo/aglicona presente, as saponinas são divididas em duas classes principais: saponinas triterpênicas (compostas de 30 átomos de carbono) ou saponinas esteroidais (compostas por 27 átomos de carbono) (**Figura 14**). De acordo com essa porção glicídica, quando ocorre a presença de apenas uma unidade de açúcar ou uma cadeia de açúcar em um único carbono da aglicona, as saponinas são chamadas monodesmosídicas. Quando duas unidades de açúcar ou duas cadeias de açúcares

encontram-se ligadas em carbonos diferentes do núcleo, essas saponinas são chamadas bidesmosídicas. (MAN et al., 2010; SCHENKEL, GOSMANN, ATHAYDE, 2010).

Figura 14 - Dois principais núcleos encontrados em saponinas



Classe triterpênica

Classe esteroidal

Referência: Hosttetmann e Marston (1995).

Em relação à biossíntese desses compostos, tanto as saponinas triterpênicas quanto esteroidais iniciam sua rota biossintética através da via do Acetil-CoA, apresentando como principal intermediário o esqualeno, estrutura formada a partir da condensação de unidades de isopreno. A partir desse ponto, diferentes ciclizações do esqualeno levam a formação das diferentes classes de saponinas (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995).

Sparg, Light e Staden (2004) apresentaram uma extensa revisão sobre atividades biológicas de saponinas. Entre os diversos estudos apresentados, as principais atividades relatadas são atividade hemolítica, anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, antimicrobiana e antiviral.

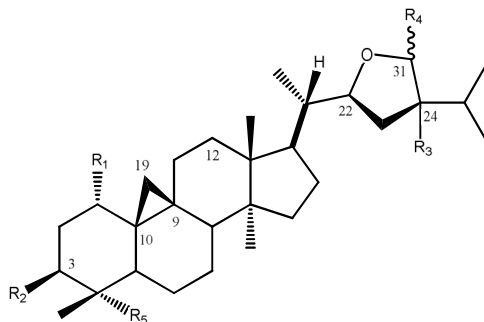
Na literatura são encontrados alguns poucos trabalhos sobre atividade de saponinas junto ao SNC, tendo sido descritos efeito sedativo para as saponinas de *Panax ginseng*, assim como foi observado efeito semelhante para saponinas de *Colubrina asiática*, *Ziziphus jujuba* e *Cussonia barteri*. (DUBOIS et al., 1986; HOSTTETMANN; MARSTON, 1995; WAGNER et al., 1983).

1.5.2.2 Saponinas em espécies de *Passiflora*

Em relação às saponinas presentes em espécies do gênero *Passiflora*, um dos primeiros estudos para essa classe foi com o

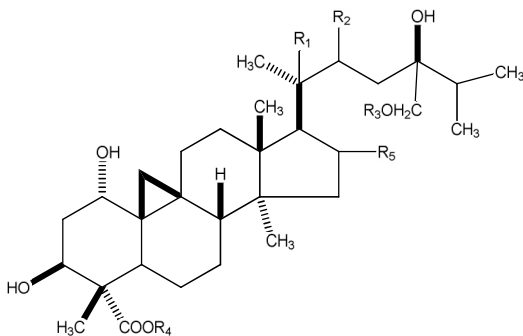
composto ‘passiflorina’, uma saponina glicosídica triterpênica, derivada do núcleo cicloartano e com a presença de um grupamento hemiacetal, que foi isolada das folhas de *P. edulis* e posteriormente identificada também em folhas de *P. quadrangularis* e *P. mollissima* (BOMBARDELLI et al., 1975). Ainda para *P. edulis*, são descritas onze saponinas, denominadas ciclopasiflosídeos I – XI (YOSKHIKAWA et al., 2000a,b). As estruturas destes compostos estão apresentadas na **Figura 15**.

Figura 15 - Estruturas da saponina ‘passiflorina’ e dos ciclopasiflosídeos I – XI



passiflorina

$R_1=R_2=R_3=R_4 = OH$; $R_5 = CO_2-\beta-D\text{-glicose}$



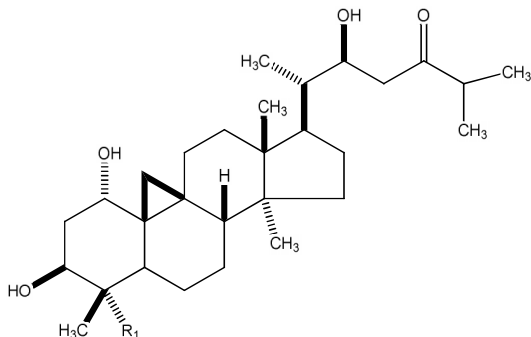
Ciclopasiflosídeo I = $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = OH$, $R_4 = gli$

Ciclopasiflosídeo II = $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = H$, $R_4 = gli$

Ciclopasiflosídeo III = $R_1 = R_2 = R_5 = H$, $R_3 = R_4 = gli$

Ciclopasiflosídeo IV = $R_1 = OH$, $R_2 = R_3 = R_5 = H$, $R_4 = gli$

- Ciclopasiflosideo V = $R_1=OH$, $R_2=R_3=H$, $R_3=R_4=gli$
 Ciclopasiflosideo VII = $R_1=OH$, $R_2=R_3=H$, $R_4=gli$, $R_5=\beta-OH$
 Ciclopasiflosideo VIII = $R_1=R_2=R_3=H$, $R_4=gli$, $R_5=\beta-OH$
 Ciclopasiflosideo IX = $R_1=R_2=H$, $R_3=R_4=gli$, $R_5=\beta-OH$
 Ciclopasiflosideo X = $R_1=R_2=R_3=H$, $R_4=gli$, $R_5=\alpha-OH$
 Ciclopasiflosideo XI = $R_1=R_2=H$, $R_3=R_4=gli$, $R_5=\alpha-OH$

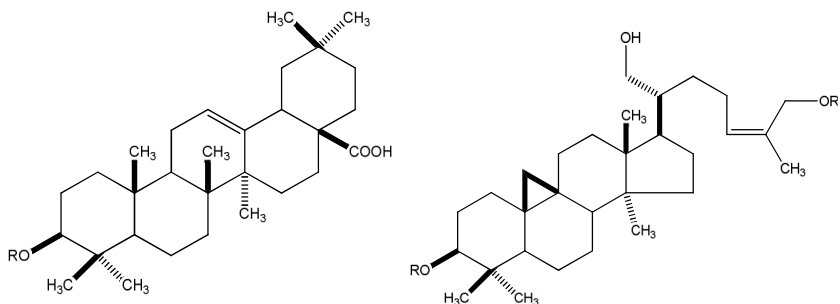


Ciclopasiflosideo VI = $R_1=gli$

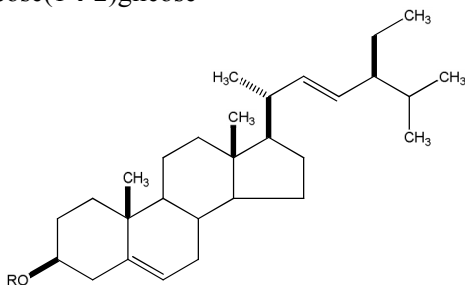
Referência: Bombardelli e colaboradores (1975); Yoskhikawa e colaboradores (2000a,b).

Para a espécie *P. alata*, é descritas a presença de quatro saponinas de núcleo triterpênico, os ácidos 3-*O*- β -D-glicopiranosil-oleanólico, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil-oleanólico e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-oleanólico, além do 3,26-di-*O*-gentiobiosil-9,19-ciclolanost-24*Z*-en-3 β ,21,26-triol (quadrangulosídeo) e de uma saponina de núcleo esteroidal, o 3-*O*- β -D-glicopiranosil-estigmasterol (**Figura 16**), isoladas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie (DOYAMA et al., 2005; REGINATTO et al., 2001).

Figura 16 - Estruturas das saponinas descritas para *P. alata*.



- (1) R = glicose
 (2) R = glicose(1→3)glicose
 (3) R = glicose(1→2)glicose
 (4) R = gentiobiose



- (5) R = glicose

(1) 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico; (2) 3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico; (3) 3-*O*-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico; (4) quadranulosídeo; (5) 3-*O*-β-D-glicopiranosil-estigmasterol.

Referência: Reginatto e colaboradores (2001).

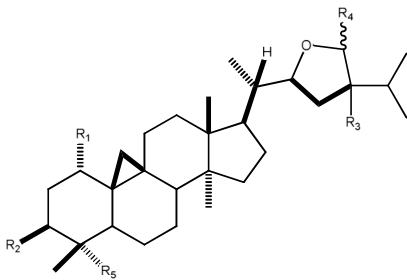
Em uma análise quantitativa do extrato aquoso das folhas desta mesma espécie utilizando CLAE-UV, Reginatto e colaboradores (2004) constataram que o quadranulosídeo representa 22,2% (m/m) do extrato aquoso das folhas, correspondendo a 0,8% em relação às folhas secas e constituindo-se no composto majoritário para a espécie.

Outra espécie de *Passiflora* que apresenta saponinas em sua constituição é *P. quadrangularis*. Para esta espécie, como já mencionado, primeiramente foi descrito a saponina ‘passiflorina’, identificada nas folhas por Bombardelli e colaboradores (1975), por meio de comparação com padrão, identificado previamente em *P. edulis*.

Dez anos após, Orsini e colaboradores (1985) isolaram e identificaram, a partir das folhas, uma saponina triterpênica inédita, também derivado de núcleo cicloartano, a qual denominaram como ‘quadrangulosídeo’ (3,26-di-*O*-gentiobiosil-9,19-ciclolanostano-24*Z*-en-3 β ,21,26-triol) (Figura 17).

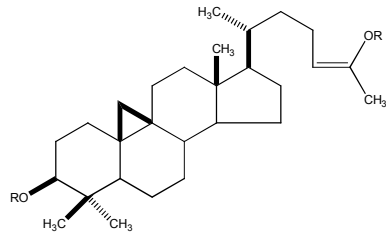
Em outro estudo com essa espécie vegetal, os mesmos autores, ao aplicarem a cromatografia em contracorrente em gotas isolaram também as saponinas 3 β -*O*-gentiobiosil-9,19-ciclolanostano-22,25-epóxi-3 β -21,22(R)-triol (denominada pelos autores como 22-hidroxi-isoquadrangulosídeo) e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico, a partir das folhas desta espécie (ORSINI; VEROTTA, 1985). Entretanto, o foco desse trabalho foi a técnica cromatográfica utilizada, assim que a identificação destes compostos foi detalhada em uma publicação posterior. Nesse referido trabalho, os autores descrevem a identificação destas saponinas, assim como de outra saponina inédita também de estrutura relacionada ao quadrangulosídeo: 3 β -*O*-gentiobiosídeo-9,19-ciclolanostano-21,24-epóxi-3 β -25,26-triol (ORSINI et al., 1987).

Figura 17 - Saponinas descritas para *P. quadrangularis*.



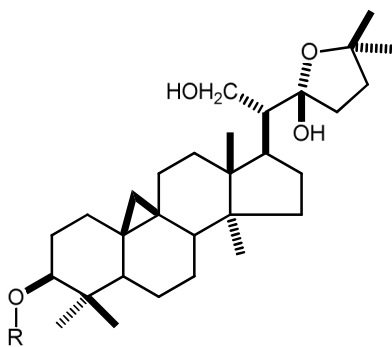
(1)

$R_1=R_2=R_3=R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{CO}_2\text{-}\beta\text{-D-glicose}$

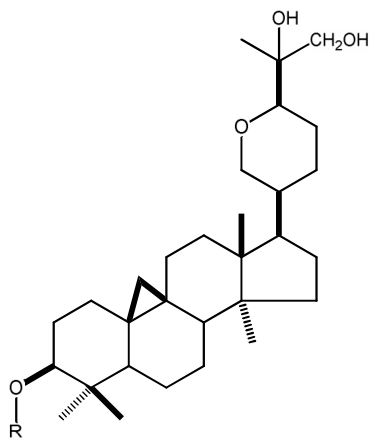


(2)

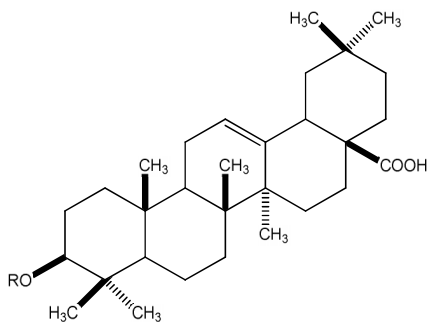
$R = \text{gentiobiose}$



(3)
R = gentiobiose



(4)
R = gentiobiose



(5)
R = glicose(1→2)glicose

(1) passiflorina; (2) quadrangulosídeo; (3) 9,19-ciclolanostano-22,25-epóxi-3 β -21,22(R)-tríol-3 β -O-gentiobiosídeo; (4) 9,19-ciclolanostano-21,24-epóxi-3 β -25,26-tríol-3 β -O-gentiobiosídeo; (5) ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-oleanólico.

Referência: Bombardelli e colaboradores (1975); Orsini e colaboradores (1985); Orsini e Verotta (1985); Orsini e colaboradores (1987).

Interessante observar que a maioria das saponinas isoladas do gênero *Passiflora* possui núcleo do tipo cicloartano, com as variações entre as diferentes substâncias ocorrendo principalmente na cadeia lateral. Nesse sentido, há uma convergência da rota biossintética para a

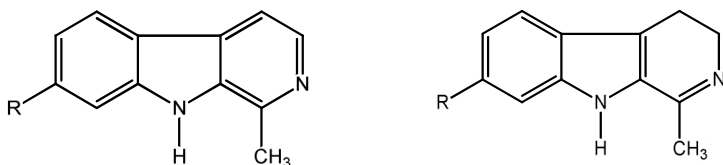
formação deste tipo de substância, por meio da formação de um precursor comum. Todavia, são descritas saponinas de núcleo triterpênico derivadas do ácido oleanólico e um relato de saponina de núcleo esteroidal, sugerindo também a formação de outros precursores biossintéticos a partir da ciclização do esqualeno (HOSTTETMANN; MARSTON, 1995).

1.5.3 Alcaloides

Alcaloides β -carbolínicos do tipo harmano (harmano, harmol, harmina, harmalol e harmalina, **Figura 18**) foram descritos inicialmente para *P. incarnata* (POETHKE et al., 1970) e para *P. edulis* (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI, MALEK; RYBACKA, 1975). Entretanto estudos mais recentes com metodologias mais sensíveis e robustas (como CLAE), não detectaram a presença desses alcaloides em espécies de *Passiflora* em concentrações iguais ou superiores a 0,1 ppm ($\mu\text{g/mL}$) (GRICE; FERREIRA; GRIFFITHS, 2001; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; SANTOS et al., 2006).

Cabe destacar que na literatura são encontrados trabalhos, principalmente na década de 70, atribuindo as atividades farmacológicas do gênero *Passiflora* sobre o SNC à presença dos alcaloides, embora atualmente já se saiba que alcaloides desse tipo possuem ação estimulante do SNC, por apresentarem atividade inibidora da monoamina oxidase (MAO) (HARRAIZ et al., 2010; HERRAIZ; CHAPARRO, 2005; McKENNA, 2004).

Figura 18 - Alcaloides do tipo harmano relatados para espécies do gênero *Passiflora*.



R = H \rightarrow harmano

R = OH \rightarrow harmol

R = OCH₃ \rightarrow harmina

R = OH \rightarrow harmalol

R = OCH₃ \rightarrow harmalina

Referências: Lutmoski e Malek (1975); Poethke e colaboradores (1970).

CAPÍTULO 2 - Análise dos principais constituintes químicos de espécies de *Passiflora* por técnicas cromatográficas e eletroforéticas

Conforme já descrito na revisão da literatura, apresentada no **Capítulo 1**, os principais grupos de metabólitos identificados no gênero *Passiflora* são os flavonoides C-glicosídeos, as saponinas e os alcaloides. A análise destes constituintes nas espécies estudadas nessa tese é relevante não somente pelo direcionamento dos estudos subsequentes, mas também como um aporte ao conhecimento da composição química destas espécies.

2.1 INTRODUÇÃO

Nesse capítulo inicialmente serão apresentadas abordagens sucintas sobre as técnicas de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) e Eletroforese Capilar (EC), ambas, até o momento, menos difundidas que a Cromatografia Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na análise de produtos naturais. Posteriormente, será descrita a avaliação fitoquímica das espécies de *Passiflora* investigadas nesse trabalho, em especial as análises de flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos, por diversas técnicas de separação, tais como CCD, CLAE, CLUE e EC.

2.1.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

A CLAE é a técnica analítica mais bem estabelecida e predominante nos laboratórios do mundo inteiro durante os últimos 30 anos. Na última década, entretanto, o desenvolvimento da CLAE tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico (YAO et al, 2011). Essa separação de alta eficiência se mostra necessária em várias áreas, como genômica, proteômica, metabolômica e na área farmacêutica, nas quais são analisadas amostras complexas ou em grande número (GUILLARME et al., 2010).

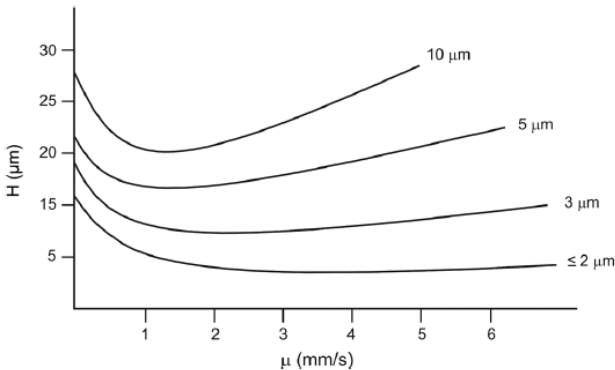
Para alcançar essa melhoria, a alternativa mais promissora foi a redução do tamanho das partículas da fase estacionária. Essa influência do tamanho de partícula na cromatografia líquida é apontada na equação de van Deemter (1), apresentada abaixo:

$$H = Ad_p + BD_M / \mu + Cd_p^2 \mu / D_M \quad (1)$$

A equação de van Deemter descreve a relação entre eficiência, expressa pela altura de prato teórico (H , μm), velocidade linear da fase móvel (μ , mm/s) e tamanho da partícula (d_p). São considerados ainda o coeficiente de difusão do analito (D_M) e as constantes A, B e C, que se referem ao alargamento dos picos, difusão do soluto na fase móvel e transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, respectivamente (NEUE; KELE, 2007).

Na **Figura 19**, estão apresentadas as curvas da equação de van Deemter, para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$, que mostram que as partículas $\leq 2 \mu\text{m}$ podem ser usadas para separações rápidas e ultrarrápidas, pois a eficiência de separação pode ser mantida com colunas mais curtas e maiores velocidades lineares de fase móvel (NGUYEN et al., 2006).

Figura 19 - Curva de van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$.



H: altura do prato teórico; μ : velocidade linear da fase móvel

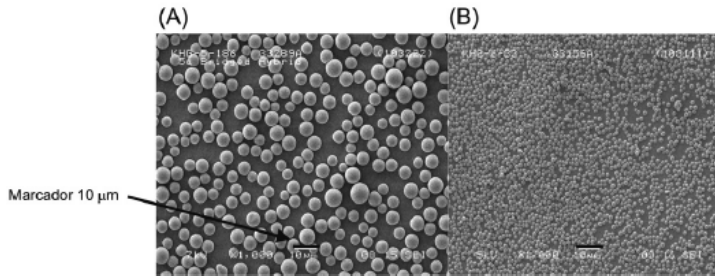
Fonte: Maldaner e Jardim (2009).

O uso de partículas menores que $2 \mu\text{m}$ permite que a eficiência de separação seja mantida, uma vez que seja diminuído o comprimento da coluna. Portanto, uma coluna menor permite separações mais rápidas, além de um menor consumo de solvente e de amostra (MALDANER; JARDIM, 2009; NGUYEN et al., 2006).

Desse modo, para contornar o obstáculo da pressão e fazer uso das partículas menores que $2 \mu\text{m}$ (**Figura 20**) e com o máximo de desempenho cromatográfico, sistemas capazes de trabalhar em altas pressões (15.000 psi ou $\sim 1030 \text{ bar}$) foram desenvolvidos e esse avanço

da cromatografia líquida foi denominado de *Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência* (CLUE, ou UPLC, do inglês ‘*ultra performance liquid chromatography*’) (YAO et al., 2010; ZOTOU, 2012).

Figura 20 - Microscopia das partículas de sílica.



(A) partícula de 5 µm, (B) partícula de 1,7 µm
Fonte: Maldaner e Jardim (2009), adaptado de Waters®.

O uso dessas partículas menores associada com as altas velocidades lineares da fase móvel e com uma instrumentação que opera a pressões maiores que as observadas em CLAE, resultaram em análises com maior resolução, maior sensibilidade e menor tempo (MALDANER; JARDIM, 2009).

Para viabilizar essas novas características das análises, novos equipamentos foram introduzidos e adaptados a partir de 2004. As modificações que se mostraram necessárias para a implementação dessa nova técnica foram: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (15.000 psi), volumes internos muito menores (componente de tubulação, injeção e detecção), injetores com precisão para pequenos volumes, células do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoria no sistema de análise de dados e colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto (MALDANER; JARDIM, 2009; NGUYEN et al., 2006; WREN, 2005).

Um fator que tem facilitado o uso e adaptação a CLUE é a possibilidade de transferência de um método já desenvolvido e validado empregando CLAE para um sistema de CLUE (GUILLARME et al., 2008). Essa transferência de método é geralmente possível, desde que determinados fatores sejam considerados:

- Fases estacionárias sejam semelhantes;

- Volume extra coluna, para evitar o alargamento dos picos e consequente perda de resolução (quando a separação ocorre em modo isocrático);
- Tempo de residência da FM na coluna, que resulta em variações nos tempos de retenção (quando a separação ocorre em modo gradiente);
- Composições inicial e final da fase móvel, que devem permanecer constantes entre os métodos por CLAE e CLUE (quando a separação ocorre em modo gradiente).

Adicionalmente aos fatores técnicos, esse tipo de equipamento também apresenta qualidades relacionadas a questão ambiental, uma vez que a quantidade de solvente consumida nas separações e o volume de amostra necessário são muito menores que os utilizados na técnica de CLAE, por exemplo. Enquanto que em trabalhos de rotina de um laboratório (de investigação ou uma empresa farmacêutica), o consumo de solventes por CLAE é na ordem de litros, por CLUE esse consumo seria restrito a ordem de mililitros.

Revisões mais detalhada sobre a técnica e equipamentos de CLUE são apresentadas por Maldaner e Jardim (2009) e Zotou (2012).

2.1.2 Eletroforese Capilar (EC)

A eletroforese capilar é uma técnica instrumental de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos, ionizáveis e até mesmo neutros, sob a ação de um campo elétrico. A eletroforese em si foi descrita por Tiselius na década de 30, na separação de constituintes proteicos do soro humano. Por esse trabalho, lhe foi conferido o Prêmio Nobel em 1948. Entretanto, somente na década de 80, com a implementação das técnicas capilares, foi que a eletroforese evoluiu para uma técnica automatizada, que permitiu sua implantação na rotina laboratorial (TAVARES, 1996).

Atualmente, o termo eletroforese capilar é empregado genericamente para designar todos os tipos de técnicas de separação eletrodirigidas, por meio do estabelecimento de um campo elétrico ao longo de um capilar. No entanto, existem diferentes tipos/modos de separações eletroforéticas. Os principais são/compreendem:

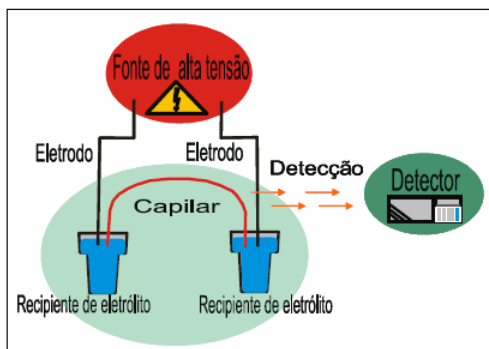
- Eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês '*capillary zone electrophoresis*').
- Eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês '*capillary gel electrophoresis*').

- Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês ‘*micellar electrokinetic chromatography*’).

Os diferentes tipos de eletroforese capilar possibilitaram que a técnica tivesse diversas aplicações em diferentes áreas, podendo-se citar farmacêutica, forense, clínica, alimentos, ambiental, química e bioquímica. As análises abrangem a separação de macromoléculas de interesse biológico, íons orgânicos ou inorgânicos, análises de bebidas, alimentos, produtos naturais, fármacos, explosivos, pesticidas, corantes, proteínas e peptídeos, DNA e RNA (SIMPSON et al., 2008).

Neste trabalho foi utilizada a técnica mais amplamente difundida, CZE ou apenas EC, em português. Nessa técnica, a amostra é introduzida no meio tamponado, como uma banda de pequena espessura. Quando a diferença de potencial é aplicada, cada zona migra independentemente, com velocidade constante, mas diferenciada, como consequência de suas mobilidades. O eletrólito pode ser aquoso ou orgânico, e pode conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (SUNTORNUSUK, 2002; TAVARES, 1996). Uma revisão mais detalhada sobre os tipos de eletroforese capilar e modos de separação são descritas por Silva e colaboradores (2007), Soares (2006) e Tavares (1997).

Na EC, a separação é conduzida em tubos, geralmente de sílica fundida, com dimensões de 25 a 150 μm de diâmetro interno, e 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. A fonte de alta tensão estabelece um campo elétrico ao longo do capilar podendo operar com tensão constante (-30 a 30 kV) e/ou corrente constante (-200 a 200 μA). Completam o instrumento os eletrodos (platinas são os mais comuns) e o detector, que mais comumente é o UV-DAD, mas sendo possível também o acoplamento com espectrômetro de massas (TAVARES, 1997). A **Figura 21** apresenta um desenho esquemático do funcionamento de um equipamento de EC.

Figura 21 - Diagrama esquemático da EC.

Fonte: adaptado de Heller (2010).

No equipamento, os capilares são mantidos dentro de um cartucho, que permite a introdução do capilar no aparelho além de facilitar a dissipação do calor, que será gerado pela passagem de corrente através do meio condutor. O capilar, uma vez preenchido com um eletrólito de corrida, que em geral é uma solução tampão, tem suas extremidades posicionadas em recipientes contendo o mesmo eletrólito, onde é aplicada uma diferença de potencial, que gera uma corrente elétrica no interior do capilar. Os eletrodos também se encontram mergulhados no eletrólito de corrida para que o circuito elétrico possa ser fechado (WATSON, 2005).

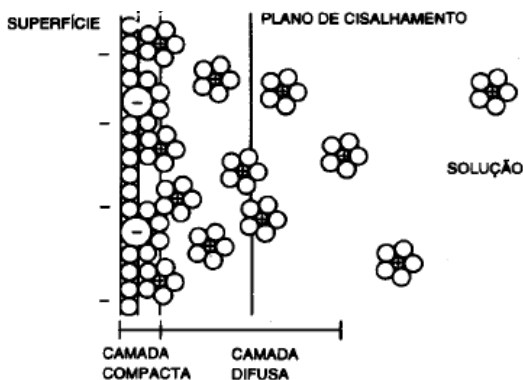
A injeção da amostra em EC pode ser de duas formas principais: eletrocinética ou hidrodinâmica. No modo de injeção hidrodinâmica, a amostra é introduzida no capilar por uma diferença de pressão (pressão positiva na entrada do capilar, vácuo na saída do capilar ou sifonagem) que se estabelece entre o reservatório do eletrólito e o capilar. Na injeção eletrocinética a amostra é introduzida no capilar pela aplicação de uma voltagem, geralmente 3 a 5 vezes menor que a voltagem de análise, ocasionando uma variação de potencial ao longo do tubo. Na maioria dos equipamentos de CE, a amostra é introduzida junto ao eletrodo ânodo e os analitos são detectados na extremidade do cátodo (SUNTORNUSUK, 2002; TAVARES, 1996).

A migração dos analitos em EC é regida por duas forças: a migração eletroforética e o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *'electroosmotic flow'*). A migração diz respeito ao analito, onde se considera a relação carga/massa, e também à viscosidade do meio. Já o

EOF é resultante da carga na parede interna do capilar durante aplicação de um campo elétrico (SUNTORNUSUK, 2002).

O capilar possui em sua parede grupos silanóis (Si-OH) que, em um determinado intervalo de pH se ionizam, formando grupos silanoato (Si-O⁻), deixando as paredes do capilar carregadas negativamente e com cargas positivas livres em solução. Para manter a eletroneutralidade dentro do tubo, uma camada de cátions formada pelos contra-íons do eletrólito de corrida adere à parede do capilar, resultando em um fenômeno de dupla camada elétrica. A concentração de íons de carga oposta na superfície diminui com a distância da parede e, esta região é conhecida como camada difusa (**Figura 22**) (SOARES, 2006; WATSON, 2005).

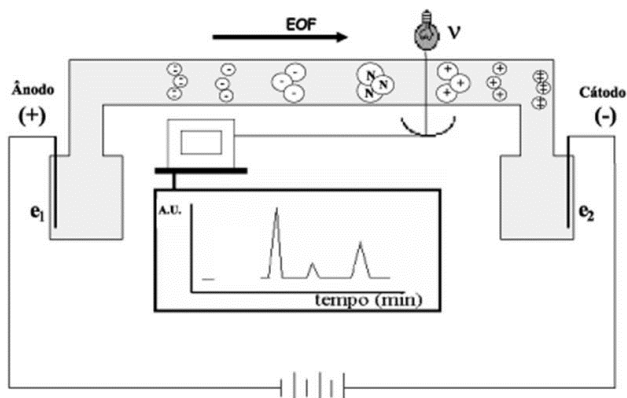
Figura 22 - Representação esquemática da interface capilar/solução.



Fonte: Tavares (1996).

Quando uma voltagem é aplicada na entrada do capilar e um campo elétrico é gerado no interior do capilar, a camada difusa é afetada por forças elétricas e começa a migração dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta; como esses íons estão solvatados por moléculas de água, esse deslocamento promove um fluxo de solução chamado fluxo eletrosmótico (EOF) (**Figura 23**). O EOF é um fenômeno que está presente em todas as separações por EC, com maior ou menor intensidade, e quando não for um valor negligenciável, pode contribuir positivamente ou negativamente para a mobilidade das espécies iônicas que estão sendo separadas (SOARES, 2006; WATSON, 2005).

Figura 23 - Representação esquemática do processo de eletroforese capilar.



EOF: Fluxo eletrosmótico.

Fonte: adaptado de Gervasio e colaboradores (2003).

Como demonstrado na **Figura 23**, sob condições ditas normais (na qual a parede do capilar está carregada negativamente), o EOF migra no sentido ânodo-cátodo. Cátions migram primeiro com grande velocidade em direção ao cátodo pela combinação do fluxo eletrosmótico e da mobilidade eletroforética do analito, definida pela carga do composto. Ânions serão conduzidos em direção ao cátodo, no caso da mobilidade efetiva desses analitos seja menor que a do EOF. Compostos neutros migram pelo capilar apenas influenciados pelo EOF, não sendo bem separados entre si (SUNTORNUSUK, 2002).

Revisões mais detalhada sobre a técnica e equipamentos de EC são apresentadas por Silva (2007), Tavares (1996, 1997) e Unger (2009).

2.2 OBJETIVOS

- Investigar qualitativamente, por meio de metodologias por CLAE, CLUE e EC a composição química dos extratos aquosos das folhas das espécies *Passiflora alata*, *P. quadrangularis*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. bogotensis*, com ênfase em flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Material vegetal

Folhas de espécies de *Passiflora* de origem brasileira e colombiana foram coletadas em diferentes regiões do Brasil e da Colômbia. As informações relativas a cada espécie estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Espécies de *Passiflora* analisadas, com seus respectivos nomes populares, locais de coleta, identificação e depósito.

Espécie	Nome popular local	Local de coleta	Responsável pela identificação
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linn.	Badea, Maracujá-gigante	Gigante, Huila – Colombia (2°59'55", - 75°18'16")	Prof. Luis Carlos Jimenez/ Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Mrs. Ademar Brancher
<i>Passiflora alata</i> Curtis.	Maracujá-doce	Urussanga, Santa Catarina – Brazil (- 28°32'9", - 49°18'59")	(EPAGRI/Urussanga-SC). Herbarium of the Federal University of Santa Catarina (FLOR 37823).
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Müller Jørgensen	Curuba-de-Castilla	Santa Sofia, Boyacá – Colombia (05°43'01", - 73°36'20")	Prof. Luis Carlos Jimenez/ Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL 530663)
<i>Passiflora bogotensis</i> Benth	-	Nemocón, Cundinamarca – Colombia (4°35'60", - 4°4'60")	Prof. Luis Carlos Jimenez/ Instituto Nacional de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (COL564523)

2.3.2 Preparação dos extratos

As folhas das diferentes espécies foram secas em estufa de ar circulante (35-40 °C), moídas em moinho de facas e extraídas por infusão aquosa, na proporção planta:solvente de 1:10 (m/v) a 95 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados.

Cabe destacar que o extrato aquoso liofilizado das folhas foi preparado na forma de infusão das folhas (chá), considerando a forma empregada pela população em suas preparações terapêuticas mais comuns (PIO CORREA, 1978).

2.3.2.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas pela dissolução do extrato aquoso bruto das espécies citadas em uma mistura de metanol e água (1:1, v/v). A concentração final dos extratos foi de 1000 µg/mL. Após a total dissolução e previamente às análises, as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm.

2.3.3 Equipamentos

Foram utilizados equipamentos disponíveis nos laboratórios de Química Farmacêutica, Farmacognosia e Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Catarina.

A secagem dos extratos foi realizada em um liofilizador EC MicroModulyo. A concentração de extratos ou frações foi realizada em evaporador rotatório Büchi equipado com bomba V700, controlador de pressão e recirculador de água termostatizado, sob temperatura não superior a 45 °C.

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em um equipamento PerkinElmer Series 200, equipado com detector UV com arranjo de diodos (UV-DAD), bomba quaternária, 'degasser' on-line, e injetor automático. Os dados foram processados no software Chromera[®] Workstation.

O equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) utilizado foi modelo Waters Acquity[®] H Class, equipado com detector UV com arranjo de fotodiodos (UV-PDA), bomba quaternária, 'degasser' on-line e injetor automático. Os dados foram processados no software Empower[®].

As análises por Eletroforese Capilar (EC) foram realizadas em um equipamento Agilent 7100, equipado com detector UV com arranjo de diodos (DAD) e injetor automático. A refrigeração do capilar foi realizada por passagem forçada de ar. O capilar utilizado foi de sílica fundida (Agilent, modelo G1600-61232), revestido externamente de poli-imida, 50 µm de diâmetro interno, 60,5 cm de comprimento e 52,0 cm até o detector, com janela de detecção expandida. Os dados foram processados no software Agilent ChemStation[®].

2.3.4 Procedimentos gerais

Os solventes empregados neste trabalho, tanto de grau analítico (P.A.) quanto grau HPLC foram de origem Merck e Tedia. Água para fins de análise por CLAE, CLUE ou CE foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]). Todas as soluções para análise por CLAE, CLUE e EC foram filtradas através de membrana 0,22 µm previamente ao uso.

Todas as substâncias de referência (padrões) utilizadas foram de procedência Sigma.

As análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasas de sílica F₂₅₄ (Merck), com suporte de alumínio.

Para as análises por EC foram preparadas soluções estoque dos eletrólitos tetraborato de sódio (TBS), acetato de amônio (AcNH₄), nas concentrações de 100 mmol/L. Os eletrólitos utilizados nas análises foram preparados diariamente. Também foram preparadas soluções de hidróxido de sódio (NaOH) nas concentrações de 1 e 0,1 mol/L. Todos os sais empregados foram de procedência Sigma.

2.3.5 Análises cromatográficas

2.3.5.1 Análises por CCD

Por esta técnica, foram investigados os metabólitos flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos.

Os extratos contendo flavonoides foram analisados por CCD utilizando como fase móvel uma combinação de acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v) (BIRK et al., 2005). A detecção dos flavonoides nos cromatogramas foi realizada mediante observação sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) antes e após a nebulização com o agente cromogênico (Reagente Natural A - difenilboriloxietilamina 1 % em metanol) (WAGNER; BLADT, 1996).

As análises para saponinas, de modo geral, foram realizadas utilizando como sistema eluente clorofórmio:etanol:ácido acético, em diferentes proporções (indicadas nas figuras dos cromatogramas). A detecção das saponinas nos cromatogramas foi mediante observação sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) e após nebulização do agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento (100 °C) até máximo desenvolvimento de coloração (REGINATTO et al., 2001; WAGNER; BLADT, 1996).

A presença de alcaloides do tipo harmano foi investigada por CCD utilizando como fase móvel clorofórmio:acetona:dietilamina (5:4:1, v/v/v) e detecção mediante observação sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) (WAGNER; BLADT, 1996).

O perfil de aminoácidos nos extratos foi avaliado por CCD utilizando como sistema eluente butanol:ácido acético:água (12:3:5, v/v/v) e detecção com o agente cromogênico ninidrina (BHUSHAN, 2008; MARONA et al., 1993).

2.3.5.2 Análises por CLAE

Por esta técnica, foi possível investigar os metabólitos flavonoides *C*-glicosídeos, saponinas, alcaloides.

Para a análise de flavonoides foi desenvolvido um método empregando uma coluna Vertical[®] VertSep C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm), com um gradiente de fase móvel de acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,5 % (B), com 15-35 % A (0-20 min). O fluxo foi mantido constante em 1,2 mL/min e a detecção realizada a 340 nm com a aquisição de espectros UV na faixa de 190 a 450 nm.

As condições cromatográficas para as análises de saponinas por CLAE foram as previamente descritas por Reginatto e colaboradores (2004). Foi empregada uma coluna Phenomenex Bondclone[®] Fenila (300 x 3.9 mm i.d.; 10 µm), com um gradiente de ACN (A) e H₂O (B), assim estabelecido: 29 % A (0-10 min), 29-35 % A (10-40 min), com fluxo de 1,2 mL/min e detecção a 205 nm, com aquisição de espectro UV na faixa de 190 a 450 nm.

Para a análise de alcaloides, foi adaptado o método descrito por Santos e colaboradores (2006), empregando uma coluna Vertical[®] VertSep C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm) e como fase móvel, uma mistura de tampão fosfato dibásico de sódio, 50 mmol/L, pH 8,0 (solvente A), metanol (solvente B) e acetonitrila (solvente C), em eluição isocrática, nas proporções 56 %A : 12 %B : 32 %C (0-20 min). O fluxo foi

mantido constante em 1,0 mL/min e a detecção realizada em 245 nm com a aquisição de espectros de UV na faixa de 190 a 450 nm.

O volume de injeção utilizado para todas as análises foi de 20 μ L, a temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), sendo a fase móvel preparada diariamente e desgaseificada por ultrassom e vácuo previamente ao uso.

2.3.5.3 Análises por CLUE

As análises por CLUE, tanto para flavonoides quanto para alcaloides, usaram as mesmas condições anteriormente utilizadas para CLAE, as quais foram transpostas com o auxílio do Software Empower[®]. Ambas as separações empregaram coluna PerkinElmer[®] BHE C18 (100 x 2,9 mm; 1,8 μm i.d.). Os espectros de UV foram adquiridos na faixa de 190 a 450 nm e as análises realizadas a temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

Para a análise de flavonoides, utilizou-se como fase móvel gradiente de ACN (solvente A) e ácido fórmico 0,5% (B), iniciando de 15-35% A (0-8 min), seguido de 35% A (8-10 min). O fluxo foi mantido constante a 0,25 mL/min, sendo a detecção realizada 340 nm. O volume de injeção foi de 3 μ L.

Para a análise de alcaloides, foi empregado como fase móvel uma mistura de tampão fosfato dibásico de sódio, 50 mmol/L, pH 8,0 (solvente A), metanol (solvente B) e acetonitrila (solvente C), 56 %A : 12 %B : 32 %C (0-7 min). O fluxo foi mantido constante em 0,2 mL/min e a detecção realizada em 245 nm. O volume de injeção foi de 2 μ L. (SANTOS et al., 2006).

2.3.6 Análises eletroforéticas por EC

Por esta técnica, foi possível investigar os metabólitos flavonoides C-glicosídeos, alcaloides e aminoácidos.

O capilar foi condicionado diariamente com lavagens a pressão de 940 mbar com NaOH 1 mol/L durante 5 minutos, com intervalo de espera de 1 minuto, seguido de 5 minutos de água grau Milli-Q e 5 minutos do eletrólito de corrida. No intervalo entre as análises, o capilar foi reconicionado com lavagens de 2 minutos com o eletrólito de corrida. Os espectros de UV foram adquiridos na faixa de 200 a 500 nm.

Para a análise de flavonoides C-glicosídeos foi desenvolvido um método empregando como eletrólito de corrida uma solução de 50 mmol/L de TBS, com 20 % de MeOH, em pH 9,5 (ajustado com NaOH 1 mol/L), sendo esse eletrólito renovado diariamente. O modo de injeção foi hidrodinâmico (50 mbar / 10 s), com um voltagem de

separação de +25 kV e temperatura do capilar constante em 30 °C. A detecção foi direta a 390 nm. O flavonoide apigenina foi utilizado como padrão interno (P.I.), apenas para a ajuste/correção do tempo de migração.

A análise de alcaloides foi baseada na metodologia descrita por Unger (1997). Assim, foi utilizado como eletrólito de corrida uma solução de 100 mmol L⁻¹ de AcNH₄, com 50% de ACN, em pH 4,0 (ajustado com ácido acético), sendo esse eletrólito renovado diariamente. O modo de injeção foi hidrodinâmico (50 mbar / 5 s), com voltagem de separação de +15 kV e temperatura do capilar constante em 15 °C. A detecção foi realizada a 245 nm.

2.3.7 Determinação dos limites de detecção e quantificação de alcaloides

Para as metodologias empregadas na análise de alcaloides por EC e CLUE, foram determinados os limites de quantificação e detecção. Para tanto, soluções padrão do alcaloide harmano foram preparadas em diferentes concentrações: 50,0; 20,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 µg/mL. A linearidade foi determinada usando cinco pontos para EC e nove para CLUE. Todas as soluções padrão foram preparadas e analisadas em triplicata em ambas as técnicas.

O limite de quantificação foi determinado pelo desvio padrão relativo maior que 5 % (e também pela relação sinal:ruído 10:1), obtido após análises em triplicata. Já o limite de detecção foi definido por meio da relação sinal:ruído, em uma proporção 3:1 (CASS; DEGANI, 2001; ICH, 2005).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em virtude dos relatos de diferentes classes de metabólitos para as espécies de *Passiflora*, os trabalhos inicialmente foram direcionados para a investigação por meio de técnicas cromatográficas e eletroforéticas quanto a presença flavonoides C-glicosídeos, saponinas, alcaloides e aminoácidos nas espécies apresentadas na **Tabela 2**.

Dentre esses compostos, os flavonoides C-glicosídeos são amplamente difundidos em diversas espécies do gênero (BIRK et al., 2005; ZUCOLOTTI et al., 2012). Saponinas, por sua vez, possuem distribuição mais restrita a algumas espécies, como *P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. edulis* (BIRK et al., 2005; BOMBARDELLI et al. 1975; COSTA et al., 2013; REGINATTO et al., 2001; YOSKHIKAWA et al., 2000a,b). Para os alcaloides, alguns estudos apontam sua presença

em *P. incarnata* e *P. edulis* (LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975; POETHKE et al., 1970), no entanto, a presença e/ou teores deste composto é questionada em outros trabalhos (GRICE; FERREIRA; GRIFFITHS, 2001; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; SPERONI; MINGHETTI et al., 1988).

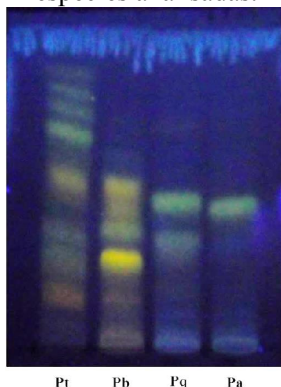
Em virtude da diversidade dos compostos presentes e com o intuito de fazer uso de diversas técnicas de separação, esses metabólitos foram analisados por técnicas como CCD, CLAE, CLUE e EC.

2.4.1 Análise de Flavonoides

2.4.1.1 Análise por CCD

A análise cromatográfica por CCD dos extratos aquosos brutos das folhas das diferentes espécies de *Passiflora* permitiu a observação de várias substâncias com características de flavonoides *C*-glicosídeos, considerando suas polaridades e colorações após a revelação. A **Figura 24** apresenta o perfil de flavonoides *C*-glicosídeos das espécies estudadas neste trabalho.

Figura 24 - Cromatografia em camada delgada dos extratos brutos das espécies analisadas.



Pt: *P. tripartita* var. *mollissima*; Pb: *P. bogotensis*; Pq: *P. quadrangularis*; Pa: *P. alata*.

FE: sílica F_{254nm}; FM: acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v); Detecção: Reagente Natural/ UV 360 nm.

Foi possível verificar perfis de flavonoides diferenciados entre as espécies analisadas. Enquanto *P. alata* e *P. quadrangularis*

apresentaram baixa riqueza no número de compostos detectados, *P. tripartita* var. *mollissima* apresentou uma perfil mais complexo no que concerne a esses compostos.

A comparação cromatográfica por CCD destes extratos brutos com padrões de flavonoides C-glicosídeos disponíveis no laboratório sugeriu a presença de alguns compostos conhecidos:

- *P. tripartita* var. *mollissima*: isoorientina, orientina, swertisina e vitexina;
- *P. bogotensis*: isoorientina e isovitexina;
- *P. quadrangularis*: vitexina;
- *P. alata*: 2''-O-ramnosil-vitexina

A análise por CCD permitiu a visualização clara de apenas 2''-O-ramnosil-vitexina no extrato aquoso das folhas de *P. alata*, flavonoide C-glicosídeo já descrito para esta espécie (MADOGLIO, 2011; OGA et al., 1984; PEREIRA et al., 2004; ULUBELEN et al., 1982b; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Para *P. quadrangularis*, foi observado substância com comportamento cromatográfico semelhante a vitexina, no que diz respeito ao valor de R_f e coloração pós-revelação.

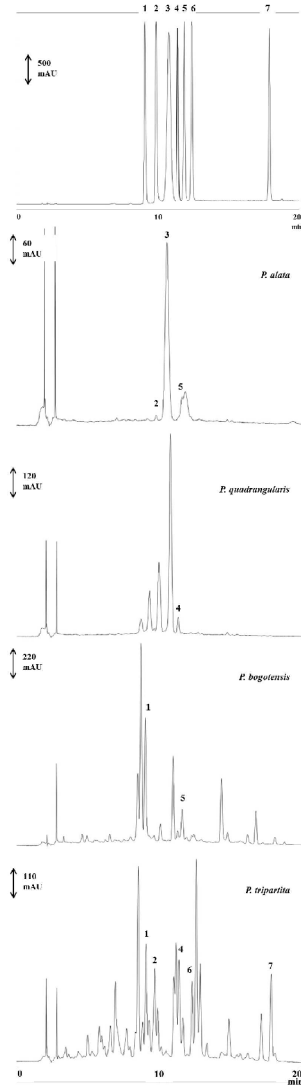
Da mesma maneira, para *P. bogotensis*, duas substâncias apresentaram comportamento cromatográfico semelhante a isoorientina e isovitexina.

Os flavonoides observados em *P. tripartita* var. *mollissima* já haviam sido descritos para essa espécie inclusive em trabalho prévio do nosso grupo de investigação (SIMIRGIOTIS et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012).

2.4.1.2 Análises por CLAE

Os cromatogramas obtidos por CLAE também permitiram visualizar os diferentes perfis de flavonoides entre as espécies analisadas. Nessa técnica, a identificação dos flavonoides foi realizada com base na comparação do tempo de retenção, por espectro de UV e por coinjeção da amostra com padrões (substâncias de referência) (**Figura 25**).

Figura 25 - Cromatogramas dos padrões e extratos aquosos das folhas das espécies de *Passiflora* para análise de flavonoides por CLAE.



1: isoorientina; 2: orientina; 3: 2''-*O*-ramnosil-vitexina; 4: vitexina; 5: isovitexina; 6: swertisina; 7: 4''-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina

FE: coluna C18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m); FM: gradiente ACN:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 1,2 mL/min; detecção: 340 nm.

Assim como previamente observado por CCD, o cromatograma da espécie *P. alata* apresentou o perfil mais simples e *P. tripartita* var. *mollissima*, o mais complexo, no que diz respeito a constituição de flavonoides. Embora essa metodologia não tenha permitido a separação de todas as substâncias das quatro espécies analisadas, possibilitou distinguir claramente os perfis dos flavonoides entre os extratos. Os picos foram avaliados em relação a sua pureza, e os espectros obtidos pelo DAD permitiram observar casos de sobreposição e também auxiliaram na identificação de alguns flavonoides não visualizados anteriormente por CCD, como por exemplo, a isovitexina em *P. alata* (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Flavonoides C-glicosídeos observados nos extratos aquosos das espécies analisadas, por meio de comparações cromatográficas por CCD e CLAE.

Espécie	Flavonoides C-glicosídeos
<i>P. alata</i>	orientina, 2''-O-ramnosil-vitexina e isovitexina
<i>P. quadrangularis</i>	vitexina
<i>P. bogotensis</i>	isorientina e isovitexina
<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	isorientina, orientina, vitexina, swertisina e 4'-O-metil-8-C-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> *	orientina, isorientina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, spinosina, 6-8-di-glicosil-crisina

*: Zucolotto e colaboradores (2012).

Os cromatogramas por CLAE dos extratos aquosos das espécies *P. alata* e *P. quadrangularis* possuem composição flavonoídica relativamente simples. Ambos apresentam um pico majoritário, com tempo de retenção e espectro de UV similares, o qual sugere tratar-se de um derivado de apigenina ($\lambda_{\text{máx}}$ 269, 335 nm). A coinjeção dos dois extratos demonstrou que o flavonoide majoritário é distinto nestas amostras, devido a formação de um pico duplo majoritário (dados não apresentados). Por outro lado, quando realizada a coinjeção dos extratos com padrões, foi possível identificar a 2''-O-ramnosil-vitexina (Tr: 10,0 min) como sendo o flavonoide majoritário apenas para *P. alata* (**Figura 25**).

Esses dados corroboram com resultados anteriormente descritos por nosso grupo, que haviam apontado a 2''-O-ramnosil-vitexina como sendo o flavonoide majoritário do extrato aquoso das folhas de *P. alata* (MADOGGIO, 2011; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Em outro estudo da literatura que empregou análises por CLAE, foram identificados os flavonoides presentes nas folhas de *P. alata* e comparado o seu perfil e teor aos de *P. incarnata*. Os autores constataram que isovitexina é o flavonoide majoritário de *P. incarnata* (1,198 %), embora não o seja em *P. alata* (0,018 %), pois somente traços de isovitexina e vitexina foram observados nesta espécie. Foi observada também a ausência de outros compostos como orientina, swertisina, hiperosídeo, rutina, hesperidina e ácido clorogênico em *P. alata* (MÜLLER et al., 2005).

Para a espécie *P. bogotensis*, o cromatograma obtido por CLAE permitiu uma melhor visualização da complexidade dos flavonoides C-glicosídeos presentes no extrato aquoso. Com a análise por coinjeção com padrões, foram identificadas isoorientina e isovitexina em sua constituição, cuja presença já havia sido indicada por CCD (**Figura 25**).

Destaca-se ainda o cromatograma do extrato aquoso da espécie *P. tripartita* var. *mollissima*, o qual apresenta, entre as espécies analisadas, a maior diversidade de compostos com características cromatográficas de flavonoides C-glicosídeos. Com relação a identidade desses compostos, swertisina foi o único que apresentou boa resolução, entretanto, isoorientina e orientina, não apresentaram boa resolução nesta análise devido a grande complexidade do extrato, o que ocasionou diversas sobreposições de picos (**Figura 25**). Entretanto, a partir de análise detalhada da coinjeção com base nos tempos de retenção e espectros UV, foi possível identificar os picos referentes a esses flavonoides.

Devido a elevada complexidade da composição de flavonoides no extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima*, fez-se necessário o desenvolvimento de um gradiente de fase móvel distinto para esta espécie, com a finalidade de se obter uma melhor resolução dos flavonoides presentes nesse extrato.

2.4.1.2.1 *Passiflora tripartita* var. *mollissima*

Entre as particularidades observadas para esse extrato (**Figura 25**), estavam o grande número de picos referentes a compostos flavonoidicos, as diferentes características de polaridade entre esses compostos, sendo possível observar um acúmulo de picos tanto nas partes iniciais quanto finais do cromatograma, e, em contrapartida, a baixa resolução entre alguns picos com eluição muito próximas.

Sendo assim, a partir da fase móvel empregada anteriormente, foram realizadas diversas modificações na programação do gradiente.

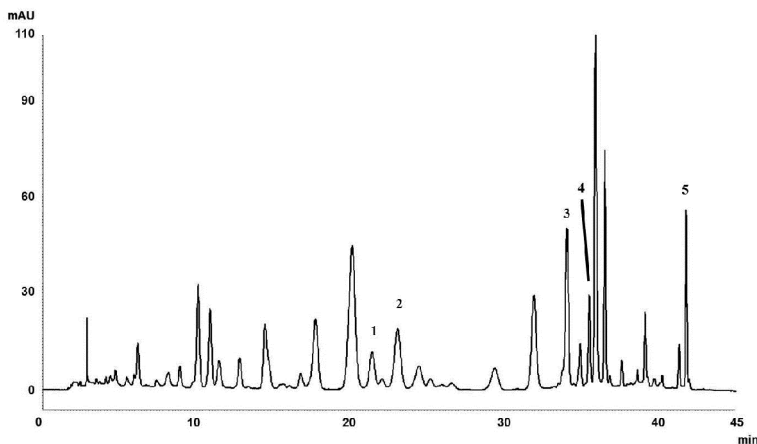
As alterações foram realizadas nas proporções iniciais do solvente orgânico, no número de passos do gradiente, no fluxo da fase móvel e também no tempo total de análise (dados não apresentados).

O aprimoramento do sistema de gradiente foi obtido através da alteração na constituição dos componentes da fase móvel, para a qual até o momento eram usados gradientes binários. A separação de alguns picos, especialmente da etapa inicial do cromatograma, só foi obtida com a inserção de um terceiro solvente no gradiente, o que permitiu um ajuste fino da polaridade ao longo do gradiente.

O sistema ternário desenvolvido foi composto de (A) acetonitrila, (B) metanol e (C) ác. fórmico 0,5 %, conforme apresentado na **Figura 26**. Empregou-se um fluxo de 1,2 mL/min, em um gradiente composto das seguintes etapas: de 12 % A e 1 % B em C para 14 % A e 1 % B em C (0-12 min), isocrático 14 % A e 1 % B em C (12-25 min), de em seguida de 14 % A e 1 % B em C para 18 % A e 2 % B em C (25-30 min), de 18 % A e 2 % B em C para 32 % A e 3 % B em C (30-40 min) e isocrático 32 % A e 3 % B em C (40-45 min).

O perfil de flavonoides do extrato aquoso das folhas dessa espécie é apresentado na **Figura 26**.

Figura 26 - Cromatograma obtido a partir do aprimoramento do gradiente para análise de flavonoides por CLAE no extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima*.



1: isoorientina; 2: orientina; 3: vitexina; 4: swertisina; 5: 4'-O-metil-8-C-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina.

FE: coluna C18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 µm); FM: gradiente
ACN:MeOH:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 1,2 mL/min; detecção: 340 nm.

O aperfeiçoamento do gradiente na separação do extrato aquoso bruto desta espécie permitiu a confirmação da complexidade de sua constituição de flavonoides, sendo possível distinguir aproximadamente 20 a 30 picos com boa resolução entre si. A partir dessa melhor separação, foi possível identificar também 4'-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina, flavonoide previamente relatado por Ramos e colaboradores (2007) e que devido ao seu elevado tempo de retenção, provavelmente não foi visualizado na metodologia anterior.

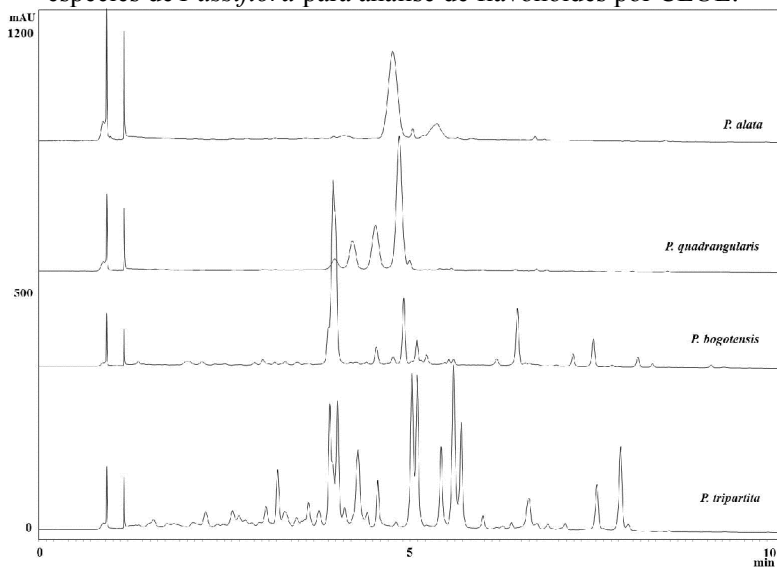
2.4.1.3 Análises por CLUE

A avaliação dos perfis cromatográficos de flavonoides por CLUE foi realizada visando análises mais rápidas, com menor consumo de amostra e de solventes, mantendo a resolução adequada entre os componentes previamente obtida por CLAE.

Para isso, foi feita a transposição dos métodos de CLAE para CLUE pelo software Empower[®]. Desse modo, foi possível aplicar o mesmo modelo de gradiente já desenvolvido, fazendo com que se mantivessem os mesmos perfis de flavonoides já obtidos, mas em menor tempo de análise e com menor consumo de solventes.

A **Figura 27** apresenta os cromatogramas obtidos para as espécies analisadas a partir da adequação da metodologia para CLUE.

Figura 27 - Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de *Passiflora* para análise de flavonoides por CLUE.

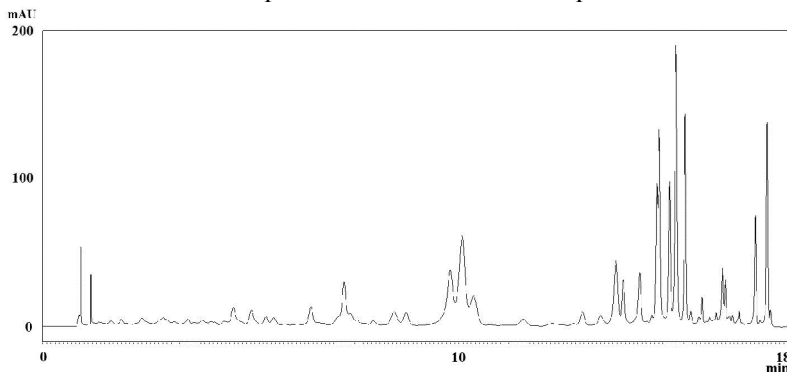


FE: coluna C18 (100 x 2,9 mm; 1,8 μm i.d.); FM: gradiente ACN:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 0,25 mL/min; detecção: 340 nm.

Com a utilização dessa técnica, foi possível obter uma redução de 60% no tempo total de análise (10 min), quando comparado as análises por CLAE (25 min), sem que houvesse perda de resolução entre os picos.

No que diz respeito à metodologia otimizada para a espécie *P. tripartita* var. *mollissima*, a transposição do método também mostrou bons resultados mesmo se tratando de um gradiente ternário, sendo que o perfil do extrato se manteve praticamente inalterado e com uma significativa redução no tempo de análise (**Figura 28**).

Figura 28 - Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima* para análise de flavonoides por CLUE.



FE: coluna C18 (100 x 2,9 mm; 1,8 μm i.d.); FM: gradiente
ACN:MeOH:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 0,25 mL/min; detecção: 340
nm.

As características observadas em nossas análises corroboram com estudos anteriores, que já demonstraram a potencial aplicação da técnica de CLUE para análises de espécies de *Passiflora*. Pietrogrande e colaboradores (2010), em estudo comparativo de diferentes fases estacionárias para CLUE, realizou a separação do extrato bruto de *P. incarnata* usando uma coluna Acquity[®] BHE C18, com tempo total de análise de 20 minutos, identificando no extrato os flavonoides orientina, vitexina e isovitexina.

Recentemente, foi avaliada a constituição de flavonoides de diversas espécies de *Passiflora* por CLUE-UV-MS. Utilizando como fase estacionária uma coluna Acquity[®] BEH Shield C18 foi possível realizar a análise de quatro flavonoides C-glicosídeos (orientina, isorientina, vitexina e isovitexina) em um tempo total de análise de 10 minutos. Entretanto, não foi observada a presença de nenhum desses flavonoides C-glicosídeos no extrato metanólico das folhas de *P. quadrangularis* (AVULA et al., 2012).

Em ambos estes trabalhos, as condições cromatográficas empregadas foram similares a usada neste trabalho, havendo inclusive tempos de análises similares, em especial para o estudo de Avula e colaboradores (2012). Embora os autores tenham avaliado também a espécie *P. quadrangularis*, o trabalho não apresenta cromatograma desse extrato especificamente, o que não permite uma comparação direta dos perfis de flavonoides.

2.4.1.4 Análises por EC

Adicionalmente às análises de flavonoides por métodos cromatográficos, também foram realizadas análises do perfil de flavonoides por EC. Diferentemente das técnicas cromatográficas, a EC realiza a separação baseada na diferença da relação carga/massa entre os componentes da amostra.

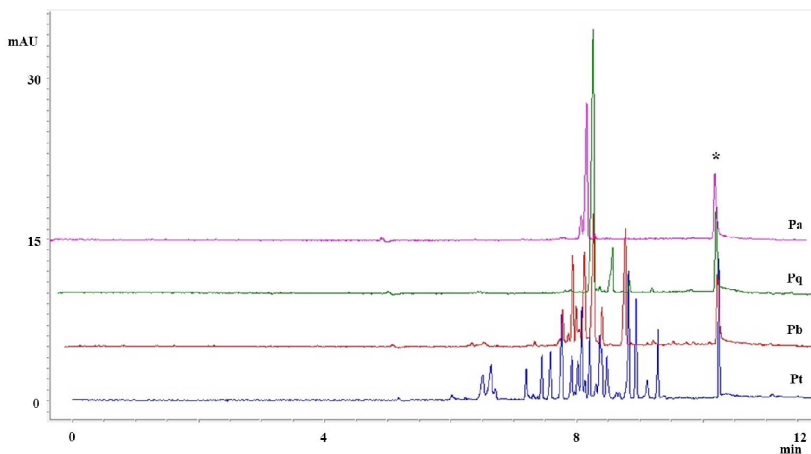
Revisões sobre a análise e separação de flavonoides revelaram que a grande maioria dos trabalhos por EC utiliza como eletrólito de corrida, tampão borato, em concentrações que variam de 25 a 75 mmol/L (MOLNAR-PERL; FÜZFAI, 2005; RIJKE et al., 2006).

Marchart e colaboradores (2006), para análises de flavonoides C-glicosídeos em extrato de *P. incarnata*, utilizaram como eletrólito de corrida o tampão tetraborato de sódio (TBS), na concentração de 25 mmol/L, com 20% de metanol como modificador orgânico, em pH 9,5. Com base nesse trabalho que foram definidas as condições iniciais do eletrólito de corrida utilizado em nossas análises.

Uma vez selecionadas as características do eletrólito de corrida, também foram determinadas as condições iniciais para a voltagem de separação (30 kV), a temperatura do capilar (30 °C), a detecção (390 nm) e a injeção por modo hidrodinâmico (50 mbar / 3 s).

Considerando que as análises cromatográficas prévias já haviam demonstrado uma maior complexidade de flavonoides no extrato aquoso de *P. tripartita* var. *mollissima*, as análises eletroforéticas foram iniciadas com o extrato dessa espécie. O eletroferograma obtido com as condições empregadas inicialmente está apresentado na **Figura 29**.

Figura 30 - Eletroferogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de *Passiflora* para análise de flavonoides por EC.



Pa: *P. alata*; Pq: *P. quadrangularis*; Pb: *P. bogotensis*; Pt: *P. tripartita* var. *mollissima*. *: apigenina (P.I.).

Capilar: Sílica fundida (60,5 comprimento total; 50 μm i.d.); eletrólito: TBS (50 mmol L^{-1} , 20% MeOH, pH 9,5); voltagem: 25 kV; temperatura: 30 $^{\circ}\text{C}$; detecção: 390 nm.

As análises de flavonoides por EC se mostraram satisfatórias em relação a redução no tempo total de corrida e, em especial, a resolução e simetria dos picos. Essa característica de pico é proporcionada pelo perfil típico do fluxo eletrosmótico (EOF) (**Figura 31**). O perfil uniforme produzido pelo EOF produz bandas eletroforéticas com maior frequência dos que os obtidos em separações por CLAE, devido ao fluxo parabólico, que evita a dispersão das zonas dos solutos.

Figura 31 - Perfil do fluxo obtido por CLAE e EC.



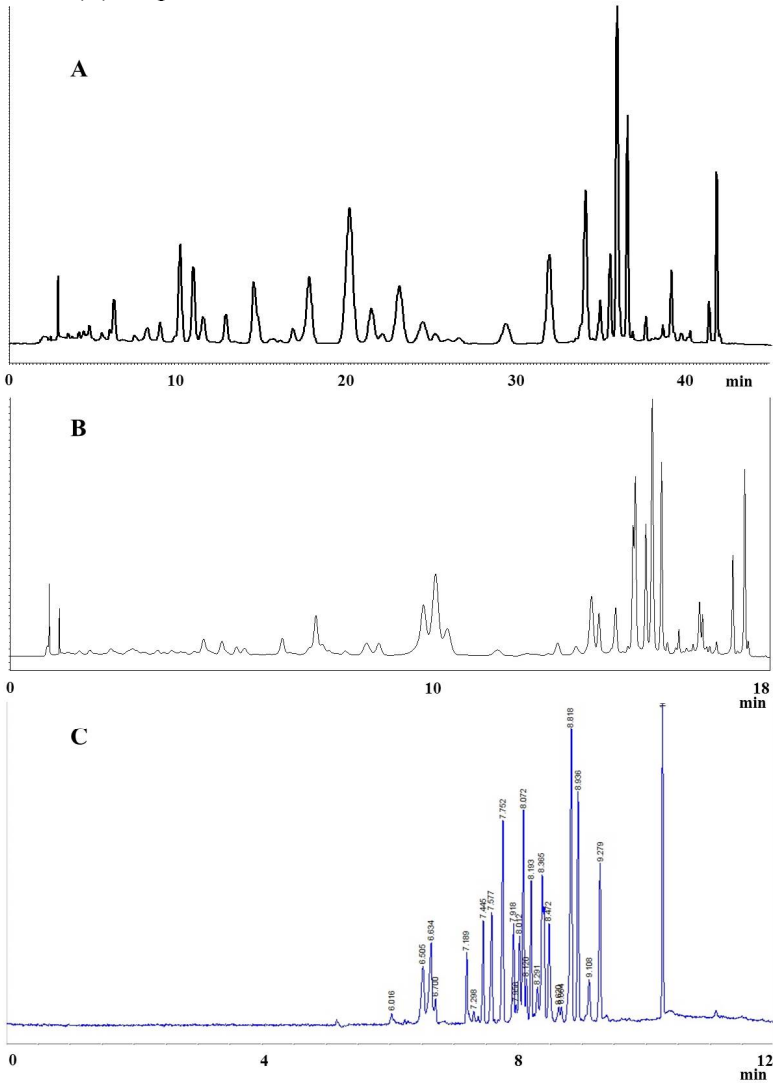
Fonte: autor.

Outro diferencial dessa técnica em relação às análises por CLAE ou CLUE é o comprimento de onda utilizado na detecção. Nas técnicas cromatográficas, a detecção de flavonoides C-glicosídeos é realizada geralmente na faixa de 330 a 350 nm, a qual constitui um dos máximos de absorção desses compostos e que também confere seletividade ao método. Já nas análises por eletroforese capilar, a utilização do TBS como eletrólito de corrida, em pH 9,5, acaba por deslocar esse máximo de absorção para um comprimento de onda de maior valor, em torno de 390 nm. Esse efeito batocrômico pode ser observado na banda I no espectro de UV dos flavonoides analisados por EC nessas condições, e é justificado pela formação de um complexo do borato em meio básico com o grupamento ceto-hidróxi (C-4 e C-5) e com as hidroxilas vicinais em C-3' e C-4'.

No que concerne ao perfil de flavonoides, a análise por EC apresentou resultado similar ao observado anteriormente por CLAE, especialmente na complexidade de sinais observada para cada extrato. Os ajustes realizados nos parâmetros eletroforéticos, alterando as características do EOF, permitiram uma boa separação para os picos em todos os extratos. Em relação ao extrato de perfil mais complexo (*P. tripartita* var. *mollissima*) foi possível obter uma separação com boa resolução, comparável com aquelas previamente descritas na literatura para outros extratos de *Passiflora* (MARCHART; KRENN; KOPP, 2003; PASTENE et al., 2000; VOIRIN et al., 2000).

Comparando de modo qualitativo as análises obtidas por técnicas cromatográficas (CLAE e CLUE) e eletroforética (EC) para o extrato de *P. tripartita* var. *mollissima* (**Figura 32**), observa-se que as técnicas de CLUE e EC se destacam, principalmente, pelos seus tempos de análise, quase 4 vezes mais rápidas que por CLAE (12 min contra 45 min). Outro fator bastante relevante é o baixo consumo de amostra e solventes, tanto por CLUE como por EC, o que torna essas técnicas mais limpas e econômicas. Apesar dessas vantagens no âmbito experimental, CLAE ainda é a técnica mais difundida entre os laboratórios no mundo, sendo também técnica oficial em grande parte das farmacopeias, inclusive a Brasileira (BRASIL, 2010), na caracterização e identificação de espécies oficiais de *Passiflora*.

Figura 32 - Comparação dos perfis de flavonoides do extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima* obtidos por CLAE (A), CLUE (B) e EC (C), respectivamente.



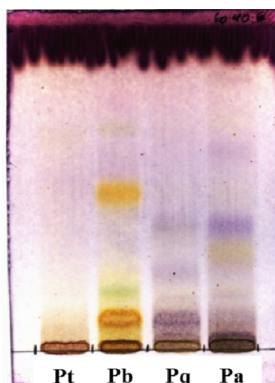
2.4.2 Análise de saponinas

2.4.2.1 Análise por CCD

O perfil de saponinas dos extratos aquosos brutos das folhas das diferentes espécies de *Passiflora* foi avaliado inicialmente por CCD, usando como fase móvel clorofórmio:etanol:ácido acético (60:40:6, v/v/v) e como reagente de detecção anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento (REGINATTO et al., 2001).

A análise por CCD indicou o acúmulo de várias substâncias com características cromatográficas de saponinas apenas nas espécies *P. alata* e *P. quadrangularis*, considerando o comportamento de polaridade e colorações das manchas após a revelação. A **Figura 33** apresenta o perfil de saponinas das espécies estudadas neste trabalho.

Figura 33 - Cromatografia em camada delgada para análise de saponinas nos extratos aquosos brutos das espécies analisadas.



Pt: *P. tripartita* var. *mollissima*; Pb: *P. bogotensis*; Pq: *P. quadrangularis*; Pa: *P. alata*.

FE: sílica F_{254nm}; FM: clorofórmio:etanol:ácido acético (60:40:5, v/v/v);
Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.

A presença de saponinas em *P. alata* já havia sido relatada em trabalhos anteriores do grupo, nos quais se destaca o predomínio da saponina majoritária quadrangulosídeo, sendo inclusive a de maior polaridade do extrato (REGINATTO et al., 2001, 2004). Birk e colaboradores (2005) em uma análise qualitativa por CCD analisaram a presença de flavonoides e saponinas de 14 espécies de *Passiflora* de

ocorrência no sul do Brasil (citam-se: *Passiflora actinia*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. elegans*, *P. foetida*, *P. misera*, *P. organensis*, *P. suberosa*, *P. tenuifila*, *P. tricuspis* e *P. warmingii*). Todas as amostras apresentaram flavonoides em sua composição, mas apenas em *P. alata* foi detectada a presença de saponinas.

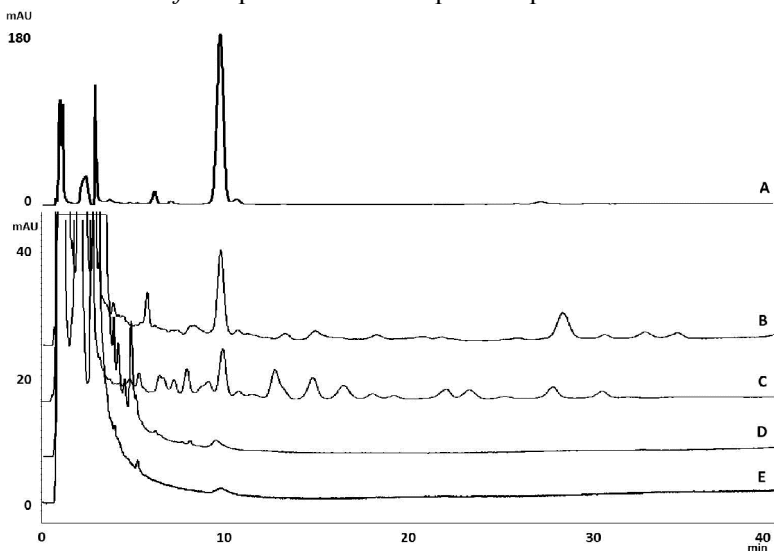
Para *P. quadrangularis*, aparentemente ocorre um maior acúmulo de saponinas, em especial com características mais apolares, embora também apresente saponinas de elevada polaridade, como o caso do próprio quadrangulosídeo, o qual foi isolado pela primeira vez desta espécie (ORSINI et al., 1985).

Já para a *P. tripartita* var. *mollissima*, Bombardelli e colaboradores (1975) descrevem a presença da saponina passiflorina, entretanto não são apresentados dados experimentais dessa substância para essa espécie, uma vez que tal trabalho era centrado na espécie *P. edulis*. Apesar da descrição na literatura, não foi verificada, em nossas análises, a presença desses compostos no extrato.

2.4.2.2 Análise por CLAE

As análises de saponinas por CLAE são condizentes com as análises prévias por CCD, sendo possível visualizar a predominância de picos com comportamento cromatográfico semelhante a saponinas apenas nos extratos aquosos das folhas de *P. alata* e *P. quadrangularis*. Nessa técnica, a identificação de saponinas foi realizada com base na comparação do tempo de retenção e de coinjeção da amostra com padrões. Foram injetados 20 μ L de cada amostra, na concentração de 5 mg/mL. Os perfis de saponinas das amostras analisadas estão apresentados na **Figura 34**.

Figura 34 - Cromatogramas dos extratos aquosos de espécies de *Passiflora* para análise de saponinas por CLAE.



A: quadrangulosídeo; B: *P. alata*; C: *P. quadrangularis*; D: *P. tripartita* var. *mollissima*; E: *P. bogotensis*.

FE: coluna fenila (300 x 3.9 mm i.d.; 10 μ m); FM: gradiente ACN:H₂O; fluxo: 1,2 mL/min; detecção: 205 nm.

Por meio de comparação com amostra de referência, foi possível identificar a saponina majoritária dos extratos aquosos, tanto para *P. alata* quanto para *P. quadrangularis*, como sendo quadrangulosídeo (tr: 10,0 min). Nesse sentido, essa saponina não se apresenta como um marcador químico na diferenciação dessas espécies. Uma discussão mais aprofundada a esse respeito será realizada no Capítulo 5.

Observa-se ainda que, embora os perfis cromatográficos desses dois extratos sejam similares em relação a seus compostos majoritários, há diferenças em relação aos seus constituintes minoritários.

2.4.3 Análise de alcaloides

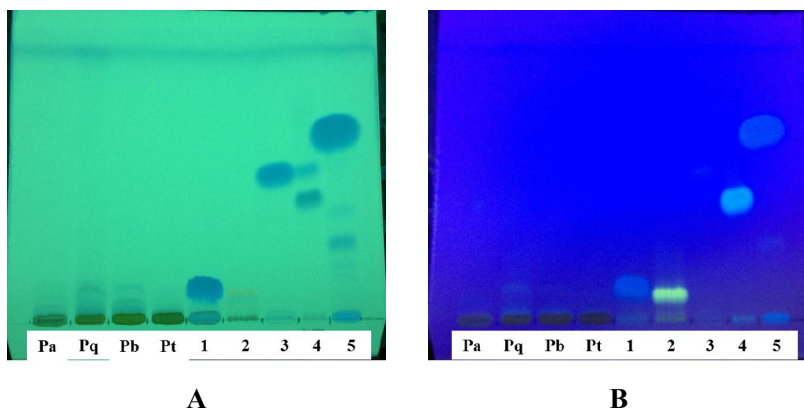
2.4.3.1 Análise por CCD

As análises por CCD foram direcionadas especificamente para alcaloides do tipo harmano, nas quais foi utilizado como fase móvel

clorofórmio:acetona:dietilamina (5:4:1, v/v/v). Para detecção, foi realizada observação em UV 254 e 360 nm (WAGNER; BLADT, 1996).

A **Figura 35** apresenta a análise de padrões de alcaloide do tipo harmano, tais como harmol, harmalol, harmalina, harmano e harmina, e dos extratos aquosos. Não foi possível detectar a presença destes compostos.

Figura 35 - Cromatografia em camada delgada para análise de alcaloides do tipo harmano nos extratos aquosos brutos das espécies analisadas.



Pa: *P. alata*; Pq: *P. quadrangularis*; Pb: *P. bogotensis*; Pt: *P. tripartita* var. *mollissima*. 1: harmol; 2: harmalol; 3: harmina; 4: harmalina; 5: harmano.

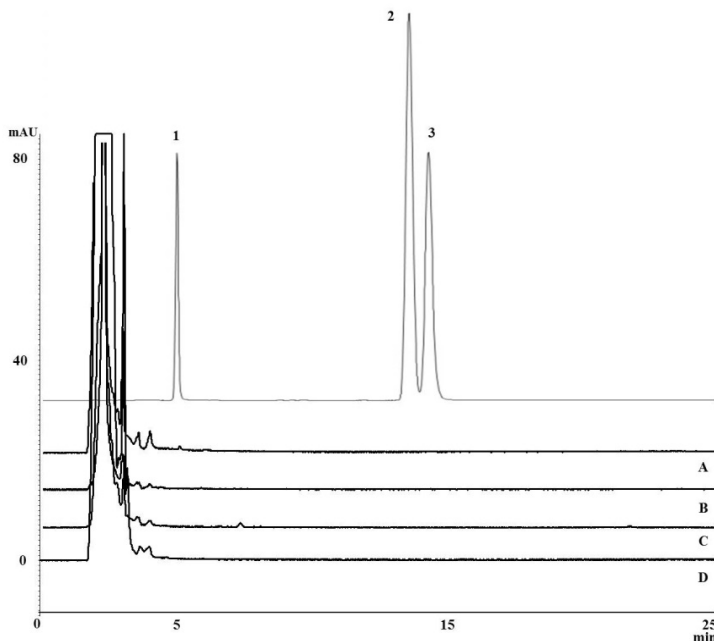
FE: sílica F_{254nm}; FM: clorofórmio:acetona:dietilamina (5:4:1, v/v/v). A: visualização UV 254 nm. B: visualização UV 360 nm.

2.4.3.2 Análise por CLAE

Para as análises por CLAE, foi utilizada uma adaptação de metodologia previamente descrita por Santos e colaboradores (2006). Utilizou-se como fase móvel um sistema isocrático composto de tampão fosfato dibásico de sódio, 50 mmol/L, pH 8,0, MeOH e ACN. A detecção destes compostos foi realizada por UV em 245 nm.

De forma semelhante a análise anterior, o perfil qualitativo por essa técnica não indicou a presença de alcaloides do tipo harmano nos extratos analisados (**Figura 36**).

Figura 36 - Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas de espécies de *Passiflora* para análise de alcaloides do tipo harmano por CLAE.



1: harmol; 2: harmano; 3: harmina. A: *P. alata*; B: *P. quadrangularis*;
C: *P. bogotensis*; D: *P. tripartita* var. *mollissima*.

FE: coluna C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m); FM: fosfato dibásico de sódio (50mM, pH 8,0):MeOH:ACN; fluxo: 1,0 mL/min; detecção: 245 nm.

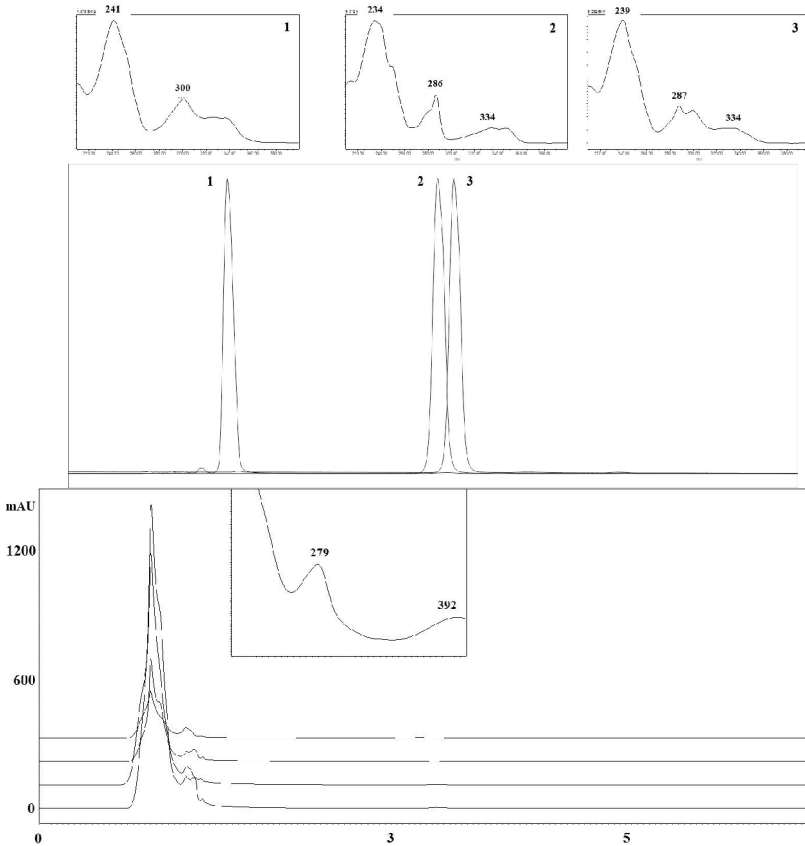
2.4.3.3 Análise por CLUE

A avaliação dos perfis cromatográficos qualitativos de alcaloides também foi realizada por CLUE. Conforme previamente descrito, para as análises de flavonoides, o método empregado por CLAE foi transposto para CLUE pelo software Empower[®].

A **Figura 37** apresenta os cromatogramas obtidos para as espécies analisadas a partir da adequação da metodologia para CLUE,

assim como o perfil dos padrões de alcaloides harmano, harmina e harmol.

Figura 37 - Cromatogramas dos padrões e extratos aquosos de espécies de *Passiflora* para análise de alcaloides do tipo harmano por CLUE.



1: harmol; 2: harmano; 3: harmina; A: *P. alata*; B: *P. quadrangularis*;
C: *P. bogotensis*; D: *P. tripartita* var. *mollissima*.

FE: coluna C18 (100 x 2,9 mm; 1,8 μ m i.d.); FM: fosfato dibásico de sódio (50mM, pH 8,0):MeOH:ACN; fluxo: 0,2 mL/min; detecção: 245 nm.

A transposição do método de análise qualitativa de alcaloides para a técnica de CLUE permitiu diminuir o tempo total de análise em 65%, em relação às análises por CLAE.

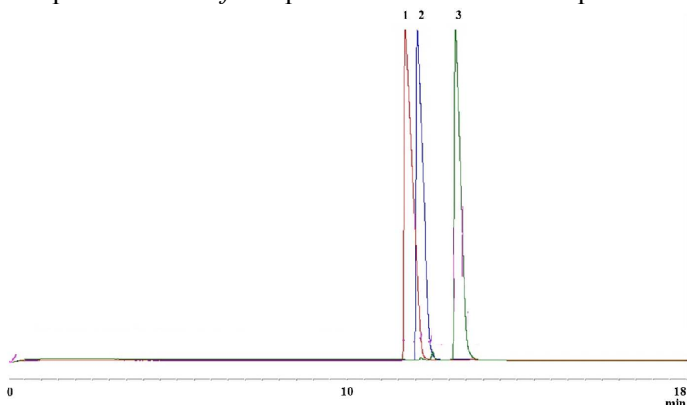
Assim como já observado na técnica anterior, há um acúmulo de picos nos minutos iniciais do cromatograma (Tr. ~1,0min). Esses picos sobrepostos são referentes aos flavonoides presentes na amostra, conforme demonstrado pelo espectro UV na **Figura 37**. Devido ao pH básico (pH 8,0) da fase móvel nas análises de alcaloides, os flavonoides acabam por ter seus máximos de absorção deslocados para valores de maior comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$ 279 e 392 nm). Essa mesma característica também já foi discutida na análise de flavonoides por EC (Seção 2.4.1.4).

2.4.3.4 Análise por EC

O perfil de alcaloides dos extratos aquosos das espécies de *Passiflora* também foi analisado por EC. Para tanto, foi utilizada metodologia previamente descrita por Unger e colaboradores (1997).

Essas condições possibilitaram uma boa separação dos padrões de alcaloides, e de igual maneira que as análises qualitativas anteriores, não foi observada a presença desses compostos nos extratos aquosos (**Figura 38**).

Figura 38 - Eletroferogramas dos extratos aquosos das folhas das espécies de *Passiflora* para análise de alcaloides por EC.



1: harmano; 2: harmina; 3: harmol.

Capilar: Sílica fundida (60,5 comprimento total; 50 μm i.d.); eletrólito: AcNH_4 (100 mmol L^{-1} , 50% ACN, pH 4,0); voltagem: 15 kV; temperatura: 15 $^\circ\text{C}$; detecção: 245 nm.

A análise de alcaloides por EC apresentou algumas características relevantes em comparação às técnicas cromatográficas empregadas anteriormente. A ordem de eluição dos padrões é alterada, uma vez que a mobilidade eletroforética é dependente da relação carga/massa, e não da polaridade, como em CLAE e CLUE. Nesse sentido, o harmano apresentou menor tempo de migração, enquanto que na cromatografia líquida em fase reversa, quem apresentava o menor tempo de eluição era o harmol (**Figuras 36 e 37**).

Outro quesito avaliado foi o pH utilizado na separação eletroforética. Como nessa técnica busca-se a ionização dos compostos, a análise foi realizada em pH ácido (4,0), o que proporcionou a ionização dos alcaloides e sua consequente migração. Em contrapartida, na cromatografia, busca-se evitar essa ionização. Nesse sentido, faz-se uso de fase móveis em pH alcalinos, como a empregada neste trabalho (fosfato dibásico de sódio, pH 8,0).

O tempo de análise empregado nessa metodologia (18 min) ainda é passível de redução, tendo em vista que o alcaloide de menor mobilidade analisado possui tempo de migração de 13,3 minutos. Ainda assim, a EC apresenta, com essa metodologia, tempo de análise superior ao apresentado pela técnica de CLUE (7 min).

Considerando exclusivamente essas duas últimas técnicas, em ambas, não foi possível identificar alcaloides do tipo harmano nos extratos aquosos, quando analisados em caráter qualitativo, o que remete ao questionamento de quão sensível seriam essas metodologias na detecção de uma possível presença de alcaloides. Nesse sentido, buscou-se realizar também análises quantitativas por CLUE e EC, a fim de determinar os limites de quantificação e detecção destas metodologias.

2.4.3.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Uma curva de calibração do alcaloide harmano foi construída em ambos os equipamentos, com o intuito de determinar a linearidade do método, mas principalmente para determinar os limites de quantificação e detecção destes métodos na eventual presença de alcaloides nos extratos aquosos analisados.

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos para as curvas de calibração do alcaloide harmano em EC e CLUE, assim como os valores de sensibilidade.

Tabela 5 - Dados de linearidade e de sensibilidade para o alcaloide harmano

Técnica	Faixa linear (µg/mL)	Equação da reta ^a	Fator de correlação (r ²)	LQ ^b (µg/mL)	LD ^b (µg/mL)
EC	50,0 – 1,0	$y = 2,4144x + 1,0596$	0,9997	0,5	0,25
CLUE	50,0 – 0,065	$y = 123720x - 6479,9$	0,9999	0,0315	0,0187

^a: EC: cinco pontos (n=3); CLUE: nove pontos (n=3)

^b: LQ: limite de quantificação; LD: limite de detecção.

Fonte: autor.

Os dados quantitativos demonstram que, embora ambas as técnicas apresentem excelentes valores de correlação, o método por CLUE é cerca de 15 vezes mais sensível que a EC, considerando que ambos utilizaram mesmo tipo de detecção. Essa característica já era esperada segundo dados da literatura, embora se saiba que ambas as técnicas poderiam apresentar valor de detecção ainda menores se utilizados detectores mais sensíveis, com por exemplo, espectrômetros de massa.

Considerando os limites encontrados, é possível afirmar que os extratos aquosos analisados nesta tese não possuem alcaloides do tipo harmano em teores superiores a 0,0187 µg/mL (=0,0187 ppm). Trabalhos quantitativos anteriores, com base em análises por CLAE, também não detectaram esses compostos para espécies de *Passiflora*, porém com limites de detecção superior (0,1 ppm) (REHWALD; STICHER; MEIER, 1995). Grice e colaboradores (2001) conseguiram detectar alcaloides em amostras comerciais de *P. incarnata* em teores inferiores a 0,018 ppm, entretanto, utilizando CLAE acoplado a detector por fluorescência.

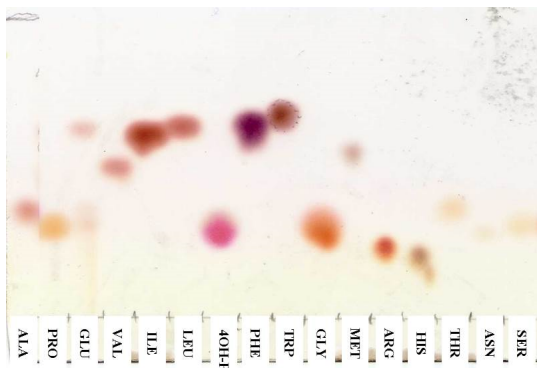
2.4.4 Análise de aminoácidos

A composição de aminoácidos foi avaliada em virtude da descrição na literatura da ocorrência desses constituintes para espécies do gênero, mas em especial pelo relato da presença de ácido γ -aminobutírico (GABA), na concentração de 0,5%, em *P. incarnata* (MEIER, 1995). A presença desse aminoácido poderia, supostamente, influenciar a atividade destes extratos no SNC, mais especificamente

atuando como composto responsável pelas atividades sedativas e ansiolíticas. Cabe mencionar, todavia, que o aminoácido GABA, embora atue como neurotransmissor em receptores gabaérgicos, levando a efeitos sedativos e ansiolíticos ou ainda antidepressivos, dificilmente poderia exercer tal atividade quando presente em uma preparação extrativa e ingerido via oral, uma vez que é pouco provável ultrapasse a barreira hemato-encefálica (PATRICK, 2009).

Para a análise da presença de aminoácidos nos extratos de *Passiflora* em estudo foi empregado a CCD utilizando um conjunto de amostras autênticas de aminoácidos proteicos (**Figura 39**).

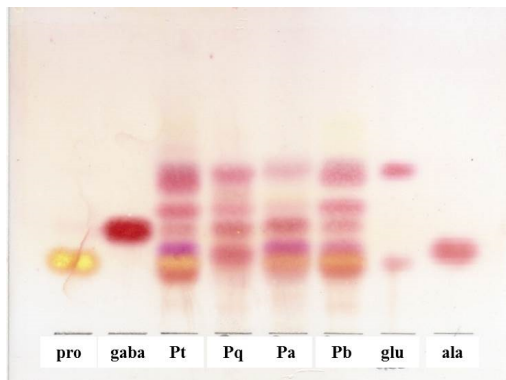
Figura 39 - Cromatografia em camada delgada de padrões de aminoácidos.



ALA: alanina, PRO: prolina, GLU: ác. glutâmico, VAL: valina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, 4OH-P: 4-hidroxileucina, PHE: fenilalanina, TRP: triptofano, GLY: glicina, MET: metionina, ARG: argenina, HIS: histidina, THR: treonina, ASN: asparagina, SER: serina.
 FE: sílica F_{254nm}; FM: butanol:água:ácido acético (12:3:5, v/v/v).
 Detecção: ninidrina/luz visível.

Posteriormente, utilizando as mesmas condições cromatográficas, foram analisados os extratos aquosos brutos das espécies estudadas. A **Figura 40** apresenta o perfil dos extratos aquosos e também os aminoácidos identificados nestas espécies.

Figura 40 - Cromatografia em camada delgada para análise de aminoácidos em extratos aquosos das folhas de espécies de *Passiflora*.



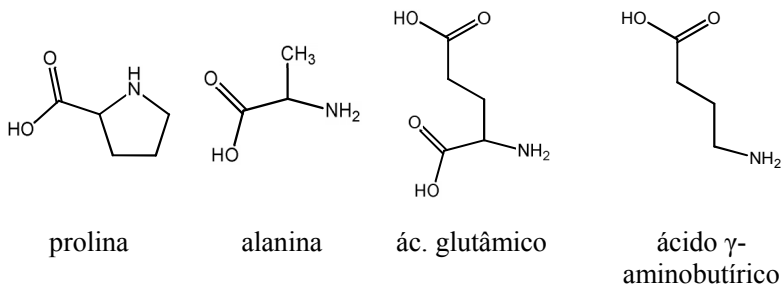
pro: prolina; gaba: ácido γ -aminobutírico; glu: ácido glutâmico; ala: alanina; Pt: *P. tripartita* var. *mollissima*; Pq: *P. quadrangularis*; Pa: *P. alata*; Pb: *P. bogotensis*.

FE: sílica F_{254nm}; FM: butanol:água:ácido acético (12:3:5, v/v/v).

Deteção: ninidrina/luz visível.

Os resultados obtidos nas análises por CCD (**Figura 40**) permitiram detectar a presença de diversos aminoácidos, com perfil semelhante entre as espécies. Contudo, pode ser observado que o extrato aquoso de *P. quadrangularis* apresenta uma mancha de coloração marrom diferenciada no Rf 0,26 em relação aos demais extratos. Esse aminoácido foi identificado como sendo a alanina, aminoácido presente apenas nesta espécie. Foi possível identificar ainda, através da comparação do valor de Rf, coloração e por cocromatografia os aminoácidos prolina (Rf 0,23), ácido glutâmico (Rf 0,53) e ácido γ -aminobutírico (Rf 0,33) em todas as espécies analisadas. (**Figura 40 e 41**).

Figura 41 - Aminoácidos observados nas espécies de *Passiflora* estudadas.



Estudos prévios da literatura já haviam descrito a presença de aminoácidos em *Passiflora*. Ainda que esses metabólitos sejam de ocorrência generalizada em espécies vegetais, a análise destes compostos está descrita apenas a espécie *P. incarnata*. Para essa espécie foram relatados os seguintes aminoácidos com suas respectivas concentrações: prolina (4%), ácido glutâmico (1%), ácido γ -aminobutírico (0,5%), isoleucina (0,5%), valina e ornitina (ambos em traços) (MEIER, 1995).

Nesse sentido, a observação de prolina, ácido glutâmico, ácido γ -aminobutírico por esta técnica corrobora com os dados da literatura para o gênero. Todavia, por CCD, não foi possível observar a presença de isoleucina, valina ou ornitina. Adicionalmente, foi observada a presença de alanina em *P. quadrangularis*, aminoácido ainda não relatado para espécies deste gênero.

2.5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse capítulo, foi possível concluir que:

- Os flavonoides C-glicosídeos estão presentes em todos os extratos analisados, sendo os compostos que mais se destacam em *P. tripartita* var. *mollissima* e *P. bogotensis*;
- De todas as espécies, *P. tripartita* foi a espécie que apresentou maior diversidade de flavonoides glicosilados;
- Foi possível identificar a presença dos seguintes flavonoides nas folhas das espécies analisadas:
 - *P. alata*: oorientina, isovitexina e vitexina-2''-O-ramnosídeo;

- *P. quadrangularis*: vitexina
- *P. bogotensis*: isoorientina e isovitexina
- *P. tripartita* var. *mollissima*: isoorientina, orientina, vitexina, swertisina, 4'-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina
- A presença de saponinas foi observada apenas nos extratos aquosos das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata*, sendo identificada a saponina quadrangulosídeo em ambos os extratos;
- Nos extratos aquosos analisados não foram detectados alcaloides do tipo harmano em teores superiores a 0,0187 ppm em sua composição.
- Todos os extratos apresentaram aminoácidos em sua constituição, sendo identificados a prolina e os ácidos glutâmico e γ -aminobutírico em todos os extratos. Alanina foi observada apenas no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*.

CAPÍTULO 3 – Isolamento de flavonoides glicosilados das folhas de *Passiflora quadrangularis* por HSCCC

3.1 INTRODUÇÃO

Flavonoides são encontrados em diversas plantas medicinais em todo o mundo, e constituem uma das principais classes de metabólitos secundários presentes nas espécies do gênero *Passiflora*, geralmente na forma de flavonoides C-glicosídeos. Conforme já abordado no **Capítulo 1**, diversas são as espécies de *Passiflora* que apresentam estudos químicos descrevendo a identificação e isolamento de flavonoides C-glicosídeos (MARCHART; KRENN; KOPP, 2003; ULUBELEN et al., 1982a,b,c; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Para a espécie *P. quadrangularis*, embora existam alguns estudos químicos sobre sua constituição de saponinas (ORSINI; PELIZZONI; VERTTA, 1985; ORSINI et al., 1987), poucos também são os estudos da composição de flavonoides presentes nesta espécie (SAKALEM et al., 2013; ZUCOLOTTO et al., 2012). Como já apresentado no **Capítulo 2**, o perfil de flavonoides observados no extrato aquoso bruto desta espécie indicou a presença de quatro componentes majoritários (**Figura 25**), cuja identificação não pode ser concluída com base nas análises prévias. Buscou-se, desse modo, o isolamento destes flavonoides para a posterior identificação por técnicas espectroscópicas.

Um grande número de técnicas são utilizadas na separação de maneira preparativa de flavonoides, incluindo cromatografia em coluna, usando diversos adsorventes, como gel de sílica, gel de permeação molecular, resina sintéticas, como Amberlite[®], além de CLAE em modo preparativo. O uso dessas diferentes técnicas varia conforme cada grupo de pesquisa, mas também pode depender da classe de flavonoides investigada (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006).

Uma alternativa às técnicas clássicas de isolamento desses compostos seria o uso da Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade. Esta técnica evita problemas como a adsorção irreversível, permite a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade prévia de purificações, além de possibilitar a obtenção de grandes quantidades de substância isolada (PENG et al., 2005).

Essa última característica é desejável no que corresponde aos procedimentos subsequentes dados as substâncias isoladas, como os processos de identificação ou ainda à investigação biológica, na qual um

dos principais obstáculos está relacionado com a quantidade destes compostos para a realização de experimentos farmacológicos.

Neste capítulo é apresentada inicialmente uma breve revisão sobre a Cromatografia Contracorrente e o seu emprego para o isolamento de flavonoides. Posteriormente, é descrito o processo de isolamento de flavonoides C-glicosídeos a partir das folhas de *P. quadrangularis* por Cromatografia Contracorrente, seguida da elucidação estrutural destas substâncias por meio de análises espectroscópicas.

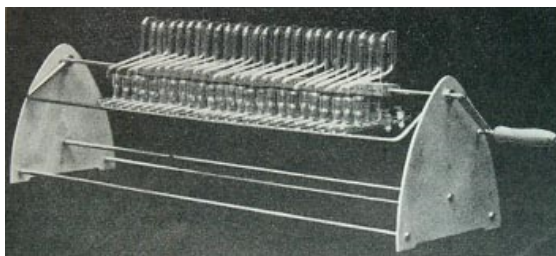
3.1.1 Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade

3.1.1.1 Princípios

A cromatografia contracorrente (CCC) é, essencialmente, uma forma de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no equipamento sem o uso de uma matriz porosa ou adsortiva, enquanto a outra fase imiscível atua como fase móvel. O princípio deste método de separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, e sua distribuição entre cada uma das fases (CONWAY, 1990).

Lyman C. Craig e Otto Post, na década de 50, desenvolveram um equipamento que consistia em uma série de tubos conectados entre si de modo contínuo, submetidos a um processo de rotação manual (**Figura 42**). A técnica, denominada de Distribuição em Contracorrente (CCD, do inglês '*Countercurrent Distribution*') foi implementada para a separação da substância antimalárica atebрина de seus metabólitos no sangue, na urina de cães e também de pacientes (SRIVASTAVA, 2008).

Figura 42 - Equipamento de Craig-Post de Distribuição em Contracorrente (CCD).

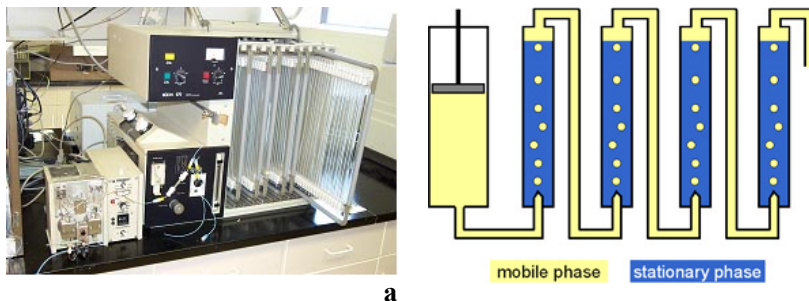


Fonte: Srivastava (2008).

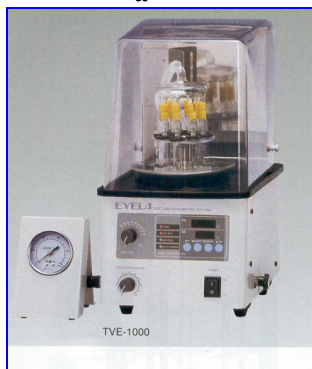
A CCC propriamente dita foi desenvolvida na década de 70, como consequência de uma investigação do Dr. Yoichiro Ito no intuito de melhorar a separação de linfócitos por um processo de sedimentação centrifugal usando uma centrífuga de bobina planetária-helicoidal. Inicialmente foi referida como partição líquido-líquido, e apenas depois, introduziu-se a nomenclatura cromatografia contracorrente (CONWAY, 2011).

Ainda nos anos 70, Yoichiro Ito e colaboradores introduziram a cromatografia contracorrente em gotas (*Droplet Countercurrent Chromatography* - DCCC), que consistia na passagem de gotas de fase móvel através de uma fase estacionária líquida imiscível, no sentido de realizar uma partição contínua do soluto entre as duas fases (**Figura 43a**). Essa técnica é bastante limitada devido ao tempo de análise e a especificidade dos solventes envolvidos, para que se consiga formar gotas de tamanho e mobilidade adequados. Já a cromatografia contracorrente de rotação locular (*Rotation Locular Countercurrent Chromatography* - RLCCC) é similar com a DCCC, no entanto difere quanto a posição dos tubos, os quais são dispostos em torno de um eixo rotacional (**Figura 43b**). Entretanto, a RLCCC usualmente apresenta uma menor resolução quando comparada a DCCC (CONWAY, 1990).

Figura 43 - Equipamentos DCCC (a) e RLCCC (b).



a



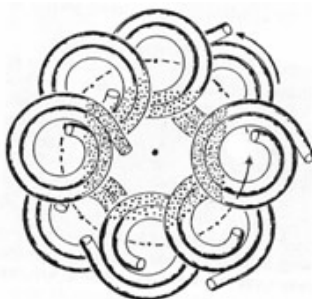
b

Fonte: Srivastava (2008).

As técnicas modernas de CCC aplicam campos de *força* centrífuga para manter a fase estacionária dentro da coluna. Entre essas técnicas, a mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) (PAN, 2007).

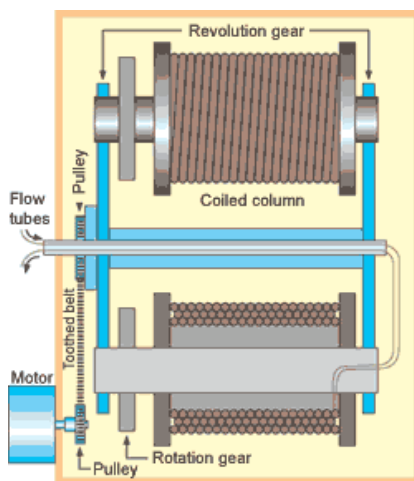
A HSCCC utiliza como suporte para a fase estacionária um tubo de teflon, que realiza dupla rotação, com um movimento planetário ao redor de um eixo central, semelhante aos movimentos de rotação e translação realizados pelos planetas ao redor do Sol. Enquanto a fase estacionária é mantida dentro da coluna devido a *força* centrífuga, a fase móvel é bombeada em alta velocidade por uma bomba de alta pressão (Figuras 44 e 45) (SRIVASTAVA, 2008).

Figura 44 – Ilustração esquemática do movimento de rotação da coluna do HSCCC, e a distribuição das fases em seu interior.



Fonte: Srivastava (2008).

Figura 45 - Ilustração representativa das partes que compõem o HSCCC.



Fonte: Filmore (2001).

O equipamento de HSCCC consiste em reservatórios de solventes, com a fase móvel e fase estacionária em compartimentos separados, uma bomba de alta pressão, válvula de injeção e coluna constituída de um tubo de teflon enrolado em forma de espiral (**Figura 46**). Pode-se optar por acoplar ao sistema um detector e um coletor de frações automático.

Figura 46 - Fotos do equipamento de HSCCC.



Fonte: Autor.

Comparativamente a outras técnicas cromatográficas preparativas, a CCC mostra vantagens em relação a diversos aspectos dos demais métodos tradicionais de separação cromatográficos sólido-líquido. Entre os quais se poderiam destacar:

- Versatilidade, conveniência e velocidade;
- Boa resolução de separação;
- Reprodutibilidade;
- Econômica, tendo em vista o baixo consumo de solventes e o relativo baixo custo do equipamento;
- Recuperação total da amostra, sem que essa apresente degradação por modificações químicas ou perda da atividade biológica, em fracionamentos bioguiados.

3.1.1.2 Seleção do sistema de solventes para HSCCC.

A escolha de um sistema de solventes adequado é a etapa de maior importância no desenvolvimento do método para análise por HSCCC e representa parte crucial para o sucesso da separação (COSTA; LEITÃO, 2010; SRIVASTAVA, 2008).

Uma forma utilizada para a escolha do sistema de solventes consiste em preparar a mistura de solventes em um funil de separação e agitar vigorosamente, e mede-se o tempo para se atingir o equilíbrio e ocorrer a separação total das fases. A seguir uma pequena quantidade de amostra (cerca de 2 mg já é suficiente) é adicionada em um tubo de

ensaio ao qual se adiciona 4 mL de cada fase ao tubo. Após, o tubo de ensaio deve ser novamente agitado de forma vigorosa, para que ocorra a distribuição do(s) analito(s) entre as fases. Estas fases são posteriormente separadas, seus solventes evaporados sob pressão reduzida e analisadas por CCD ou CLAE (COSTA; LEITÃO, 2010; LEITÃO et al., 2005; SRIVASTAVA, 2008).

Diversos parâmetros podem ser avaliados quando se busca definir o melhor sistema de solventes para cada amostra. Entretanto, apenas dois serão brevemente discutidos neste trabalho: o tempo de equilíbrio entre as fases (*settling time*) e o coeficiente de partição (K).

3.1.1.2.1 *Tempo de equilíbrio*

No âmbito da HSCCC, o tempo necessário para que as fases de um sistema bifásico se separem completamente, atingindo o equilíbrio após sua interação, é chamado de *settling time*. O tempo necessário para essa separação deve ser o menor possível, preferencialmente inferior a 30 segundos. Esse parâmetro indica que, durante as análises, o equilíbrio hidrodinâmico será rapidamente atingido, garantindo uma retenção satisfatória da fase estacionária (COSTA; LEITÃO, 2010; SRIVASTAVA, 2008).

3.1.1.2.2 *Coeficiente de partição*

O coeficiente de partição (K) é uma constante usualmente expressa através da divisão da concentração do soluto na fase estacionária pela concentração do soluto na fase móvel. Para uma boa separação, o composto alvo deve apresentar um valor na faixa de $0,5 \leq K \leq 1,0$. Baixos valores de K , indicam que o composto será eluído muito próximo ao fronte da fase móvel e, portanto, com baixa resolução. Altos valores de K indicam uma retenção excessiva do composto na fase estacionária, levando a um alto tempo de eluição e pico alargado e diluído (COSTA; LEITÃO, 2010; SRIVASTAVA, 2008).

Na escolha do sistema de solventes, pode-se utilizar como fase estacionária ou fase móvel tanto a fase inferior como a fase superior. O sistema cromatográfico é dito 'fase normal' quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e consequentemente 'fase reversa', quando a fase estacionária é mais apolar que a fase móvel. (CONWAY, 1990)

Na seleção do sistema de solventes, alguns requisitos devem ser considerados:

- O analito deve ser estável nos solventes utilizados;

- O sistema de solventes deve formar obrigatoriamente duas fases imiscíveis, sendo desejável que as fases possuam volumes semelhantes;
- O coeficiente de partição (*K*) do analito no sistema de solventes deve estar entre 0,5 e 1,0.
- A separação completa das fases do sistema de solventes deve ocorrer em até 30 segundos.

3.1.1.3 HSCCC no fracionamento e isolamento de flavonoides *C*-glicosídeos.

Sutherland e Fisher (2009) revisaram cerca de 200 trabalhos sobre a separação e purificação de metabólitos de plantas usando HSCCC: de um total de 363 compostos isolados a partir de 108 espécies, cerca de 25% desses eram flavonoides, agliconas ou glicosídeos.

Recentemente, Costa e Leitão (2010) revisaram os sistemas de solventes desenvolvidos para o isolamento de flavonoides, apresentando separadamente os sistemas de solventes para flavonoides glicosilados, sejam eles do tipo *O*-glicosídeos ou tipo *C*-glicosídeos. Os autores destacaram três ‘famílias’ de solventes como as mais utilizadas no isolamento desses compostos por CCC: hexano-acetato de etil-metanol-água; clorofórmio-metanol-água; acetato de etila-butanol-água.

Na **Tabela 4** são apresentadas as espécies, compostos e condições cromatográficas utilizadas para o fracionamento e/ou isolamento de flavonoides *C*-glicosídeos por CCC, descritos em trabalhos disponíveis na literatura, a partir de uma revisão nas bases de dados SCOPUS e ScienceDirect.

Tabela 6 - Condições cromatográficas para o fracionamento e/ou isolamento de flavonoides *C*-glicosídeos por CCC.

Espécie	Compostos	Solventes	Referência
<i>Achillea nobilis</i>	Isoschaftosídeo	CHCl ₃ :MeOH:iPrOH:H ₂ O (9:12:1:8), FM: superior	Krenn et al., 2003
<i>Cecropia lyratiloba</i>	6- <i>C</i> -galactosil-6''- <i>O</i> -β-galactopiranosil-apigenina, isoorientina, orientina, isovitexina	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (46:25:29), FM: inferior AcOEt:BuOH:MeOH:H ₂ O (35:10:11:44), FM: inferior	Oliveira et al., 2003

<i>Patrinia villosa</i>	Isoorientina, isovitexina	AcOEt:BuOH:H ₂ O (2:1:3), FM: inferior	Peng et al., 2005
<i>Trollius ledebouri</i>	Orientina, vitexina, 3- <i>O</i> -neohesperosídeo- <i>o</i> -quercetina	AcOEt:BuOH:H ₂ O (2:1:3), FM: inferior	Zhou et al., 2005

Até o desenvolvimento desta tese, não haviam sido descritos na literatura trabalhos sobre o isolamento de flavonoides em espécies de *Passiflora* utilizando a técnica de HSCCC. O único trabalho sobre o uso da técnica de CCC para o fracionamento de extratos de espécies de *Passiflora* diz respeito ao isolamento de triterpenos glicosilados das folhas *P. quadrangularis* por DCCC. Nesse estudo, subfrações do extrato metanólico foram submetidas a DCCC, possibilitado o isolamento das saponinas quadrangulosídeo, 3 β -*O*-gentiobiosídeo-9,19-ciclolanostano-22,25-epóxi-3 β -21,22(R)-trioi e o 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico (ORSINI; VERTTA, 1985) (**Figura 17**).

3.2 OBJETIVOS

- Isolar por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) flavonoides a partir do extrato aquoso bruto das folhas de *P. quadrangularis*.
- Identificar os flavonoides isolados por técnicas como UV, EM e RMN.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

Folhas de *P. quadrangularis* foram coletadas em Gigante, Huila/Colombia, conforme descrito na **Tabela 2 (Capítulo 2)**.

3.3.2 Preparação dos extratos

As folhas de *P. quadrangularis* foram secas em estufa de ar circulante (35-40 °C) e moídas em moinho de facas. Após a moagem, 500 g de material vegetal foram extraídos por infusão aquosa, na proporção planta:solvente de 1:10 (m/v) a 95 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados.

3.3.3 Equipamentos

Evaporador rotatório Büchi® equipado com bomba, controlador de pressão e recirculador de água termostatizado. A concentração de extratos e frações foi realizada em temperatura não superior a 45 °C.

As análises por CLAE foram realizadas em um equipamento PerkinElmer® Series 200, equipado com um detector UV com arranjo de diodos (UV-DAD), bomba quaternária, ‘degasser’ on-line, e injetor automático. Os dados foram processados no software TotalChrom® Workstation.

As análises por CLAE-EM foram realizadas em um equipamento Shimadzu® LC-10A, acoplado com um detector de massas, modelo LCMS-2010EV, do Departamento de Química da Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia). Os espectros foram adquiridos em modo negativo, através da ionização por eletrospray (ESI)-MS quadrupolo simples. A voltagem do detector foi ajustada para 1,5 kV; a voltagem do CDL em 150 V; a temperatura do CDL em 250 °C; a voltagem do QarrayRF a 150 V e o fluxo de nitrogênio como gás nebulizador foi ajustado a 1 L/min.

As análises por Cromatografia Contracorrente foram realizadas em um Cromatógrafo Contracorrente P.C.Inc.®, equipado com uma coluna preparativa multicamada (400 mL) equilibrada com contrapeso, bomba de alta pressão Merck-Hitachi® modelo L-6000, e um coletor de frações automático Eldex®.

As análises de RMN foram realizadas no Departamento de Química da Pontifícia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia), em um equipamento Bruker® (300 MHz / 75 MHz) e as amostras solubilizadas em DMSO-*d*₆.

3.3.4 Procedimentos gerais

Os solventes empregados neste trabalho, tanto de qualidade analítica (P.A.) quanto grau CLAE são de origem Merck® e Tedia®. Água para fins de análise por CLAE foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, USA). Todas as soluções de amostras para análise por CLAE foram filtradas através de membrana 0,22 µm previamente ao uso.

3.3.5 Hidrólise ácida

Cerca de 200 mg de extrato aquoso bruto seco foram dissolvidos em 100 mL de ácido clorídrico 1 mol/L e aquecidos a 80 °C, sob agitação, durante 1 hora. O hidrolisado foi neutralizado com NaOH 1 mol/L e seu volume ajustado para 100 mL com água. Uma pequena

alíquota foi separada e o restante particionado com acetato de etila (3x 20 mL). A fase aquosa dessa partição foi posteriormente particionada com *n*-butanol (3x 20 mL). O extrato hidrolisado, as fases orgânicas (AcOEt e *n*-BuOH) e a fase aquosa foram levadas a secura e analisadas por CCD e CLAE.

3.3.6 Análises cromatográficas

As cromatografias analíticas em camada delgada foram realizadas em placas de gel de sílica F254nm Merck, em suporte de alumínio. Os extratos e frações contendo flavonoides foram analisados por CCD utilizando como sistema eluente acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v). A detecção dos flavonoides nos cromatogramas foi realizada mediante observação sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) após revelação com o agente cromogênico Reagente Natural (difenilboriloxietilamina 1% em metanol).

As purificações por coluna cromatográfica foram realizadas com gel de permeação molecular Sephadex[®] LH-20 GE.

As condições cromatográficas para as análises por CLAE são as mesmas já descritas no **Capítulo 2**, com uma pequena alteração do gradiente da fase móvel, com o intuito de diminuir o tempo de análise. Para tanto, o gradiente de fase móvel de acetonitrila (solvente A) e ácido fórmico 0,5% (B), com 15-35% A (0-20 min). O fluxo foi mantido constante em 1,2 mL/min e a detecção realizada a 340 nm com a aquisição de espectros UV na faixa de 190 a 450 nm. As análises foram realizadas a temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.3.7 Análises por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade

O isolamento de flavonoides a partir do extrato aquoso bruto das folhas de *P. quadrangularis* foi realizado com o uso da HSCCC, seguida de uma purificação dos compostos por cromatografia de exclusão molecular.

Baseado nos trabalhos revistos por Costa e Leitão (2010), foi escolhido inicialmente o sistema AcOEt:BuOH:H₂O, já utilizado para o isolamento de flavonoides em outras espécies (PENG et al., 2005; ZHOU et al., 2005) e empregado em modo gradiente, no isolamento de fenilpropanóides e iridoides (LEITÃO et al., 2005).

A partir deste sistema, foram realizadas variações nas proporções de butanol, visando a separação dos compostos de interesse por CCC em modo gradiente, tendo como ponto de partida as proporções descritas por Leitão e colaboradores (2005). A seleção do

sistema de solvente foi realizada por uma análise preliminar em escala piloto em tubos de ensaio.

Brevemente, foram preparados em tubos de ensaio os sistemas de solventes nas proporções descritas na **Tabela 7**. Para isso, os tubos foram agitados vigorosamente e o tempo de separação total das fases medido. A seguir uma pequena alíquota do extrato aquoso bruto das folhas de *P. quadrangularis* foi adicionada a cada tubo de ensaio, os quais foram novamente agitados de maneira vigorosa. Após a separação total entre as fases, essas foram separadas em funil de separação e os solventes eliminados em evaporador rotatório. As fases foram retomadas em metanol e analisadas por CCD, com o intuito de observar a distribuição dos compostos de interesse entre as fases.

Tabela 7 - Sistemas de solventes testados para a separação de flavonoides a partir do extrato aquosos das folhas de *P. quadrangularis* por HSCCC.

Sistemas	AcOEt	BuOH	H ₂ O
A	1	0,1	1
	1	0,2	1
B	1	0,5	1
C	1	0,7	1
	1	1,0	1
D	1	1,2	1
	1	1,5	1

A partir dessas análises, foi selecionado inicialmente um sistema em gradiente composto de quatro etapas usando o sistema de solventes AcOEt:BuOH:H₂O (1:X:1), onde X = 0,1 (sist. A), 0,5 (sist. B), 0,7 (sist. C) e 1,2 (sist. D). A fase aquosa inferior do sistema A foi usada como fase estacionária, enquanto que as fases orgânicas superiores dos sistemas A – D foram usadas como fases móveis, no sentido de eluição cauda-cabeça, com fluxo de fase móvel de 3 mL/min e uma rotação de 800 rpm. A coluna (400 mL) foi previamente equilibrada com a fase estacionária e móvel do sistema A, apresentando uma retenção de 62,5% de fase estacionária (250 mL). O extrato (1 000 mg) foi dissolvido em 6 mL de ambas as fases do sistema A e essa solução foi injetada depois de atingido o equilíbrio hidrodinâmico.

Foram coletadas frações de 9 mL, em um total de 90 frações, com a seguinte distribuição dos sistemas: sistema A, tubos 1-12; sistema B, tubos 13-39; sistema C, tubos 40-65 e sistema D, tubos 66-90. As

frações 33-41 (73,4 mg) apresentaram predominância de um único flavonoide, porém com impurezas, as quais foram eliminadas após a realização de uma coluna com Sephadex[®] LH-20, usando metanol como fase móvel. As frações 10-14 provenientes da coluna de Sephadex[®] apresentaram um flavonoide isolado (30,7 mg), codificado como PqF1.

Com base nos resultados obtidos com o primeiro gradiente, as proporções do sistema de solventes foram ajustadas, a fim de melhorar a separação dos flavonoides com base em sua polaridade e ordem de eluição, buscando o isolamento dos demais componentes.

O novo gradiente do sistema de solventes foi ajustado conforme a **Tabela 8**:

Tabela 8 - Gradiente do sistema de solventes usados para a separação de flavonoides a partir do extrato aquosos das folhas de *P. quadrangularis* por HSCCC (em v/v/v).

Sistemas	AcOEt	BuOH	H ₂ O
A	1	0,2	1
B	1	0,4	1
C	1	0,6	1
D	1	0,8	1

Da mesma maneira que na análise anterior, a fase aquosa inferior do sistema A foi usada como fase estacionária, enquanto que as fases orgânicas superiores dos sistemas A – D foram usadas como fases móveis, no sentido de eluição cauda-cabeça, com fluxo de fase móvel de 3 mL/min e uma rotação de 800 rpm. A coluna (400 mL) foi previamente equilibrada com a fase estacionária e móvel do sistema A.

De igual modo que separação anterior, a retenção da fase estacionária foi de 62,5% (250 mL). Para realização do processo, 1 000 mg do extrato foram dissolvidos em 6 mL de ambas as fases do sistema A e a solução contendo o extrato solubilizado injetada após o sistema atingir o equilíbrio hidrodinâmico. Foram coletadas 143 frações de 6 mL cada, com as distribuições do sistema de gradiente em relação as frações a seguinte: sist. A, tubos 1-29; sist. B, tubos 30-63; sist. C, tubos 64-102; sist. D, tubos 103-143.

O gradiente empregado nesta separação permitiu separar os flavonoides majoritários diretamente do extrato aquoso bruto em quatro frações: fr. 30-40 (93,2 mg), fr. 45-50 (15 mg), fr. 53-70 (81 mg), fr. 71-74 (22,8 mg). Após, essas frações foram, separadamente, purificadas em colunas com Sephadex[®] LH-20, fornecendo respectivamente, os

flavonoides isolados codificados como PqF1 (31,0 mg), PqF2 (8,4 mg), PqF3 (16,8 mg), PqF4 (6,8 mg).

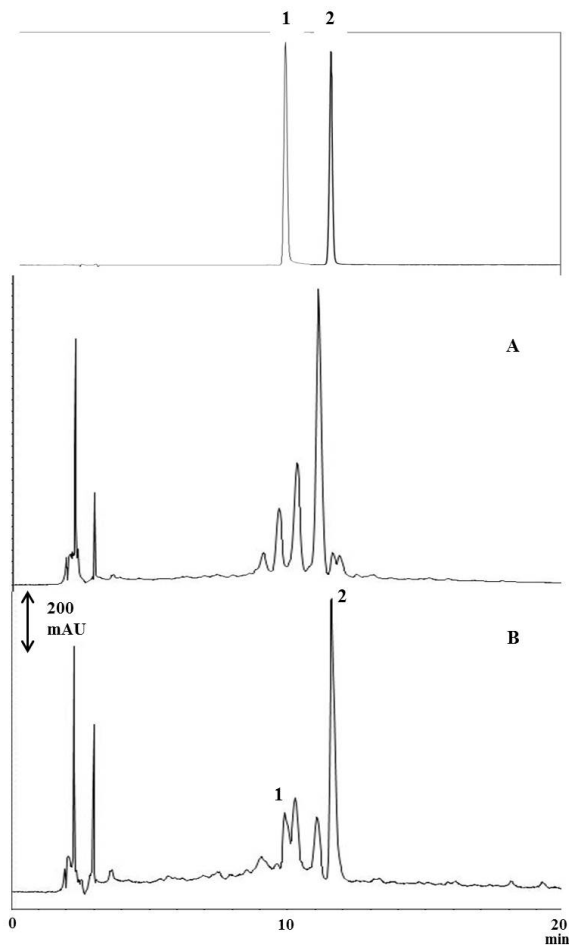
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme já apresentado no **Capítulo 2**, a análise da constituição de flavonoides nas folhas de *P. quadrangularis* indicou a presença de quatro compostos majoritários, os quais não puderam ser identificados quando comparados com padrões de flavonoides C-glicosídeos disponíveis em nosso laboratório. Por outro lado, foi possível a identificação de um composto minoritário como sendo vitexina (**Figura 25**).

3.4.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida realizada com o extrato aquoso bruto de *P. quadrangularis*, preliminarmente a análise das substâncias isoladas, forneceu informações sobre as substâncias presentes no extrato. A análise por CCD do extrato hidrolisado revelou grande redução na intensidade das manchas observadas no extrato aquoso bruto, e formação predominante de duas manchas, referentes à vitexina e orientina. Ainda, foi observada a presença de glicose livre no extrato hidrolisado, demonstrando que uma das substâncias também possui açúcar unido através de ligação osídica. As análises por CLAE confirmaram essas alterações, observadas na intensidade dos picos referentes aos flavonoides (**Figura 47**).

Figura 47 - Cromatograma do extrato aquoso bruto (A) e do extrato hidrolisado (B) das folhas de *P. quadrangularis* por CLAE.



1: orientina; 2: vitexina.

FE: coluna C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m); FM: gradiente ACN:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 1,2 mL/min; detecção: 340 nm.

A análise das frações orgânicas buscou identificar a formação de agliconas a partir do processo de hidrólise, em especial na fração AcOEt, mais apolar. Entretanto, não foi detectada a presença de

agliconas, especialmente apigenina e luteolina, usadas como referência (dados não apresentados).

Esses resultados revelam a natureza das substâncias presentes no extrato como sendo flavonoides *C*-glicosídeos, mais especificamente apontam para flavonoides *O*-glicosil-*C*-glicosilados, cuja hidrólise proporcionou a liberação da segunda unidade de açúcar, glicose, e o aumento na concentração do *C*-glicosídeo. Poderia-se esperar ainda a formação dos isômeros vitexina/isovitexina e orientina/isoorientina, originados através da isomerização de Wessely-Moser (**Figura 6**). Entretanto, a não visualização dos respectivos isômeros pode ter ocorrido devido as condições de hidrólise empregadas. A ocorrência desse tipo de rearranjo é referida, por exemplo, com o uso de ácido clorídrico 2 M e submetido a refluxo por várias horas. As condições empregadas nesse trabalho justificariam os dados observados, onde ocorreu o rompimento da ligação osídica com liberação de unidades de açúcar, embora não tenha ocorrido abertura do anel pirano, que levaria a formação de isômeros.

3.4.2 Isolamento de flavonoides glicosilados de *P. quadrangularis*

O sistema de solventes selecionado AcOEt:BuOH:H₂O é composto de dois solventes orgânicos miscíveis e um terceiro solvente aquoso imiscível nos outros dois. Considera-se dessa forma que nesta família de solventes o butanol possui um papel de modificador orgânico, pois ele se mistura preferencialmente na fase orgânica (AcOEt) ao invés da fase aquosa (LEITÃO et al., 2005; COSTA; LEITÃO, 2010).

O sistema AcOEt:BuOH:H₂O apresenta certas características adequadas para seu emprego em modo gradiente em fase normal, uma vez que o aumento da proporção de butanol no sistema causa uma grande variação na fase orgânica, mas pouco afeta a fase aquosa. Isso permite a separação de compostos com características de polaridade similares ao se realizar ajustes finos na proporção de butanol ao longo do gradiente (LEITÃO et al., 2005).

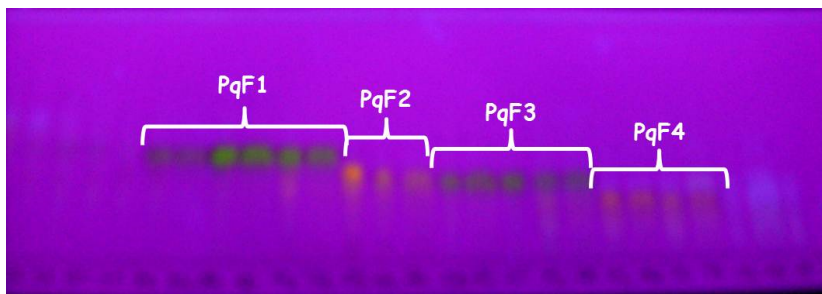
Sendo assim, em um primeiro momento, foi realizada a separação do extrato aquoso bruto por HSCCC com o sistema acetato de etila:butanol:água (1:X:1, onde X = 0,1, 0,5, 0,7 e 1,2), determinado previamente por análises por CCD, conforme descrito previamente (Seção 3.3.7).

Embora tenha sido eficaz para o isolamento do flavonoide majoritário, o método empregado inicialmente não se mostrou efetiva para a purificação dos demais flavonoides presentes no extrato. Desse modo, buscou-se uma melhora do gradiente de fase móvel utilizado, de

modo a proporcionar uma separação mais efetiva dos demais flavonoides de interesse.

O gradiente foi então alterado para acetato de etila:butanol:água (1:X:1, onde X = 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8). Com essas alterações foi possível separar os flavonoides majoritários diretamente do extrato aquoso bruto em quatro frações. Posteriormente essas frações foram purificadas em colunas com Sephadex[®] LH-20, utilizando MeOH como fase móvel. A **Figura 48** apresenta a análise por CCD das frações obtidas por HSCCC, com os flavonoides isolados em destaque.

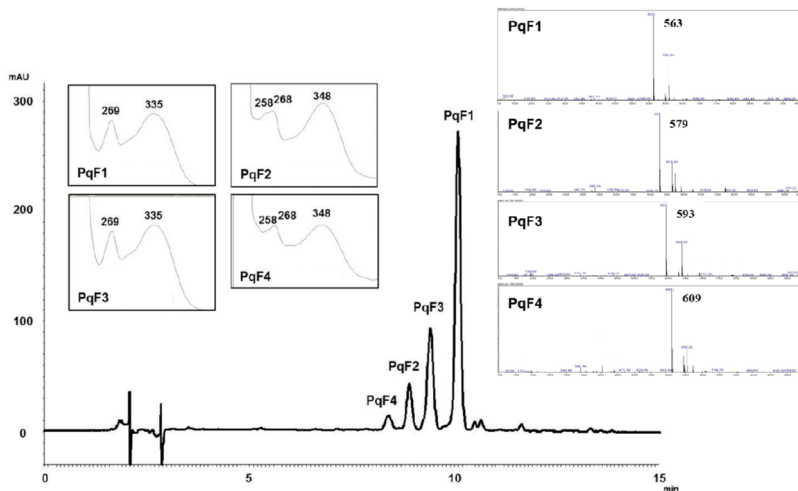
Figura 48 - Cromatografia em camada delgada dos flavonoides isolados das folhas de *P. quadrangularis* obtidos por HSCCC.



FE: sílica F_{254nm}; FM: acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v); Detecção: Reagente Natural/ UV 360 nm.

Os quatro flavonoides isolados foram ainda analisados por CLAE-DAD e por CLAE-EM. A **Figura 49** apresenta o cromatograma do extrato aquoso bruto de *P. quadrangularis*, com os espectros UV e massa observada no pico molecular dos picos respectivos aos compostos isolados.

Figura 49 - Cromatograma do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* por CLAE, com destaque para os flavonoides isolados.



FE: coluna C18 (250 x 4.6 mm i.d.; 5 μ m); FM: gradiente ACN:ácido fórmico 0,5%; fluxo: 1,2 mL/min; detecção: 340 nm.

Massas estão apresentadas em modo negativo [M-H]⁻. Demais condições cromatográficas, ver Item 3.3.5.

3.4.2.1 Análise do flavonoide PqF1

Esse flavonoide foi isolado a partir de duas separações distintas por HSCCC, ambas sendo purificadas por coluna de Sephadex[®]. Em cada separação, foi obtida exatamente a mesma quantidade de 34,5 mg. A substância pura se apresentou como pó amarelo amorfo.

Na análise por CCD, o flavonoide PqF1 apresentou um R_f aproximado de 0,50, no sistema descrito na **Figura 48**, o que sugere a presença de açúcar na molécula, devido a sua polaridade. Quando revelado com Reagente Natural e visualizado sob luz UV 360 nm a mancha apresentou coloração verde, indicativo de núcleo flavona do tipo apigenina.

O espectro UV apresentado pelo flavonoide PqF1, observado na **Figura 49**, também corrobora quanto a presença de um núcleo 4'-hidroxiflavona, tipo apigenina (UV_{máx}: 269 e 335nm) (MARKHAM, 1982). Na análise por CLAE-EM, o composto apresentou o pico de maior massa em *m/z* 563 [M-H]⁻.

Com parte da massa obtida de substância pura foram realizados diferentes espectros de ressonância magnética nuclear como ¹H RMN,

^{13}C RMN, HSQC e COSY e TOCSY, sendo possível atribuir os deslocamentos químicos para cada carbono e hidrogênio. A interpretação dos dados de RMN será apresentada neste capítulo de maneira conjunta entre os espectros obtidos, apontando os sinais diagnósticos e mais característicos que levaram a identificação dos flavonoides.

Os dados obtidos por ^1H RMN e ^{13}C RMN, analisados concomitantemente com HSQC, permitiram confirmar a aglicona como apigenina, especificamente pelos quatro hidrogênios característicos de um anel aromático 1,4-disubstituído (anel B) (δ_{C} 129,0 \leftrightarrow δ_{H} 8.03, 2H, *d*, $J=8.7$ Hz e δ_{C} 116,0 \leftrightarrow δ_{H} 6.90, 2H, *d*, $J=8.7$ Hz). O duplete referente aos hidrogênios H-3' e H-5' são observados em um campo mais blindado que o duplete dos hidrogênios H-2' e H-6', devido ao efeito mesomérico da hidroxila livre em C-4' e da influência de desblindagem do anel C sobre H-2' e H-6' (efeito mesomérico da carbonila em C-4). A presença de um simpleto característico de hidrogênio e do carbono olefínico do anel C de flavonas foram observados (δ_{H} 6.80 \leftrightarrow δ_{C} 102,5), restando apenas um singleto em região desblindada, referente ao anel A, indicativo de um anel aromático pentasubstituído (δ_{H} 6.24 \leftrightarrow δ_{C} 98,2).

A presença do sinal em δ_{H} 6.24 indica o hidrogênio na posição C-6 e a substituição na posição C-8. Essa indicação pode ser confirmada ao comparar valores de deslocamento químicos descritos na literatura para os hidrogênios nestas posições com o valor observado para PqF1 (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de deslocamento químico dos hidrogênios observados para PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz) e para orientina e isorientina ligados em C-6 e C-8 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

PqF1	Orientina*	Isoorientina*
	H-6	H-8
δ 6.24	δ 6.22	δ 6.44

Fonte: *Costa e colaboradores (2011).

A observação de sinais de dois hidrogênios de carbonos anoméricos (δ_{H} 4,79, *d*, $J=10,0$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 71,6 e δ_{H} 3,88, *d*, $J=7,1$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 105,9), assim como dois sinais de metilenos (δ_{H} 3,75 *br d*; 3,58 \leftrightarrow δ_{C} 61,0 e δ_{H} 2,93; 2,36 *t* \leftrightarrow δ_{C} 65,6) é coerente com a massa observada de 564 para PqF1, apontando para a presença de dois resíduos de açúcar na molécula do flavonoide, neste caso, condizentes com uma hexose e pentose junto ao núcleo apigenina. Os valores de deslocamento químico

observados para os carbonos anoméricos permitem ainda inferir que se tratam de açúcares de diferentes naturezas (*C*- e *O*-glicosídeos). (Figuras 50, 51 e 52).

Figura 50 - Espectro ampliado de ^1H RMN do flavonoide PqF1 ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz).

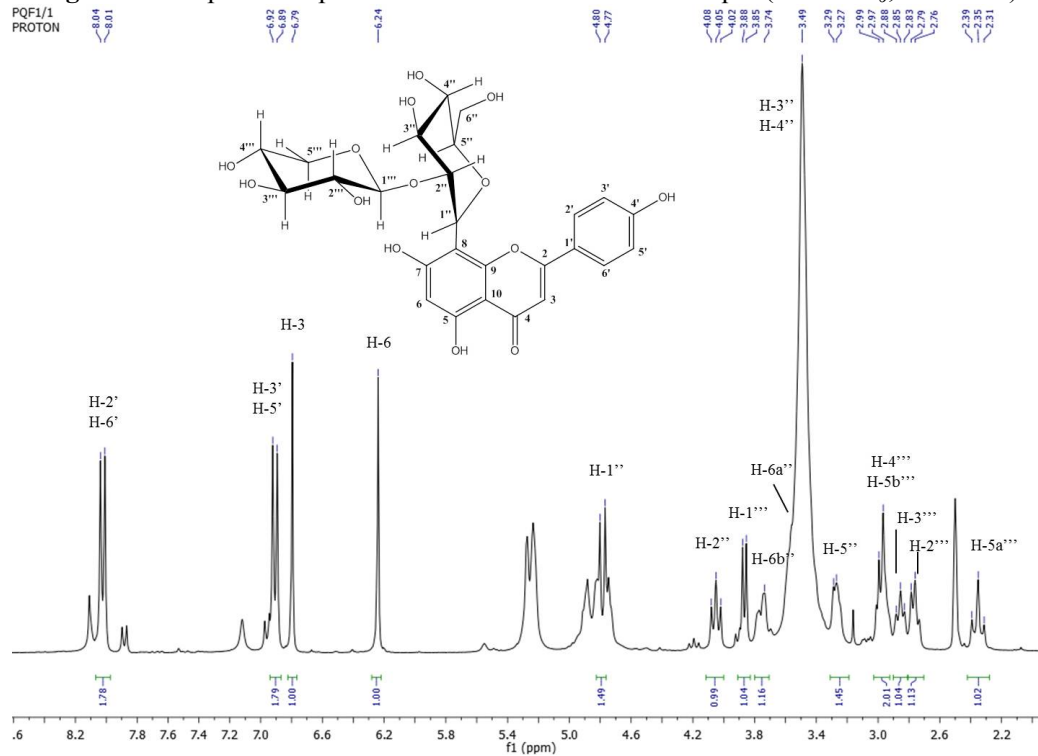


Figura 51 - Espectro ampliado de ^{13}C RMN do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 75 MHz).

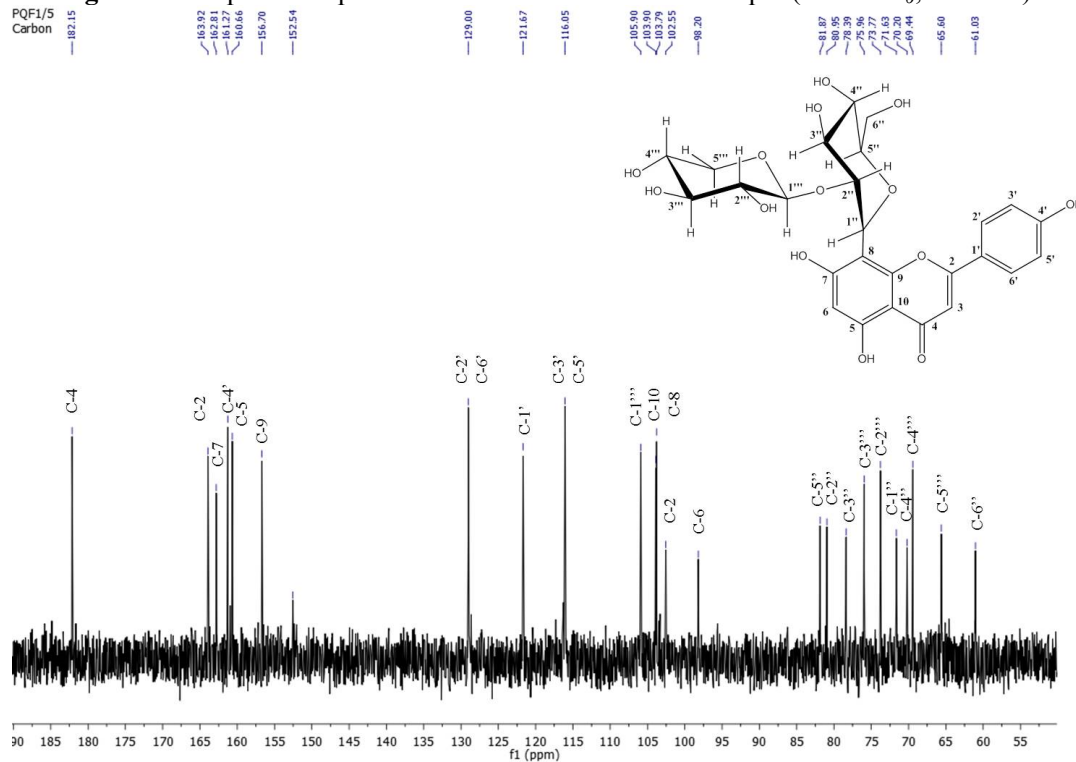
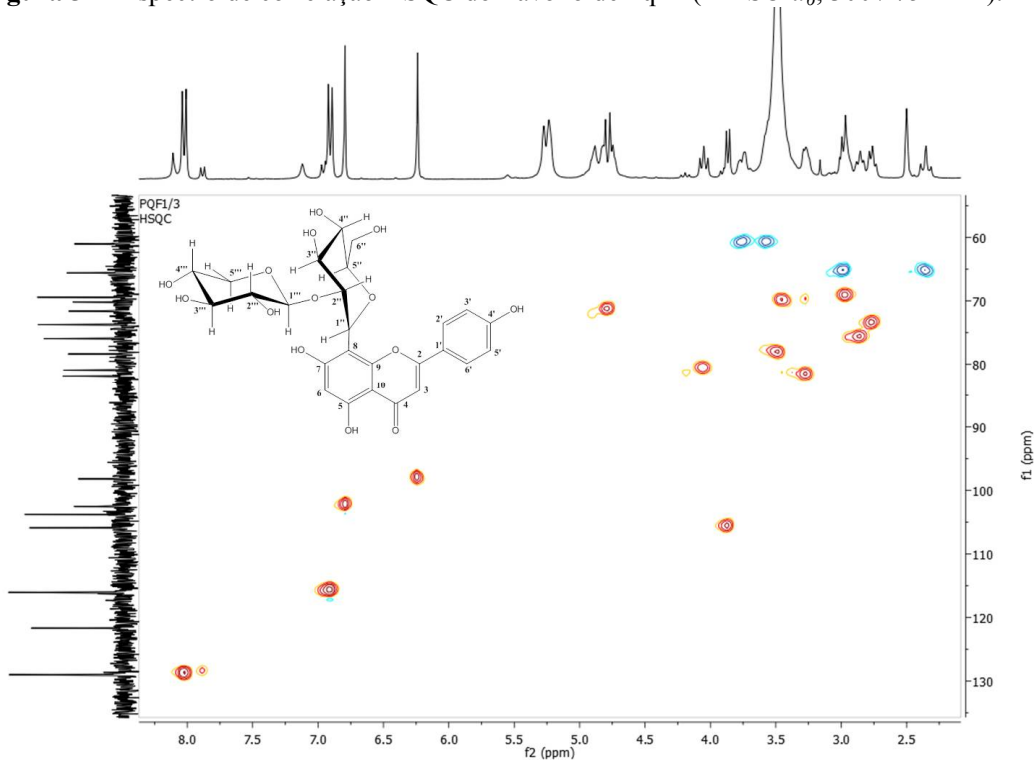


Figura 52 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 / 75 MHz).



Pela observação do espectro de correlação COSY (**Figuras 55 e 56**) e HSQC (**Figura 52**), foi possível caracterizar, a partir dos hidrogênios anoméricos, a sequência dos hidrogênios e carbonos referentes às unidades de açúcar (**Figuras 53**). Os espectros de TOCSY confirmaram quais hidrogênios pertenciam ao mesmo sistema acoplado de spin (**Figuras 54 e 57**).

O açúcar ligado diretamente ao núcleo flavônico foi identificado como glicose, em vista dos valores de deslocamento químico característico de ^1H e ^{13}C , o que já era esperado em vista da formação de vitexina no processo de hidrólise ácida. Para a identificação do segundo açúcar foram comparados os valores de deslocamento químico de ^{13}C para pentoses *O*-*C*-glicosídeos (AGRAWAL; BANSAL, 1989; COMPAGNONE et al., 2008).

Figura 53 - Sequencia de hidrogênios da glicose determinados pelas correlações vicinais observadas no espectro COSY.

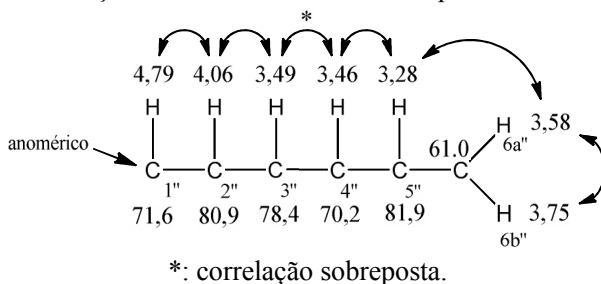


Figura 54 - Sequencia de hidrogênios da xilose determinados pelas correlações vicinais observadas no espectro COSY.

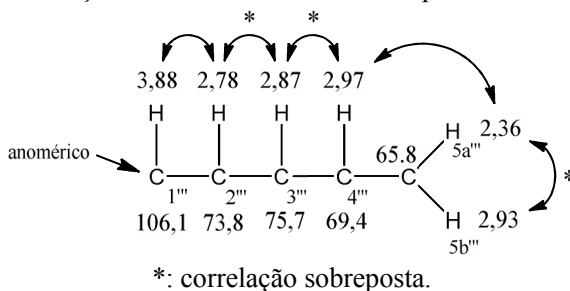


Figura 55 - Espectro de correlação COSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

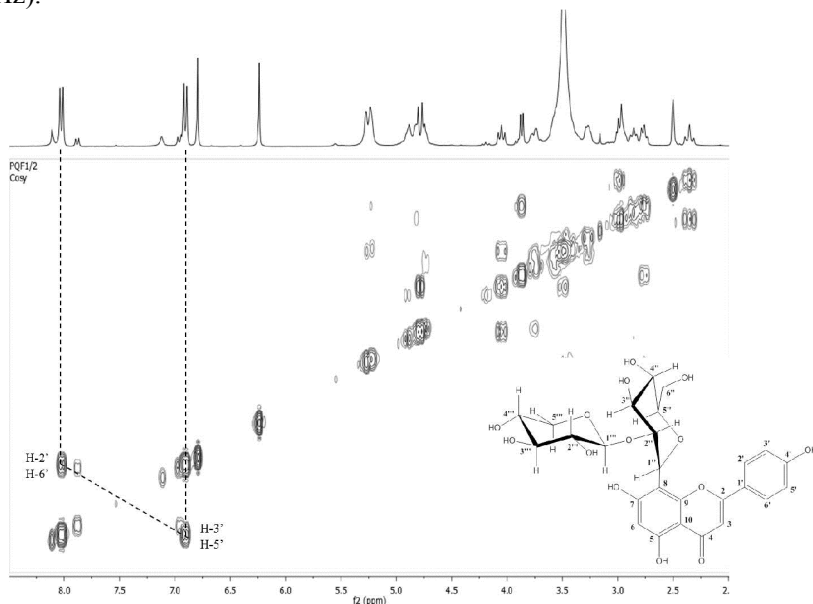


Figura 56 - Ampliação do espectro de correlação COSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

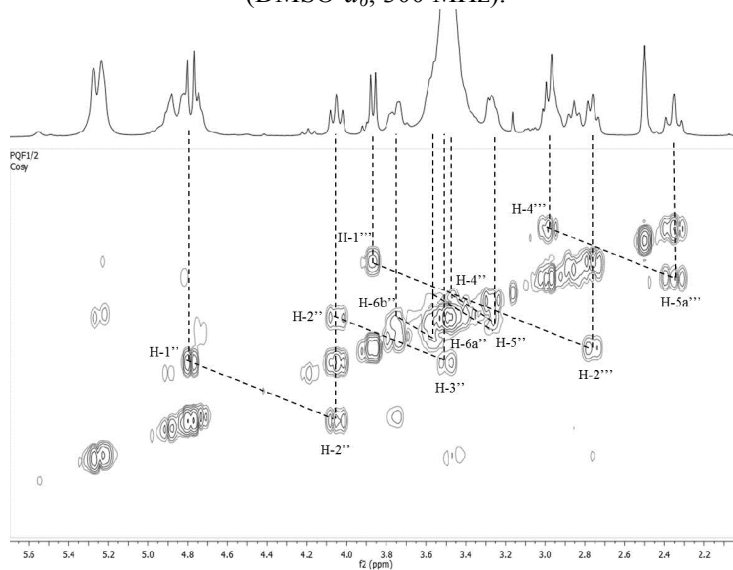
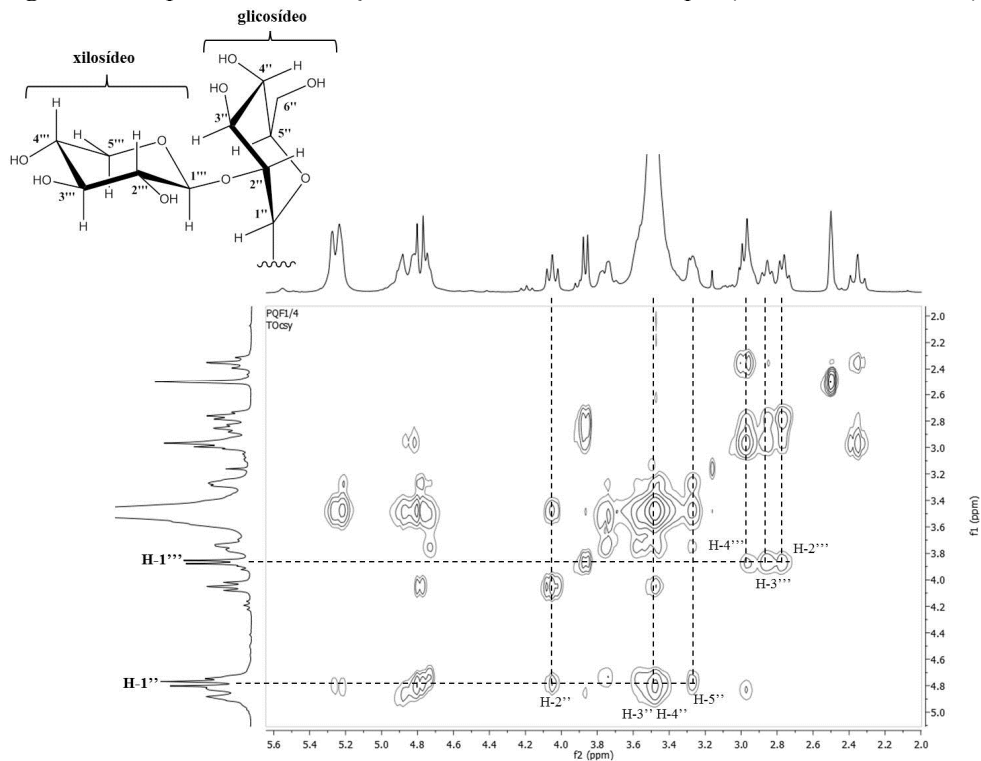


Figura 57 - Espectro de correlação TOCSY do flavonoide PqF1 (DMSO- d_6 ; 300 MHz).



Apesar da ausência de espectro de correlação a longa distancia HMBC, foi possível definir a posição da ligação entre os açúcares com base na comparação dos valores de deslocamento químico dos carbonos que compõem essas unidades. Na **Tabela 10**, os valores de deslocamento químico dos carbonos referentes as posições C-1'' e C-2'' da unidade de glicose do flavonoide PqF1 e da unidade de glicose da vitexina e 2''-O-glicosil-vitexina podem ser comparados.

Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos dos carbonos C-2'' da unidade de glicose observados para PqF1, vitexina e 2''-O-glicosil-vitexina.

	PqF1	Vitexina*	2''-O-glicosil-vitexina *
C-1''	71,6	78,8	71,4
C-2''	80,9	73,9	81,7

Fonte: *Agrawal; Bansal (1989)

Com base nesses dados é que foi proposto que a segunda unidade de açúcar, que corresponde a xilose, encontra-se ligada ao C-2'' da glicose, definindo-se assim os locais de ligação das unidades de açúcar como sendo nas posições C-8 e C-2'', respectivamente para glicose e xilose.

Esses dados espectroscópicos corroboram com a massa observada para o composto ($m/z = 564$), e com os resultados obtidos após o processo de hidrólise ácida, indicando tratar-se de um flavonoide diglicosilado, do tipo *O*-glicosil-*C*-glicosídeo, denominado 2''-*O*-xilossil-vitexina (**Figura 58**).

Os valores de deslocamento químico dessa substância são similares aos observados na literatura (**Tabela 11**) (COMPAGNONE et al., 2008).

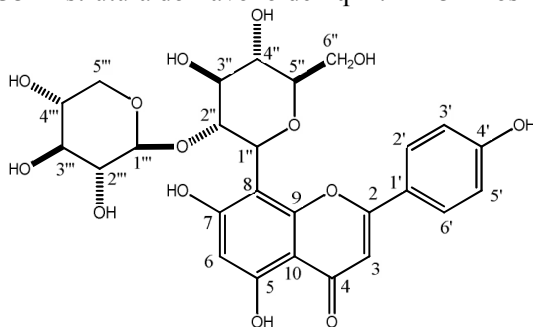
Tabela 11 - Dados de ^1H (300 MHz) e ^{13}C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF1 em DMSO- d_6 , e comparação com valores da literatura para 2''-*O*-xilossil-vitexina.

C	PqF1 (2''- <i>O</i> -xilossil-vitexina)		2''- <i>O</i> -xilossil-vitexina*	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	-	163,9	-	164,2
3	6,80 (s)	102,5	6,80 (s)	102,8
4	-	182,1	-	182,4

5	OH (13,15 <i>s</i>)	160,6	OH	160,9
6	6,24 (<i>s</i>)	98,2	6,27	98,5
7	-	162,8	-	163,1
8	-	103,8	-	104,0
9	-	156,7	-	156,9
10	-	103,9	-	104,1
1'	-	121,7	-	121,9
2' e 6'	8,03 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,7)	129,0	8,04	129,2
3' e 5'	6,90 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,7)	116,0	6,94	116,3
4'	-	161,3	-	161,5
1''	4,79 (<i>d</i> , <i>J</i> =10)	71,6	4,83	71,9
2''	4,06 (<i>t</i> , <i>J</i> =9,1)	80,9	4,09	81,6
3''	3,49	78,4	3,58	78,6
4''	3,46	70,2	3,54	70,5
5''	3,28 (<i>m</i>)	81,9	3,32	82,1
6''	3,75 (<i>br d</i> , <i>J</i> =11); 3,58 [†]	61,0	3,79; 3,60	61,3
1'''	3,88 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,1)	105,9	3,91	106,1
2'''	2,78 (<i>t</i> , <i>J</i> =8,0)	73,8	2,80	74,0
3'''	2,87 (<i>t</i> , <i>J</i> =8,0)	75,7	2,90	76,2
4'''	2,97 (<i>m</i>)	69,4	3,02	69,7
5'''	2,93 [†] ; 2,36 <i>t</i> , <i>J</i> =12,2)	65,6	3,02; 2,39	65,8

Fonte: *Compagnone e colaboradores (2008). †: sinais sobrepostos.

Figura 58 - Estrutura do flavonoide PqF1: 2''-*O*-xilosil-vitexina



Este é o primeiro relato do isolamento de 2''-*O*-xilosil-vitexina a partir do extrato aquoso de *P. quadrangularis*. Não obstante, durante a elaboração dessa tese, esse flavonoide foi identificado no extrato hidroetanólico desta mesma espécie com base nos dados de análise por CLAE-DAD-ESI-MS/MS (SAKALEM et al., 2012). Anteriormente, esse composto já havia sido relatado para outras espécies de *Passiflora*, tais como *P. serratifolia* (ULUBELEN; MABRY, 1980), *P. cyanea*, *P. oerstedii*, (ULUBELEN; AYYILDZ; MABRY, 1981) *P. serratodigitata*, (ULUBELEN; KERR; MABRY, 1982) e *P. foetida* (ULUBELEN et al. 1982c).

Para *P. alata* também foi descrita a presença desse derivado de vitexina (ULUBELEN et al., 1982b), no entanto, não são apresentados dados espectroscópicos para possível comparação. Outros estudos que avaliaram a composição química das folhas de *P. alata* descrevem apenas a presença de 2''-*O*-ramnosil-vitexina como o flavonoide majoritário, não relatando a presença de 2''-*O*-xilosil-vitexina (DOYAMA et al., 2005; MADOGGIO, 2011; PEREIRA et al., 2004; ZUCOLOTTO et al., 2012).

3.4.2.2 Análise do flavonoide PqF2

O composto foi isolado a partir da segunda metodologia desenvolvida para HSCCC, sendo obtido 8,7 mg de substância pura, na forma de pó amorfo de cor amarela.

O flavonoide apresentou um R_f aproximado de 0,45 quando analisado por CCD no sistema descrito na **Figura 48**, o que também sugere a presença de açúcar na molécula, devido a sua polaridade. Quando revelado com Reagente Natural e visualizado sob luz UV 360 nm a mancha apresentou coloração amarela clara, indicativo de núcleo flavona do tipo luteolina.

O espectro UV do flavonoide PqF2, observado na **Figura 49**, apresenta máximos de absorção característico de uma flavona de núcleo luteolina ($UV_{máx}$: 258, 268 e 348 nm) (MARKHAM, 1982). Análises por CLAE-EM, apontaram o pico de maior massa em m/z 579 [M-H]⁻.

Esses dados são condizentes com um núcleo luteolina e a presença de dois resíduos de açúcar, que poderiam ser uma hexose e uma pentose. Em comparação com o flavonoide PqF1, é interessante observar que a diferença de massas (16 m/z) entre as duas substâncias condiz com a diferença de núcleo desses flavonoides, que seria apenas um oxigênio.

A totalidade da massa obtida do flavonoide PqF2 isolado foi utilizada para análises por RMN, para a qual foram obtidos os espectros de ^1H RMN, HSQC e HMBC. Os espectros de RMN obtidos para essa substância foram realizados em MeOH deuterado, considerando a maior facilidade de recuperação da amostra, diferentemente do composto PqF1 (que foi analisado em DMSO- d_6).

Os dados obtidos por ^1H RMN e HSQC permitiram confirmar a aglicona como luteolina, em especial pela presença dos sinais de hidrogênios característicos de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído (anel B), com dois desses hidrogênios em posição *orto* (δ_{H} 7,56, d, $J=2,0$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 114,5; δ_{H} 7,52, dd, $J=2,0$ e 8,3 Hz \leftrightarrow δ_{C} 119,9; δ_{H} 6,92, 1H, d, $J=8.3$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 116,5). (**Figura 59 e 60**).

De forma coerente com a massa observada para essa substância e assim como nos espectros do flavonoide PqF1, são observados sinais de dois hidrogênios e carbonos anoméricos (δ_{H} 5,02, d, $J=10,0$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 73,5 e δ_{H} 4,13, d, $J=7,4$ Hz \leftrightarrow δ_{C} 105,9), e também de dois sinais de metilenos (δ_{H} 3,96; 3,89 \leftrightarrow δ_{C} 62,5 e δ_{H} 3,19; 2,61 \leftrightarrow δ_{C} 66,4). Quando comparado os espectros HSQC de ambos flavonoides, foi possível concluir que a porção glicídica dessas substâncias eram as mesmas, uma glicose e uma xilose (**Figura 60**).

Figura 59 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PqF2 (CD_3OD ; 300 MHz).

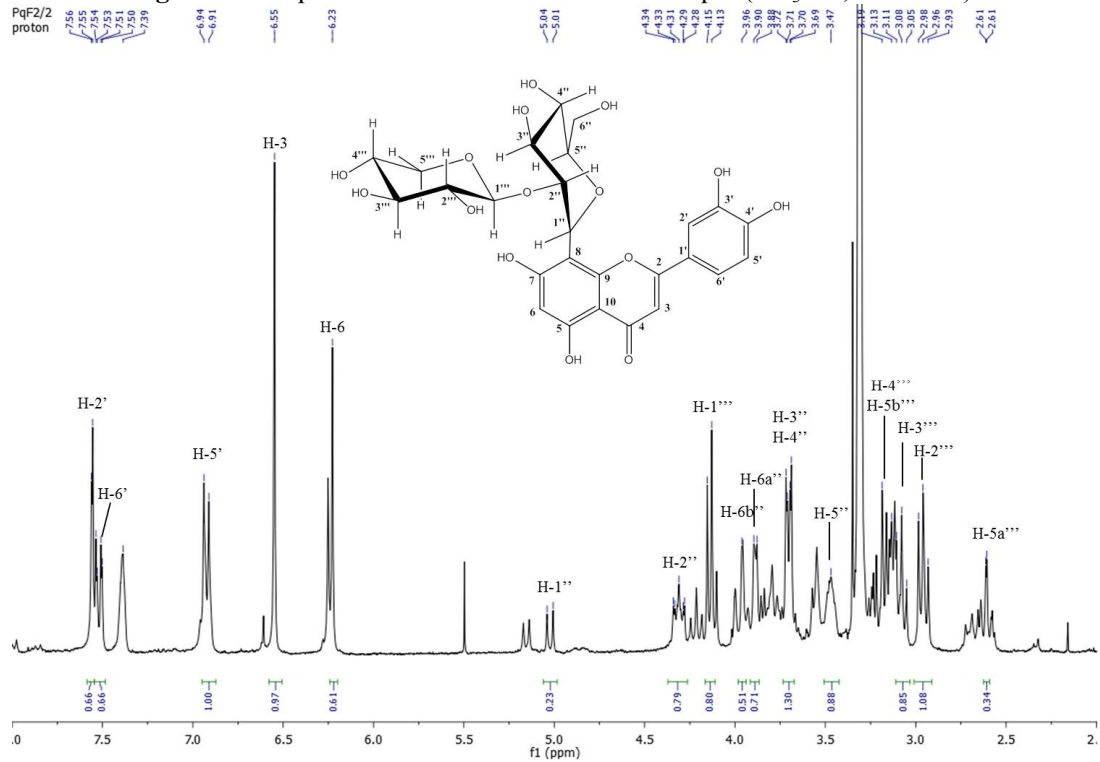


Figura 60 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF2 (CD₃OD; 300 / 75 MHz).

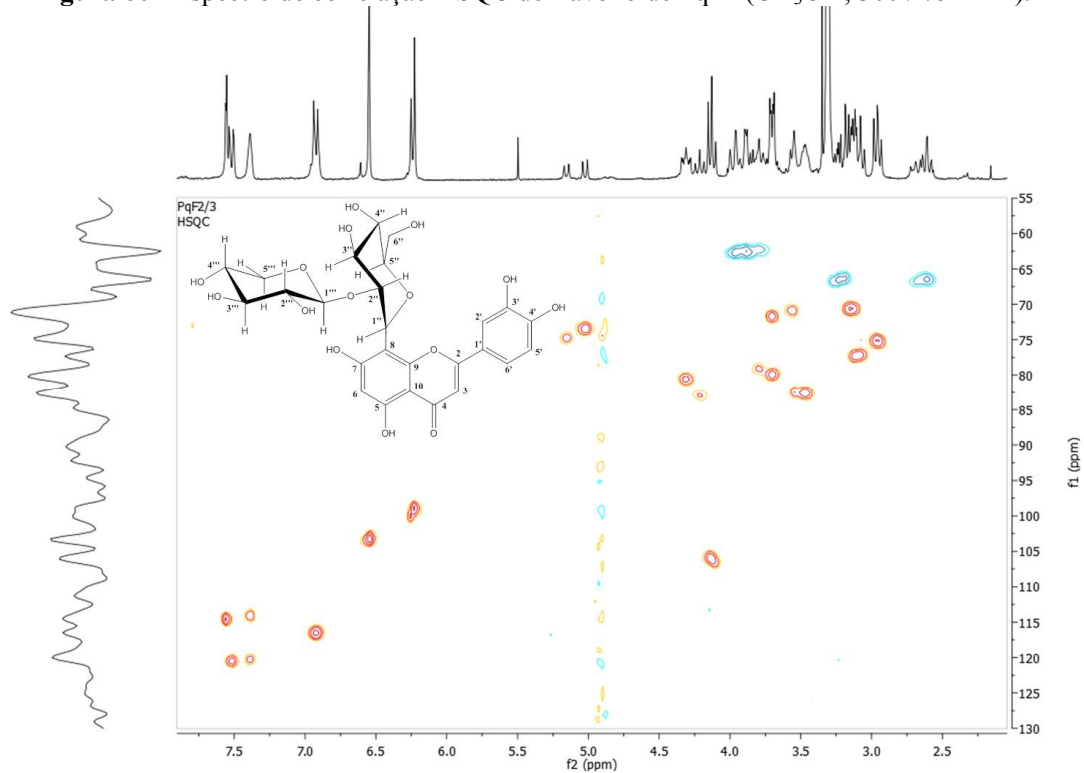


Figura 61 - Espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF2 (CD₃OD; 300 / 75 MHz).

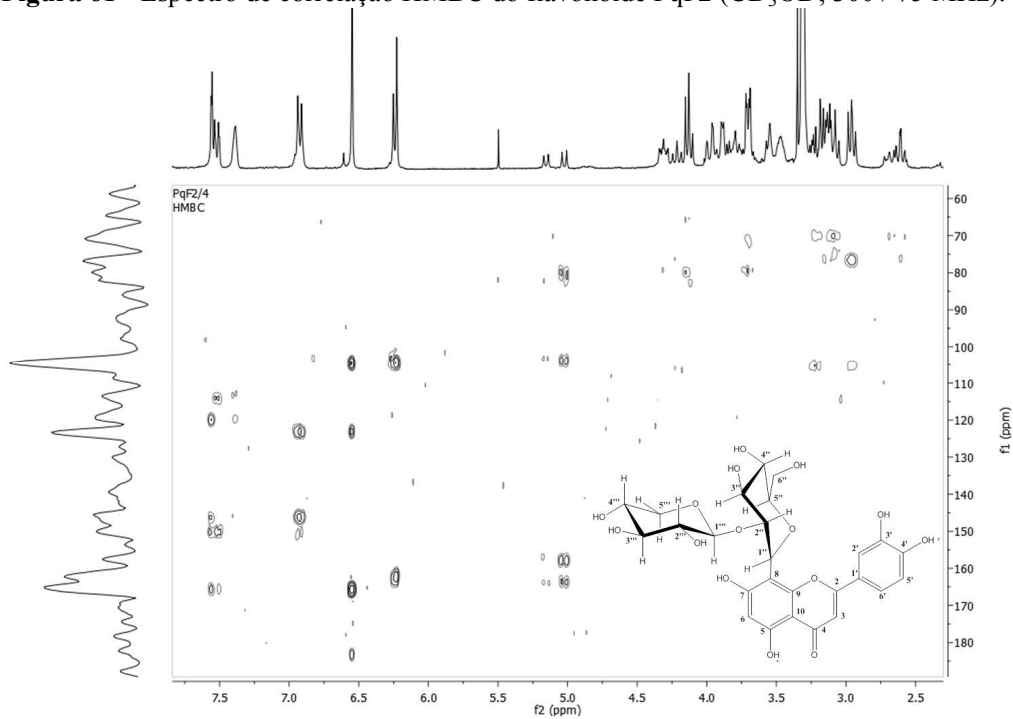
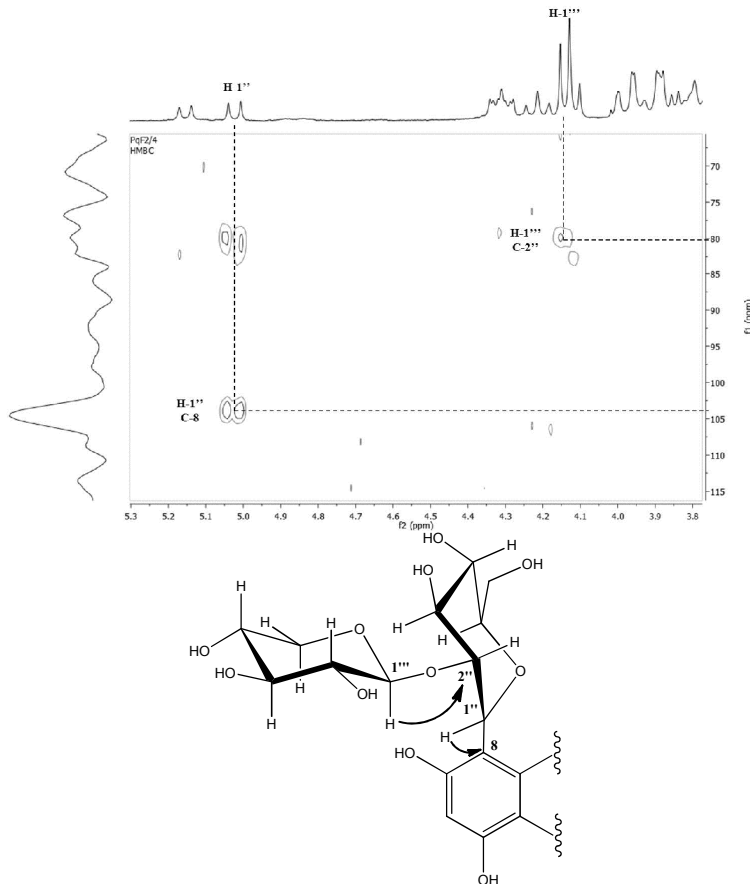


Figura 62 - Ampliação do espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF2 (CD₃OD; 300 / 75 MHz),



➔ : Principais correlações no que diz respeito as posições das unidades de açúcar.

Por meio da análise do espectro de HMBC, o ponto de ligação dos açúcares à agliconas foi determinado pela correlação entre o hidrogênio H-1'' da glicose (δ_H 5,02) e o carbono C-8 do núcleo luteolina (δ_C 104,5). Já a ligação entre os açúcares foi determinada pela correlação entre o hidrogênio H-1''' da xilose (δ_H 4,13) e o carbono C-2'' da glicose (δ_C 80,1) (**Figura 61 e 62**).

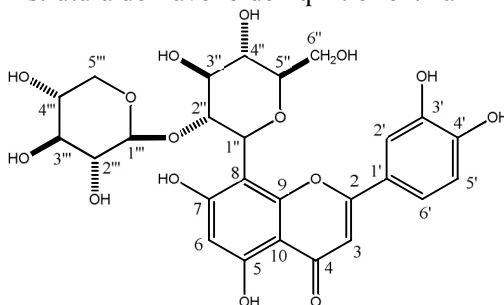
Os valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos do flavonoide foram comparados com os observados para o flavonoide anteriormente elucidado, e estão apresentados na **Tabela 12**. O conjunto dos dados permitiu identificar o flavonoide PqF2 como sendo 2''-*O*-xilosil-orientina, flavonoide recentemente descrito para as folhas de *P. quadrangularis*, por meio de uma análise de CLAE-DAD-ESI-MS/MS (**Figura 63**) (SAKALEM et al., 2013).

Tabela 12 - Dados de ^1H (300 MHz) e ^{13}C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF2 em CD_3OD , em comparação com o flavonoide PqF1, identificado como vitexina-2''-*O*-xilosídeo, em $\text{DMSO}-d_6$.

C	PqF2		PqF1	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	165,2	-	163,9
3	6,55 (s)	103,3	6,80 (s)	102,5
4	-	182,7	-	182,1
5	-	162,1	OH (13,15 s)	160,6
6	6,25 (s)	98,3	6,24 (s)	98,2
7	-	163,7	-	162,8
8	-	104,5	-	103,8
9	-	157,6	-	156,7
10	-	104,5	-	103,9
1'	-	123,4	-	121,7
2'	7,56 (d, $J=2,0$)	114,5	8,03 (d, $J=8,7$)	129,0
3'	-	146,1	6,90 (d, $J=8,7$)	116,0
4'	-	150,1	-	161,3
5'	6,92 (d, $J=8,3$)	116,5	6,90 (d, $J=8,7$)	116,0
6'	7,52 (dd, $J=2,0; 8,3$)	119,9	8,03 (d, $J=8,7$)	129,0
1''	5,02 (d, $J=10$)	73,5	4,79 (d, $J=10$)	71,6
2''	4,31 (t, $J=9,4$)	80,3	4,06 (t, $J=9,1$)	80,9
3''	3,70	79,9	3,49	78,4
4''	3,70	71,5	3,46	70,2
5''	3,47 (m)	82,6	3,28 (m)	81,9
6''	3,96; 3,89	62,5	3,75; 3,58	61,0

1 ^{'''}	4,13 (d, $J=7,4$)	105,9	3,88 (d, $J=7,1$)	105,9
2 ^{'''}	2,96 (t, $J=8,0$)	74,9	2,78 (t, $J=8,0$)	73,8
3 ^{'''}	3,08 (t, $J=8,0$)	77,3	2,87 (t, $J=8,0$)	75,7
4 ^{'''}	3,13 (m)	70,6	2,97 (m)	69,4
5 ^{'''}	3,19; 2,61	66,4	2,93; 2,36	65,6

Figura 63 - Estrutura do flavonoide PqF2: orientina-2''-O-xilosideo.



3.4.2.3 Análise do flavonoide PqF3

O flavonoide foi isolado sob a forma de pó amorfo, com uma massa de 16,8 mg. Nas análises por CCD, o flavonoide PqF3 apresentou um R_f aproximado de 0,40, no sistema descrito na **Figura 48** e quando revelado com Reagente Natural e visualizado sob luz UV 360 nm a mancha apresentou coloração verde, indicando portanto, tratar-se de um flavonoide glicosilado, de núcleo flavona do tipo apigenina.

O flavonoide PqF3 apresentou um espectro UV também característico de núcleo flavona do tipo apigenina ($UV_{\text{máx}}$: 269 e 335 nm) (MARKHAM, 1982), e uma massa de m/z 593 $[M-H]^-$, o que indica a possível presença de duas moléculas de hexoses ligadas ao núcleo apigenina.

A totalidade da massa do composto isolado foi utilizada para a aquisição dos espectros de RMN, os quais apresentaram diversos sinais similares aos observados para o flavonoide PqF1, em especial os correspondentes a parte aglicona. Devido a essa similaridade, é que a identificação do flavonoide PqF3 foi realizada principalmente de maneira comparativa.

Por meio da análise dos espectros de 1H RMN e HSQC (**Figura 64 e 65**), e em comparação com o flavonoide PqF1 (**Tabela 13**), foi

possível confirmar o núcleo apigenina, e a presença de duas unidades de açúcar.

Entretanto, observa-se clara distinção no que diz respeito a uma das unidades de açúcar. Como já mencionado, a massa observada para PqF3 (594) é coerente com a presença de duas hexoses. Nesse sentido, a análise detalhada dos espectros de HSQC, COSY (**Figura 67**) e TOCSY (**Figura 68**) permitiu a caracterização das duas unidades de açúcar como sendo glicoses. Esses dados comprovam os resultados observados no procedimento de hidrólise ácida, onde foi observada a formação de vitexina e glicose.

As conexões entre as unidades de glicose e destas com o núcleo foram determinadas pelas correlações de longa distância, observadas no espectro de HMBC (**Figura 66**). É possível observar a correlações do hidrogênio anomérico da primeira unidade de glicose (H-1'', δ_H 5,05) com o carbono C-8 (δ_C 103,7) da aglicona, e a correlação do hidrogênio anomérico da segunda unidade de glicose (H-1''', δ_H 4,20) com o carbono C-2'' (δ_C 81,2).

Figura 64 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PqF3 (CD_3OD ; 300 MHz).

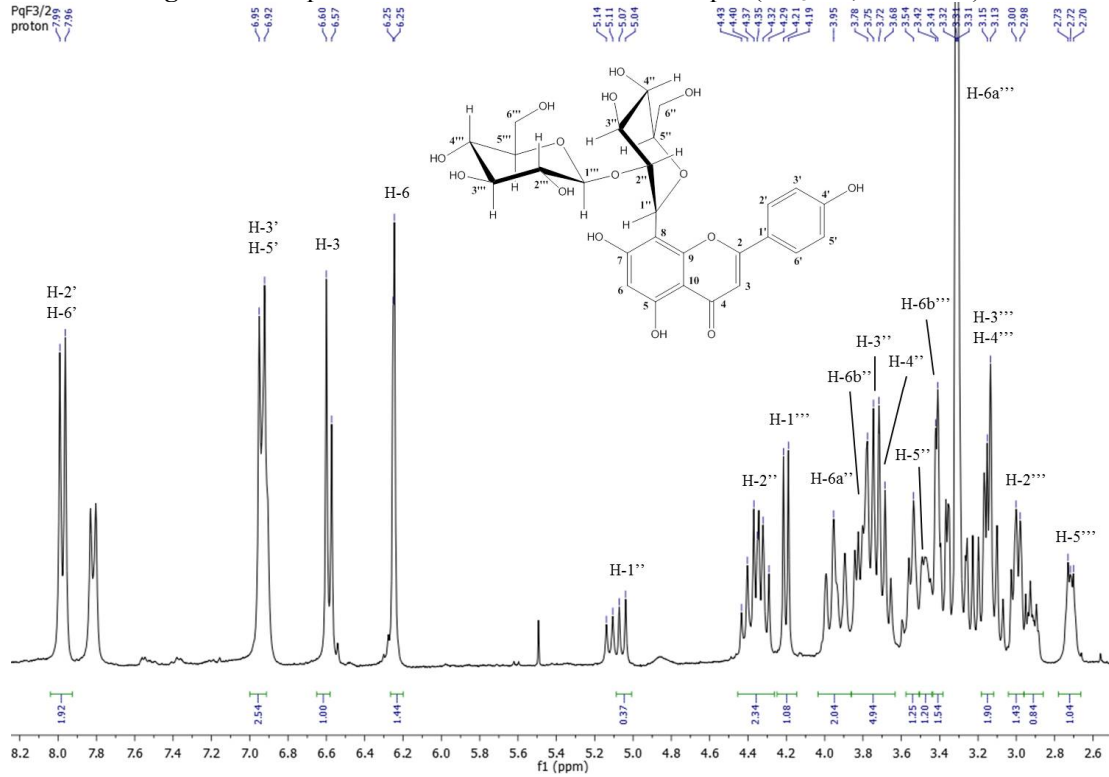


Figura 65 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF3 (CD₃OD; 300 / 75 MHz)

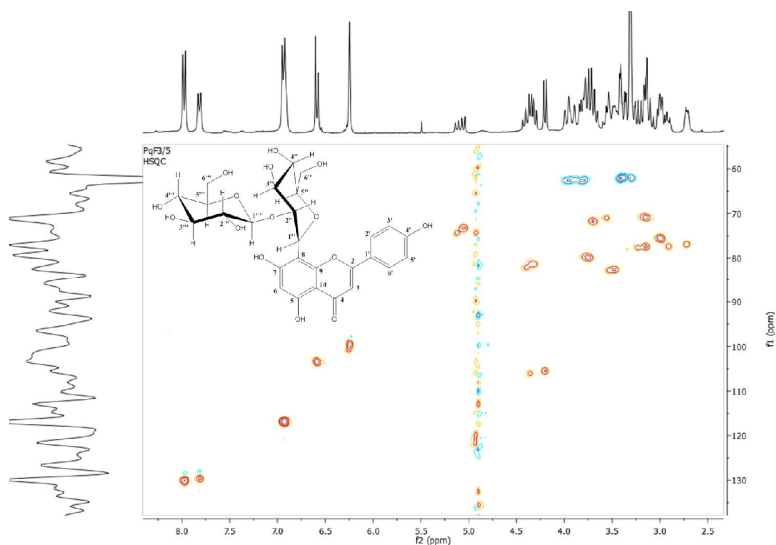


Figura 66 - Ampliação do espectro de correlação HMBC do flavonoide PqF3 (CD₃OD; 300 / 75 MHz)

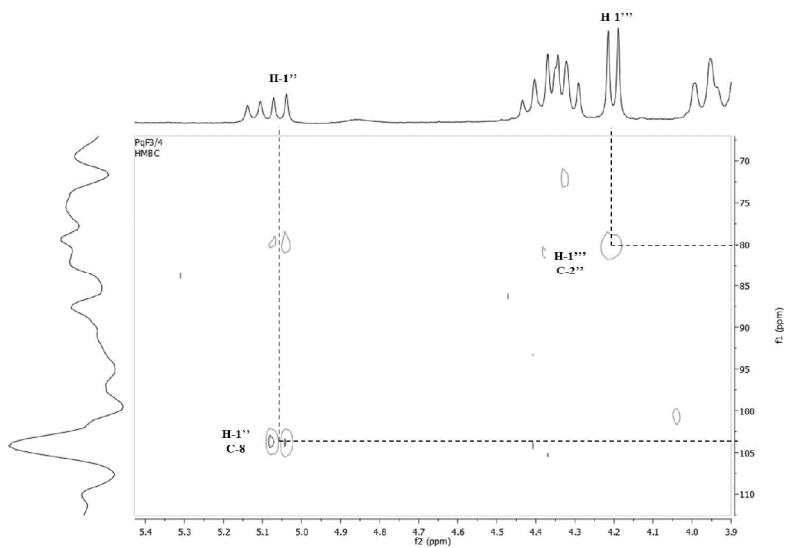


Figura 68 - Espectro de correlação TOCSY do flavonoide PqF3 (CD₃OD; 300 MHz).

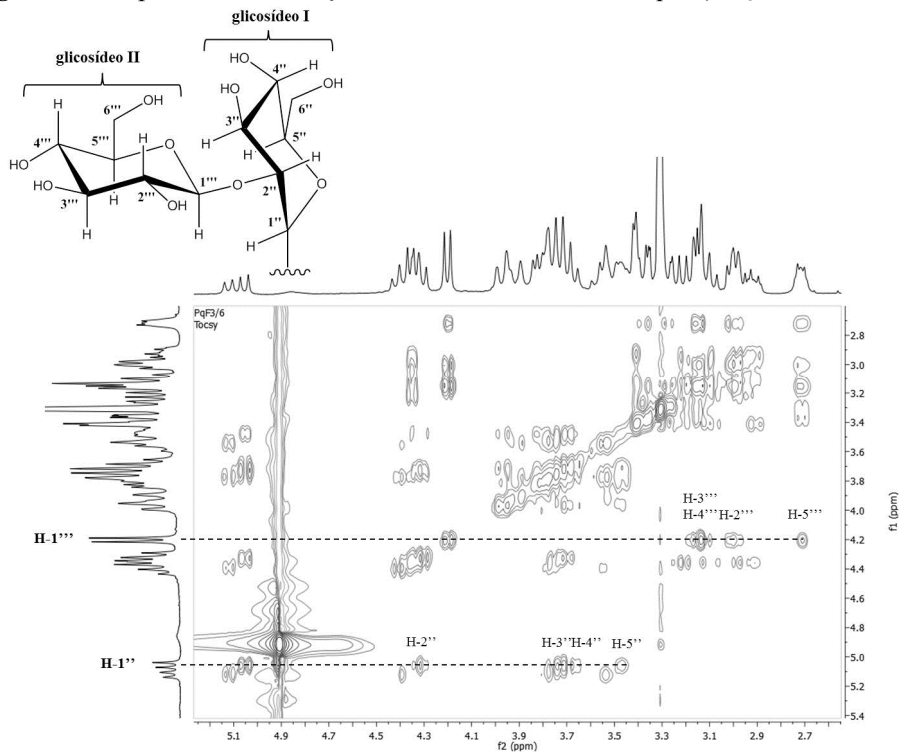
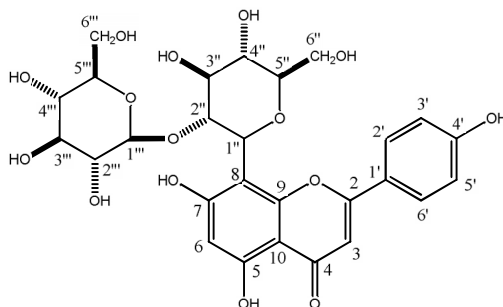


Tabela 13 - Dados de ^1H (300 MHz) e ^{13}C RMN (75 MHz) para o flavonoide PqF3 em CD_3OD , em comparação com o flavonoide já elucidado PqF1 (em $\text{DMSO}-d_6$).

C	PqF3		PqF1 (2''-O-xilosil-vitexina)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	165,0	-	163,9
3	6,60 (s)	103,2	6,80 (s)	102,5
4	-	182,5	-	182,1
5	-	161,9	OH (13,15 s)	160,6
6	6,25 (s)	99,1	6,24 (s)	98,2
7	-	163,2	-	162,8
8	-	103,7	-	103,8
9	-	157,0	-	156,7
10	-	104,2	-	103,9
1'	-	122,1	-	121,7
2' e 6'	7,98 (d, $J=8,6$)	129,6	8,03 (d, $J=8,7$)	129,0
3' e 5'	6,95 (d, $J=8,6$)	116,6	6,90 (d, $J=8,7$)	116,0
4'	-	161,4	-	161,3
1''	5,05 (d, $J=10$)	73,1	4,79 (d, $J=10$)	71,6
2''	4,30 (t, $J=9,4$)	81,2	4,06 (t, $J=9,1$)	80,9
3''	3,73	79,6	3,49	78,4
4''	3,68	71,7	3,46	70,2
5''	3,46 (m)	82,3	3,28 (m)	81,9
6''	3,90; 3,80	62,4	3,75; 3,58	61,0
1'''	4,20 (d, $J=7,7$)	105,3	3,88 (d, $J=7,1$)	105,9
2'''	2,99 (t, $J=6,3$)	75,3	2,78 (t, $J=8,0$)	73,8
3'''	3,14 m	77,2	2,87 (t, $J=8,0$)	75,7
4'''	3,14 (d, $J=5,1$)	70,6	2,97 (m)	69,4
5'''	2,71	76,7	2,93; 2,36	65,6
6'''	3,30; 3,40	61,9	-	-

Esses dados condizem com os valores de massas obtidos para essa molécula, permitindo identificar o flavonoide PqF3 como sendo 2''-*O*-glicosil-vitexina (**Figura 52**), flavonoide descrito recentemente para as folhas de *P. quadrangularis* (SALAKEM et al., 2013).

Figura 69 - Estrutura do flavonoide PqF3: 2''-*O*-glicosil-vitexina



3.4.2.4 Análise do flavonoide PqF4

O flavonoide PqF4 foi o quarto composto isolado por HSCCC, a partir do qual foram obtidos 6,8 mg, sob a forma de pó amorfo, de coloração amarela. A análise por CCD revelou um R_f aproximado de 0,35 no sistema descrito na **Figura 48**. A coloração da mancha observada quando revelada com Reagente Natural e visualizado sob luz UV 360 nm era amarela clara, indicativo de núcleo flavona do tipo luteolina.

Seu espectro UV corrobora com as características típicas de um núcleo flavona do tipo luteolina ($UV_{máx}$: 258, 268 e 348 nm) (MARKHAM, 1982) e a análise por CLAE-MS revelou uma íon molecular de m/z 609 $[M-H]^-$, o que também sugere a presença de dois açúcares, do tipo hexoses, ligadas a aglicona. A diferença de massas entre PqF4 e PqF3 (16) condiz que a diferença desses compostos seria em relação a porção aglicona (um átomo de oxigênio).

A totalidade da massa obtida do flavonoide PqF4 isolado foi enviada para análises por RMN e, do mesmo modo que se realizou a identificação dos demais flavonoides, para PqF4, também as análises dos espectros permitiram a confirmação do núcleo luteolina, assim como a identificação da presença de duas unidades de açúcar (**Figuras 70 e 71**).

Devido a presença de diversos sinais em comum com os espectros dos flavonoides já elucidados, a identificação do flavonoide PqF4 foi por meio de análise comparativa dos espectros, tanto em

relação aos valores de hidrogênio, carbono e também correlações (**Tabela 14**).

Desse modo, foi possível identificar o flavonoide PqF4 como sendo 2''-O-glicosil-orientina (**Figura 72**), flavonoide relatado pela primeira vez para a espécie *P. quadrangularis*.

Figura 70 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PqF4 (CD_3OD ; 300 MHz).

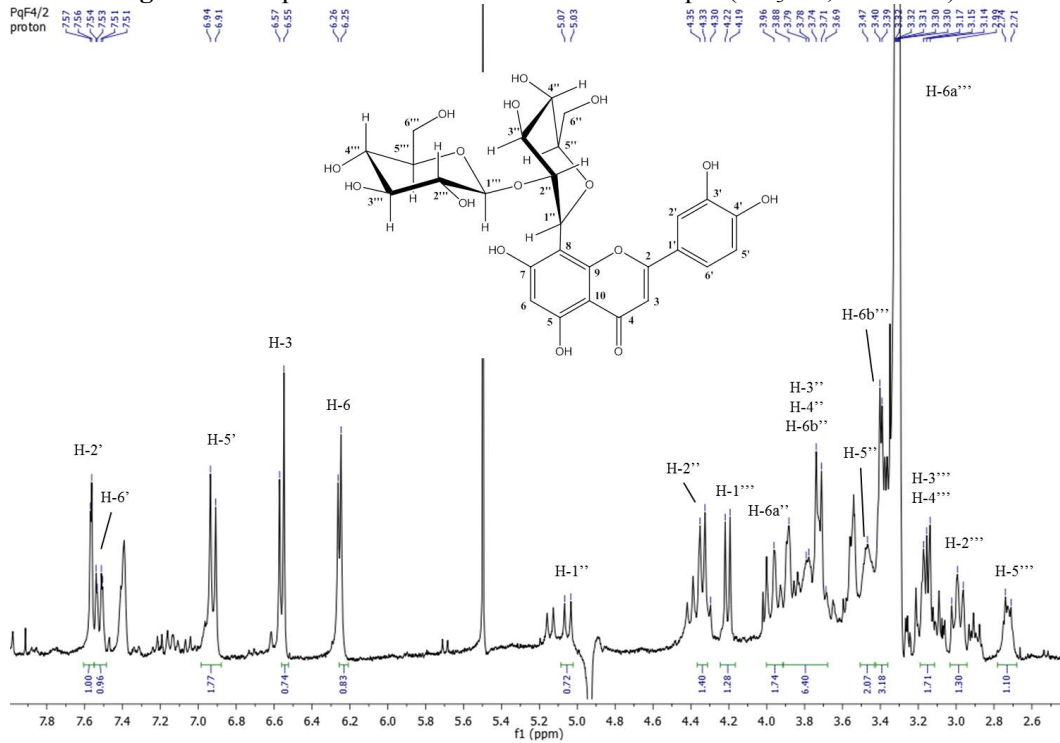


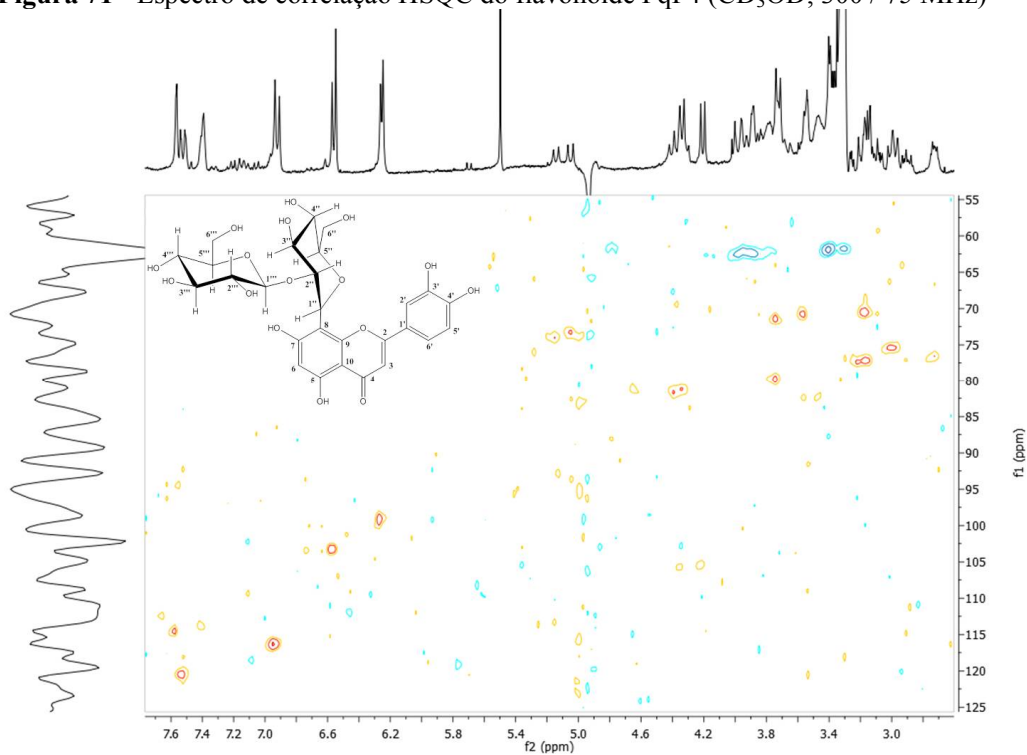
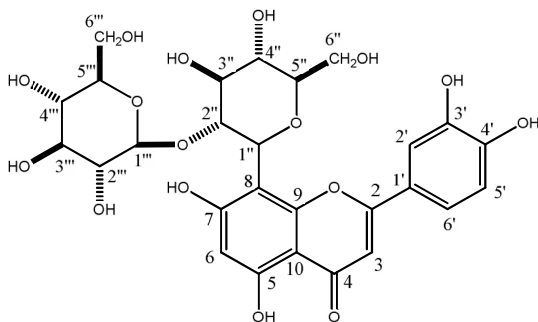
Figura 71 - Espectro de correlação HSQC do flavonoide PqF4 (CD₃OD; 300 / 75 MHz)

Tabela 14 - Valores dos deslocamentos químicos (δ ppm) dos carbonos do flavonoide PqF4 comparados com os valores para PqF2 e PqF3 (CD₃OD; 75 MHz).

C	PqF4	PqF2	PqF3
2	165,0	165,2	165,0
3	103,3	103,3	103,2
4	182,7	182,7	182,5
5	162,1	162,1	161,9
6	99,0	98,3	99,1
7	163,7	163,7	163,2
8	102,5	104,5	103,7
9	157,6	157,6	157,0
10	104,5	104,5	104,2
1'	123,4	123,4	122,1
2'	114,5	114,5	129,6
3'	146,1	146,1	116,6
4'	150,1	150,1	161,4
5'	116,3	116,5	116,6
6'	120,4	119,9	129,6
1''	73,2	73,5	73,1
2''	80,3	80,3	81,2
3''	79,9	79,9	79,6
4''	71,5	71,5	71,7
5''	82,6	82,6	82,3
6''	62,4	62,5	62,4
1'''	105,9	105,9	105,3
2'''	74,9	74,9	75,3
3'''	77,3	77,3	77,2
4'''	70,6	70,6	70,6
5'''	66,4	66,4	76,7
6'''	61,8	-	61,9

Figura 72 - Estrutura do flavonoide PqF4: 2''-O-glicosil-orientina

3.5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, foi possível concluir que:

- A técnica de HSCCC, com eluição em modo gradiente, permitiu a separação de quatro flavonoides *C*-glicosídeos a partir do extrato aquoso bruto das folhas de *P. quadrangularis*, os quais foram purificados posteriormente por coluna de exclusão molecular;
- A metodologia empregada permitiu o isolamento com bom rendimento desses flavonoides, variando entre 3 e 0,7% de rendimento.
- Por meio de técnicas espectroscópicas e espectrofotométricas, foi possível identificar os flavonoides isolados como 2''-O-xilosil-vitexina (**PqF1**), 2''-O-xilosídeo-orientina (**PqF2**), 2''-O-glicosil-vitexina (**PqF3**) e 2''-O-glicosil-orientina (**PqF4**).

CAPÍTULO 4 - Isolamento e purificação de saponinas das folhas de *Passiflora quadrangularis*.

4.1 INTRODUÇÃO

As saponinas presentes em espécies do gênero *Passiflora* veem sendo estudadas desde a década de 70, principalmente em trabalhos com *P. edulis* (BOMBARDELLI et al., 1975). Diversas estruturas têm sido descritas para o gênero, embora a ocorrência dessas substâncias seja restrita a poucas espécies, como já apresentado no **Capítulo 1**. Dentre essas espécies, destacam-se *P. alata* e *P. quadrangularis*, para as quais já foram identificadas algumas saponinas, com predomínio de estruturas de núcleo cicloartano para *P. quadrangularis* (BOMBARDELLI et al., 1975; ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985; ORSINI et al., 1987; SAKALEM et al., 2013) e predomínio de derivadas de núcleo oleanólico e cicloartano para *P. alata* (REGINATTO et al., 2001), cujas estruturas já foram apresentadas no **Capítulo 1 (Figuras 16 e 17)**.

As análises cromatográficas por CCD e CLAE apresentadas no **Capítulo 2** permitiram observar a presença de saponinas, dentre as espécies estudadas, apenas nos extratos aquosos das folhas de *P. alata* e *P. quadrangularis* (**Figura 33**). Embora os perfis cromatográficos desses dois extratos sejam similares em relação a seus compostos majoritários, observaram-se distintos compostos minoritários, havendo sido o extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* o que apresentou uma maior complexidade de componentes.

Este capítulo apresenta o processo de isolamento de saponinas a partir das folhas de *P. quadrangularis* por meio de diferentes técnicas cromatográficas e suas posteriores identificações através de técnicas espectroscópicas.

4.2 OBJETIVOS

- Isolar por técnicas cromatográficas as saponinas das folhas de *P. quadrangularis*.
- Identificar as saponinas isoladas por métodos espectroscópicos.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Material vegetal

Folhas de *P. quadrangularis* foram coletadas no município de Gigante, Huila/Colombia, conforme descrito na **Tabela 2 (Capítulo 2)**.

4.3.2 Preparação dos extratos

As folhas de *P. quadrangularis* foram secas em estufa de ar circulante (35-40 °C) e moídas em moinho de facas. Após a moagem, 500 g de material vegetal foram extraídos por infusão aquosa, na proporção planta:solvente de 1:10 (m/v) a 95 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados.

4.3.3 Equipamentos

Evaporador rotatório Büchi equipado com bomba, controlador de pressão e recirculador de água termostatizado. A concentração de frações foi realizada em temperatura não superior a 45 °C.

As análises por CLAE analítico foram realizadas em um equipamento PerkinElmer Series 200, equipado com um detector UV com arranjo de diodos (UV-DAD), bomba quaternária, 'degasser' on-line, e injetor automático. Os dados foram processados no software TotalChrom[®] Workstation.

Para as análises por CLAE preparativo foi empregado um cromatógrafo Shimadzu, composto por duas bombas isocráticas, detector UV/Vis e injetor Rheodyne (volume do loop: 500 µL). Os dados foram processados no software Class-VP.

As análises de RMN foram realizadas em um equipamento Bruker (300 MHz / 75 MHz) e as amostras solubilizadas em piridina-*d*₅, no Departamento de Química da Pontifícia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia).

4.3.4 Procedimentos gerais

Os solventes empregados neste trabalho, tanto de qualidade analítica (P.A.) quanto grau CLAE são de origem Merck e Tedia. Água para fins de análise por CLAE foi purificada em um sistema Milli-Q[®] (Millipore, Beldford, USA). Todas as soluções de amostras para análise por CLAE foram filtradas através de membrana 0,45 µm previamente ao uso.

4.3.5 Análises cromatográficas

As cromatografias analíticas em camada delgada foram realizadas em placas de gel de sílica F_{254nm} Merck, em suporte de alumínio. A detecção das saponinas nos cromatogramas foi realizada mediante observação sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) e visualizadas com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico após aquecimento a 100 °C pelo período necessário até máximo desenvolvimento de coloração.

De modo geral, os extratos e frações contendo saponinas foram analisados por CCD utilizando como sistema eluente clorofórmio:etanol:ácido acético, em diferentes proporções (indicadas nas figuras), ou ainda acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v).

Os fracionamentos em coluna cromatográfica foram realizados sob gel de sílica Merck, com tamanho de partícula de 0,020 – 0,063 mm e de 0,063 – 0,200 mm e gel de permeação molecular Sephadex[®] LH-20 GE.

As condições cromatográficas nas análises por CLAE são as previamente descritas no **Capítulo 2** para as análises de saponinas das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata*. Foi empregada uma coluna Phenomenex Bondclone[®] Fenila (300 x 3.9 mm i.d.; 10µm), com um gradiente de ACN (A) e H₂O (B), assim estabelecido: 29% A (0-10 min), 29-35% A (10-40 min), com fluxo de 1.2 mL/min e detecção a 205 nm, com aquisição de espectro UV na faixa de 190 a 450 nm. As análises cromatográficas foram realizadas a temperatura ambiente (21 ± 2°C).

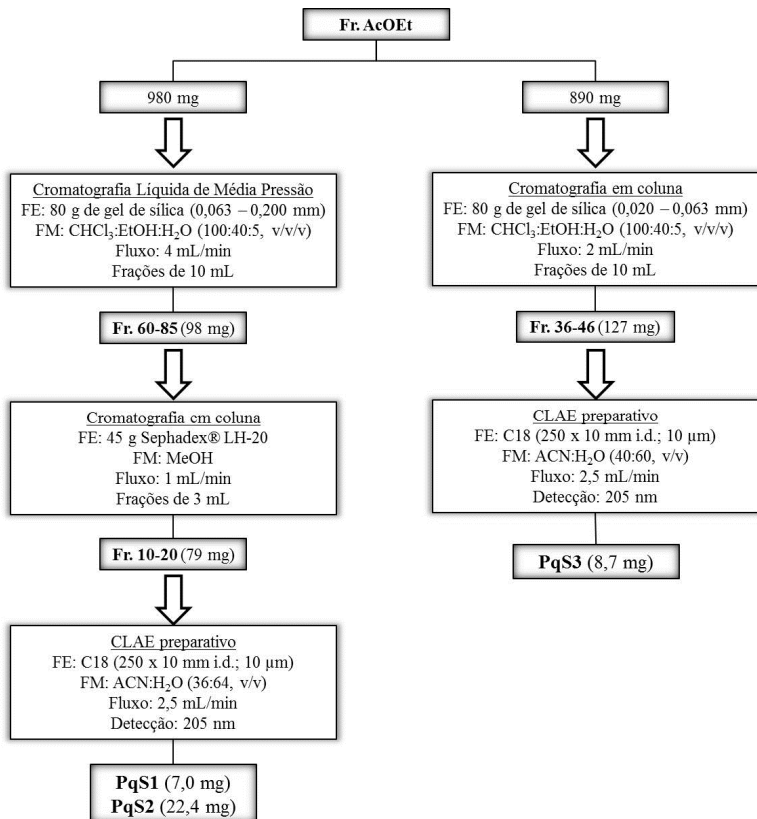
A separação nas análise por CLAE em modo preparativo foram realizadas em uma coluna preparativa C18 (250 x 10 mm i.d.; 10 µm), com fase móvel isocrática composta de ACN (A) e H₂O (B), em diferentes proporções, com fluxo de 2,5 mL/min e detecção a 205 nm.

4.3.6 Isolamento e purificação das saponinas de *P. quadrangularis*

Para o isolamento de saponinas a partir das folhas de *P. quadrangularis*, 5 g do extrato aquoso bruto liofilizado foram ressuspendidos em 500 mL de água destilada e particionados com 200 mL de AcOEt, por três vezes. A fase residual aquosa dessa primeira partição foi posteriormente particionada com 3 x 200 mL de BuOH. A partir dessas frações, foram realizados os processos de isolamento empregando diferentes técnicas cromatográficas. As **Figuras 73 e 74**

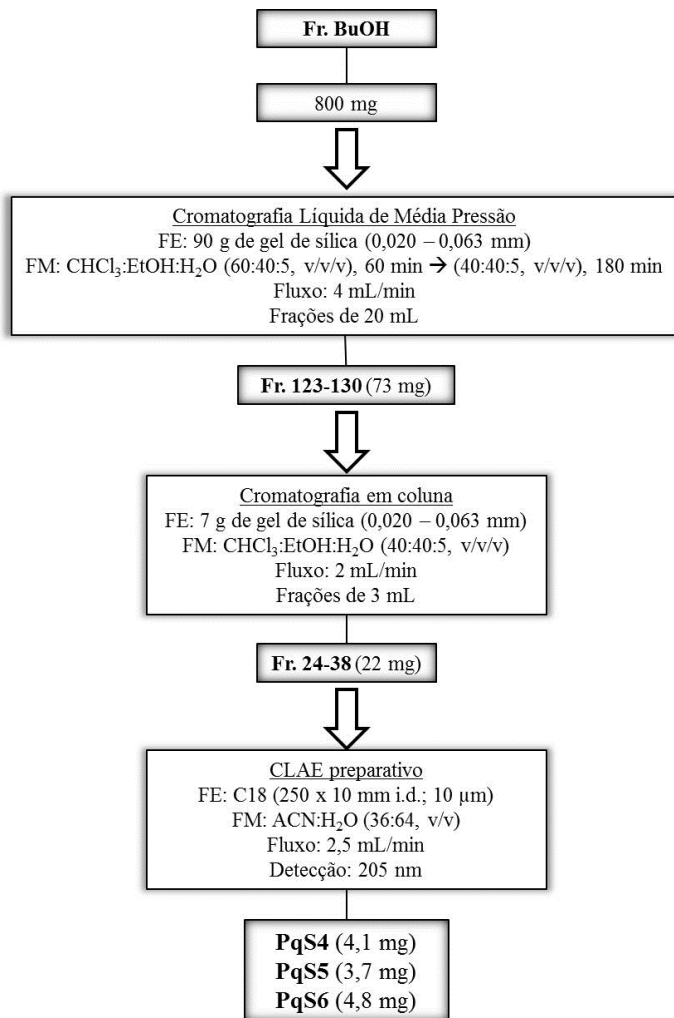
mostram esquemas do processo de purificação e isolamento partindo das frações AcOEt e BuOH, respectivamente.

Figura 73 - Esquema do isolamento e purificação das substâncias PqS1, PqS2 e PqS3.



Fonte: autor.

Figura 74 - Esquema do isolamento e purificação das saponinas PqS4, PqS5 e PqS6.



Fonte: autor.

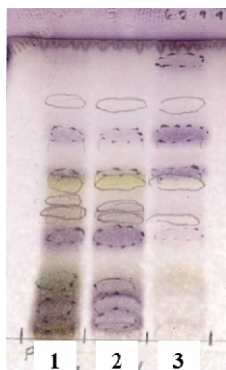
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação de saponinas nas folhas de *P. quadrangularis* iniciou-se com a análise do extrato aquoso bruto por CCD e CLAE, indicando a presença de sete a dez compostos com comportamento

cromatográfico indicativo de saponina, tal como seu valor de Rf e coloração, quando tratada com agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico (CCD), ou tempo de retenção (CLAE), conforme já apresentado no **Capítulo 2 (Figuras 33 e 34)**.

Parte do extrato aquoso bruto (5 g) foi submetida inicialmente a uma partição com solventes orgânicos em polaridade crescente. Esse processo forneceu as frações AcOEt e BuOH, que foram analisadas por CCD (**Figura 75**).

Figura 75 - Cromatografia em camada delgada para análise do extrato aquoso bruto e das frações BuOH e AcOEt das folhas de *P. quadrangularis*.



1: extrato aquoso bruto, 2: fr. BuOH, 3: fr. AcOEt.

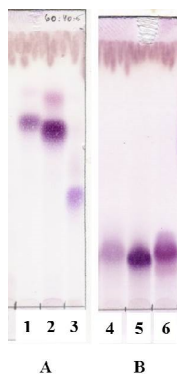
FE: gel de sílica F_{254nm} ; FM: acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v); Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.

A análise por CCD do extrato aquoso bruto e suas frações BuOH e AcOEt apresentou manchas de colorações rosa e violácea após revelação com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento, o que, adicionalmente a polaridade do sistema de solventes empregada, sugere a presença de saponinas. Como o esperado, ocorreu uma separação de acordo com suas características de polaridade, ocorrendo um maior acúmulo de compostos mais polares na fração BuOH quando comparada a fração AcOEt, por meio da observação dos valores de Rf. Essas frações foram posteriormente submetidas ao fracionamento cromatográfico.

Os trabalhos de isolamento iniciaram-se a partir da fração AcOEt, da qual foram isoladas três substâncias (**Figura 76**), cujas

estruturas foram elucidadas conforme descrito a seguir. A fração BuOH foi submetida aos processos cromatográficos posteriormente, e as substâncias isoladas a partir dessa fração ainda se encontram em processo de análise espectroscópica, e por isso, não são apresentadas nesta tese.

Figura 76 - Cromatografia em camada delgada para análise das substâncias isoladas da fração AcOEt (A) e da fração BuOH (B).



1: PqS1; 2: PqS2; 3: PqS3; 4: PqS4; 5: PqS5; PqS6.

FE: gel de sílica F_{254nm}; FM: clorofórmio:etanol:ácido acético (A) (60:40:5 v/v/v) (B) (40:40:5 v/v/v); Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.

4.4.1 Análise da substância PqS1

Essa substância foi isolada a partir de diversas técnicas cromatográficas, sendo a etapa final de isolamento e purificação CLAE preparativo, o que possibilitou a obtenção de 7,0 mg de substância pura, na forma de pó amorfo, de coloração branca. O grau de pureza (~90 %) da substância pode ser comprovado por análises por CCD e CLAE.

A totalidade da massa obtida dessa substância foi utilizada para análises por RMN, para a qual foram obtidos os espectros de ¹H RMN, HSQC, HMBC, COSY e TOCSY, a partir dos quais foi possível caracterizar e atribuir os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono que compõe a estrutura da saponina PqS1.

Na elucidação estrutural de saponinas, as análises por RMN apresentam diversos sinais diagnósticos. De modo geral, as observações iniciais se realizam no espectro de ¹³C RMN, que indica o número de carbonos, seu grau e tipo de substituição, além de apontar a presença ou

ausência de unidades de açúcar na molécula, assim como possíveis sinais diagnósticos característico do núcleo que compõe a saponina em questão.

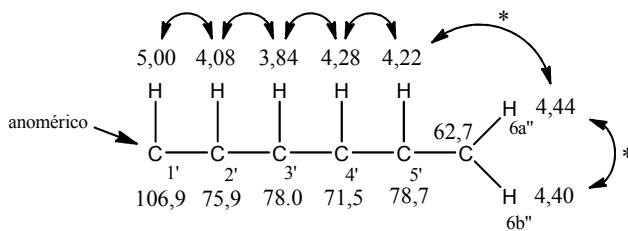
Nos procedimentos realizados para a substância PqS1, não foi adquirido o espectro de ^{13}C RMN. Na ausência deste, a análise iniciou-se pelo espectro de ^1H RMN em conjunto com o espectro de correlação HSQC. Sendo assim, optou-se primeiramente pela observação de alguns sinais diagnósticos, seguidos da análise da porção glicídica e posterior elucidação da aglicona.

O espectro de ^1H RMN (**Figura 78**) apresentou como característica mais destacada a presença de dois dupletos ($J=4,0$) blindados em δ_{H} 0,35 e δ_{H} 0,65, diagnósticos de hidrogênios geminais de grupo ciclopropano, como observados em triterpenos derivados do ciclolanostano. Por HSQC (**Figura 79**) foi possível observar a correlação desses hidrogênios com o mesmo carbono (δ_{C} 29,7 \leftrightarrow δ_{H} 0,35 e 0,65). Adicionalmente, outros sinais se destacam nos espectros, como a presença de cinco singletos, em região característica de grupamento metila, e que apresentavam integração para três hidrogênios. Também através do HSQC, foi possível atribuir a esses hidrogênios seus respectivos carbonos (δ_{C} 19,8 \leftrightarrow δ_{H} 1,02; δ_{C} 18,9 \leftrightarrow δ_{H} 1,10; δ_{C} 14,8 \leftrightarrow δ_{H} 1,16; δ_{C} 26,0 \leftrightarrow δ_{H} 1,47 e δ_{C} 22,0 \leftrightarrow δ_{H} 2,04).

Ainda, é observada a presença de três sinais de metilenos ligados a oxigênio (δ_{C} 61,0 \leftrightarrow δ_{H} 4,54; δ_{C} 61,7 \leftrightarrow δ_{H} 3,84 e 4,05; δ_{C} 62,7 \leftrightarrow δ_{H} 4,40 e 4,44) e de dois sinais de hidrogênios mais desblindados, atribuíveis a hidrogênio olefínico (δ_{C} 127,8 \leftrightarrow δ_{H} 5,50, t, $J=7,0$) e hidrogênio em carbono anomérico (δ_{C} 106,9 \leftrightarrow δ_{H} 5,00, d, $J=7,8$ Hz).

A presença de apenas um sinal com deslocamento químico atribuível a hidrogênio de carbono anomérico revela a presença de uma unidade de açúcar na molécula. Desse modo, através da análise dos espectros de ^1H RMN, HSQC e também do espectro de correlação COSY foi possível caracterizar, a partir do anomérico, a sequência dos hidrogênios referentes à unidade de açúcar, identificada como glicose (**Figura 77**). O espectro de TOCSY confirmou os hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema acoplado de spin, confirmando assim, os hidrogênios que compõem a glicose.

Figura 77 - Sequência de hidrogênios determinados por meio das correlações observadas no espectro COSY para a glicose da saponina PqS1.



Fonte: autor.

*Correlações não claramente observadas.

Figura 78 - Espectro ampliado de ^1H RMN da saponina PqS1 (piridina- d_5 ; 300 MHz)

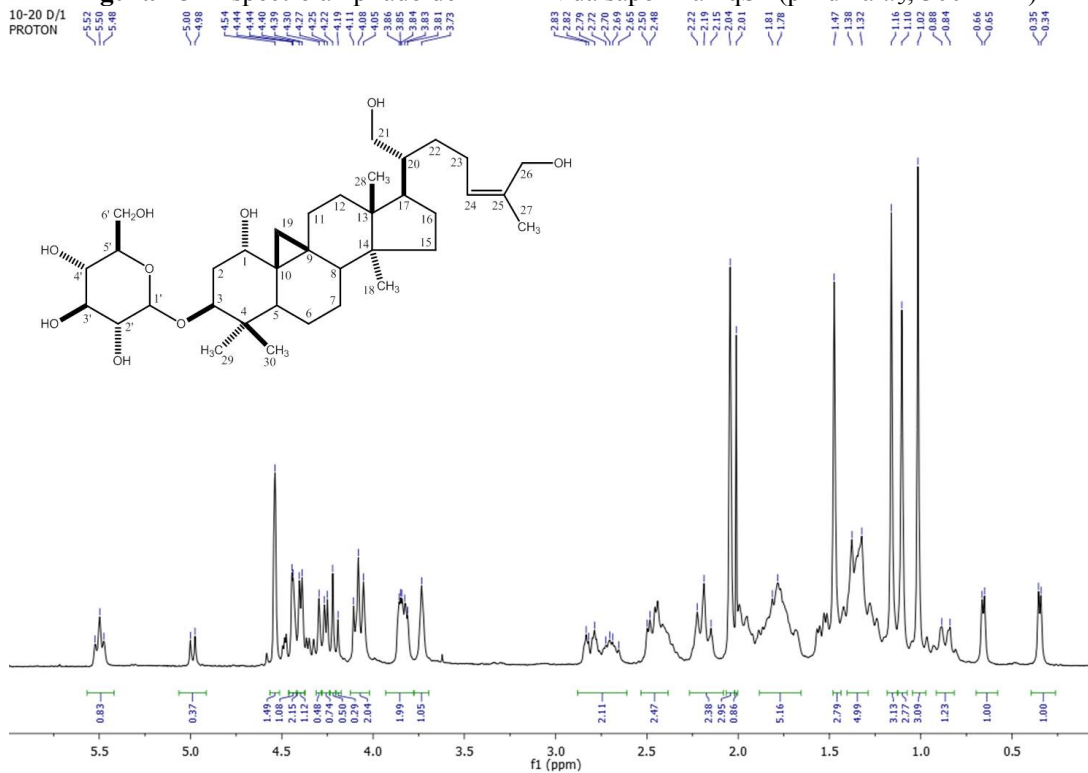


Figura 79 - Espectro de correlação HSQC da saponina PqS1 (piridina- d_5 ; 300 / 75 MHz)

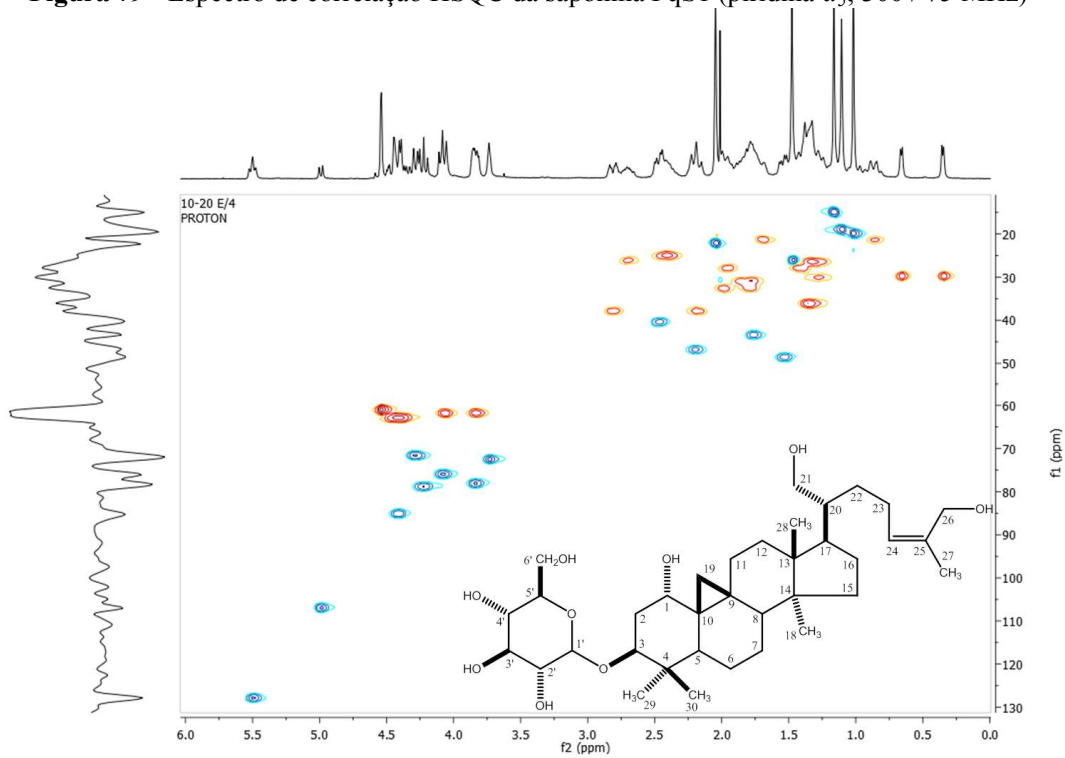


Figura 80 - Espectro de correlação HMBC da saponina PqS1 (piridina- d_5 ; 300 / 75 MHz).

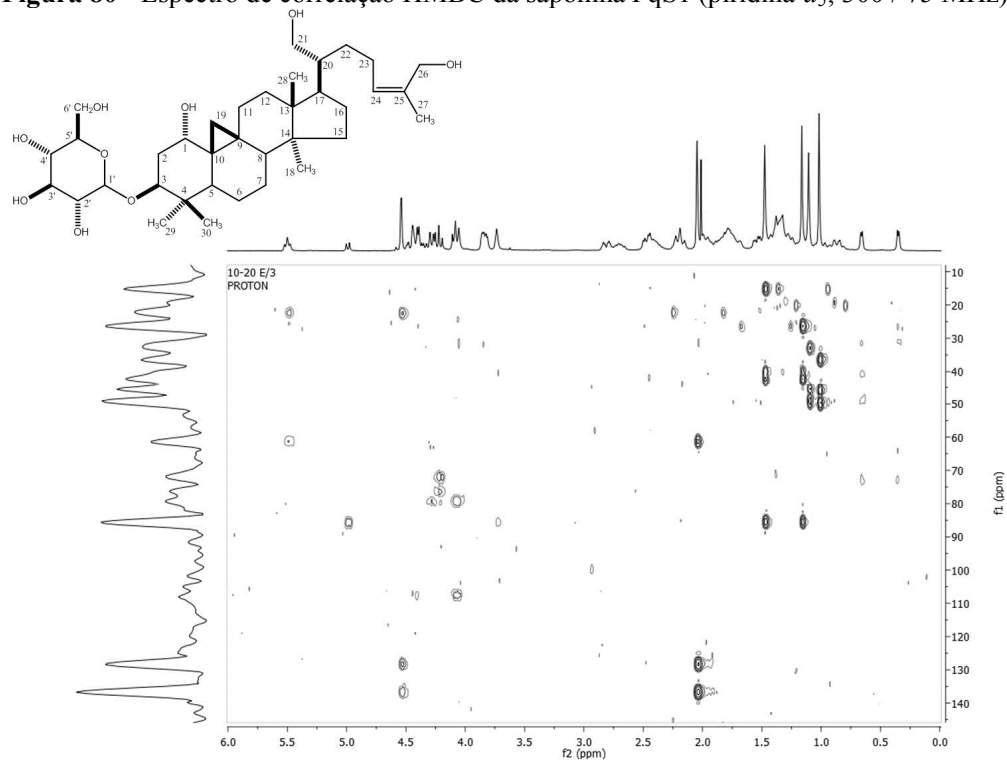
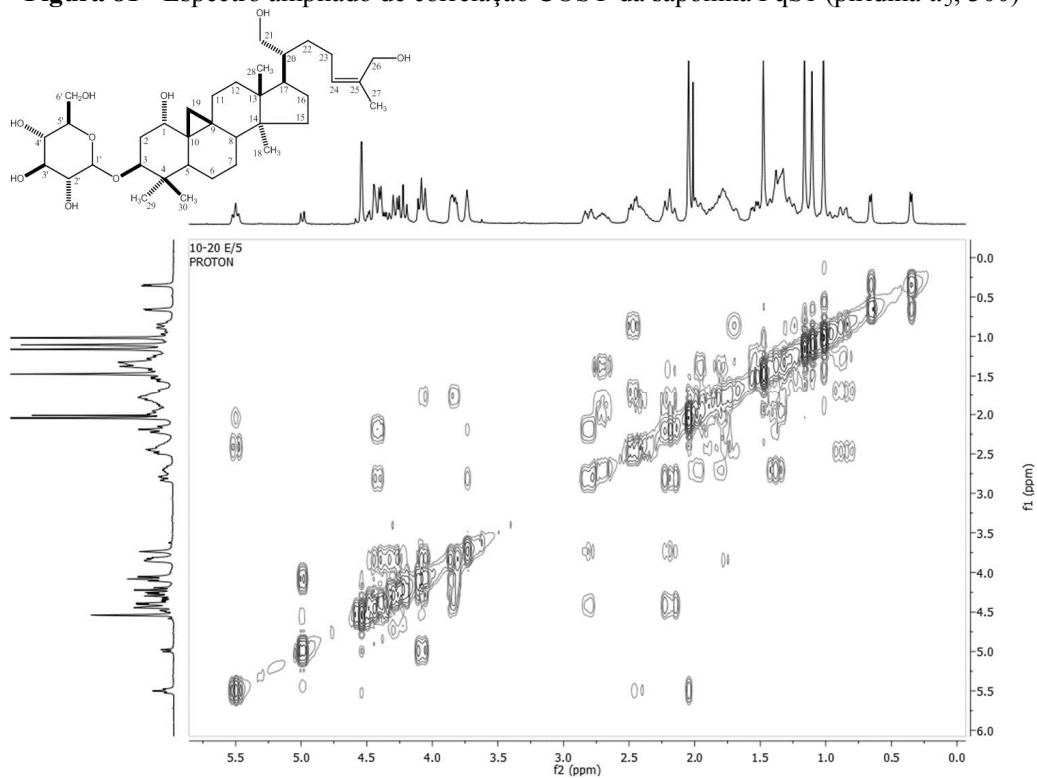


Figura 81 - Espectro ampliado de correlação COSY da saponina PqS1 (piridina- d_5 ; 300)



Em relação a aglicona, a presença dos sinais diagnósticos já mencionados anteriormente, como os hidrogênios geminais de núcleo ciclopropano, o número de metilas e ainda a insaturação, indica a possibilidade de um triterpeno pentacíclico com núcleo cicloartano.

Considerando que outras saponinas com esse núcleo já foram isoladas dessa espécie, inclusive a saponina majoritária quadrangulosídeo (**Figura 17**), foram comparados os valores de deslocamento químico dos hidrogênios referentes a saponina PqS1 e o quadrangulosídeo (**Tabela 15**). A atribuição dos valores químicos descritos nesta tabela foram realizadas mediante a comparação com o espectro do quadrangulosídeo e também por meio das correlações observadas nos espectros bidimensionais HSQC, HMBC (**Figura 80**) e COSY (**Figura 81**).

Dessa forma, foi possível estabelecer a atribuição da maioria dos hidrogênios e seus respectivos carbonos da agliconas da saponina PqS1, que permitiram inferir os valores de deslocamentos químicos apresentados na **Figura 82**.

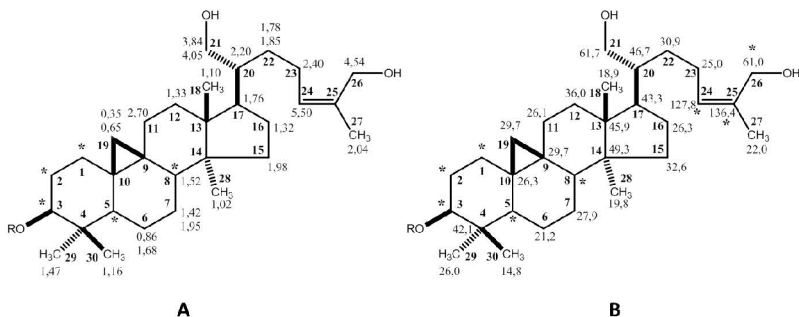
Tabela 15 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN e HSQC (300 MHz / 75 MHz) para a saponina PqS1 e comparação com os valores de ^{13}C RMN para o quadrangulosídeo, ambos em piridina- d_5 .

C	PqS1 (δ_{H})	PqS1 (δ_{C})	quadrangulosídeo*	
			(δ_{C})	(δ_{H})
1	3,73 (br s)	72,4	32,3	†
2	2,19(m); 2,81(dd, $J=3,6; 13,7$)	37,8	30,2	†
3	4,40 (m)	85,1	88,9	3,58
4	-	42,1	41,4	-
5	2,47	40,4	47,6	†
6	0,86; 1,68	21,2	21,3	†
7	1,42; 1,95	27,9	27,9	†
8	1,52	48,5	47,6	†
9	-	20,2	20,1	-
10	-	26,3	26,4	-

11	2,70	26,1	26,4	†
12	1,33	36,0	35,9	†
13	-	45,9	45,6	-
14	-	49,3	49,1	-
15	1,78; 1,98	32,6	32,4	†
16	1,32	26,3	26,7	†
17	1,76	43,3	43,1	†
18	1,10 (s)	18,9	18,8	1,03 (s)
19	0,35 (d, J=4,0); 0,65 (d, J=4,0)	29,7	30,0	0,20; 0,45
20	2,20	46,7	46,8	†
21	3,84; 4,05	61,7	61,8	3,82; 4,05
22	1,78; 1,85	30,9	30,9	†
23	2,40	25,0	25,2	†
24	5,50	127,8	131,3	†
25	-	136,4	132,0	-
26	4,54	61,0	67,8	4,55
27	2,04	22,0	22,3	1,93 (s)
28	1,02 (s)	19,8	19,9	0,90 (s)
29	1,47	26,0	25,9	1,27 (s)
30	1,16	14,8	15,6	1,07 (s)
1°	5,00 (d, J=7,8)	106,9	106,9	†
2°	4,08 (t, J=8,0)	75,9	75,7	†
3°	3,84 (m)	78,0	78,4	†
4°	4,28 (d, J=8,5)	71,5	71,7	†
5°	4,22 (t, J=8,5)	78,7	77,2	†
6°	4,40; 4,44	62,7	70,0	†

*: Reginatto e colaboradores (2001). †: Dados não constam na literatura consultada.

Figura 82 - Valores atribuídos inicialmente a alguns hidrogênios (A) e carbonos (B) da agliconas da saponina PqS1[†].



[†]: atribuições por meio da comparação com o espectro do quadrangulosídeo e análise dos espectros bidimensionais HSQC, COSY e HMBC. *: posições com valores distintos aos observados para o quadrangulosídeo.

O posicionamento das metilas e caracterização de alguns carbonos quaternários vizinhos a esses grupamentos foram confirmados por correlação a longa distância (HMBC), conforme demonstrado na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Correlações observadas dos grupamentos metilas, no espectro HMBC, em piridina-*d*₃, da saponina PqS1.

δ_H (metilas)	δ_C
1,10 (C-18)	32,6 (C-15), 45,9 (C-13), 49,3 (C-14)
2,04 (C-27)	61,0 (C-26), 127,8 (C-24), 136,4 (C-25)
1,02 (C-28)	19,8 (C-12), 49,3 (C-14), 45,9 (C-13)
1,47 (C-29)	14,8 (C-30), 85,1 (C-3), 42,1 (C-4), 21,2 (C-6)
1,16 (C-30)	85,1 (C-3), 42,1 (C-4), 26,3 (C-10)

Para algumas posições, no entanto, os valores de deslocamento químico observados não correspondem aos valores do quadrangulosídeo, em especial para carbonos e hidrogênios dos anéis A e B (**Figura 82**), indicando que poderia haver alguma diferença nesta parte da estrutura. Para realizar essas atribuições foram realizadas análises detalhadas considerando as correlações dos espectros de HMBC e COSY.

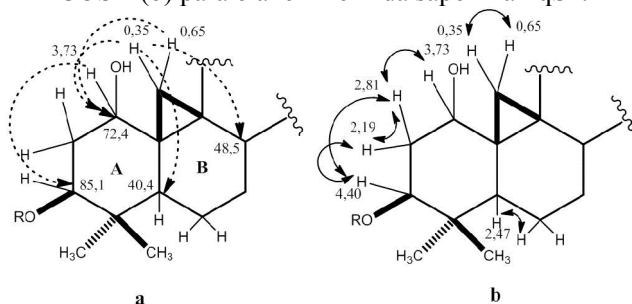
No espectro HMBC foi possível observar correlação dos hidrogênios em δ_H 0,35 e δ_H 0,65 (H-19a e H-19b, respectivamente) com um carbono em δ_C 72,4, de valor condizente a um grupo metino ligado a oxigênio (δ_C 72,4 \leftrightarrow δ_H 3,73, s) (**Figura 83**). Esse hidrogênio em δ_H 3,73, por sua vez, apresentava correlação por COSY com hidrogênio de valor δ_H 2,81, correspondente a grupo metileno (δ_C 37,8 \leftrightarrow δ_H 2,81 dd e 2,19 m), cujos hidrogênios apresentam correlação por COSY entre si e também com um quarto hidrogênio em δ_H 4,40.

A correlação do hidrogênio δ_H 4,40 por HSQC indica um grupamento metino ligado a oxigênio (δ_C 85,1 \leftrightarrow δ_H 4,40, m). Esse carbono, por sua vez, possui correlação de longa distância (HMBC) com o hidrogênio δ_H 3,73 (s), citado anteriormente. Desse modo, foi possível atribuir o grupo $-\text{CH}<$ (δ_C 85,1 \leftrightarrow δ_H 4,40) ao carbono C-3, o grupo $-\text{CH}_2-$ (δ_C 37,8 \leftrightarrow δ_H 2,81 e 2,19) ao carbono C-2 e o grupo $-\text{CH}<$ (δ_C 72,4 \leftrightarrow δ_H 3,73) ao carbono C-1.

A partir dessa observação é possível sugerir a presença de um grupamento hidroxila em C-1, o que justificaria os deslocamentos químicos para campo mais desblindados observados para os carbonos e hidrogênios em C-1 e C-2, quando comparados aos valores descritos para o quadrangulosídeo (**Tabela 16**).

Também relevante é o deslocamento observado para o carbono C-5, de δ_C 47,6 para o quadrangulosídeo e de δ_C 40,4 para PqS1. Um deslocamento dessa ordem é explicável pelo efeito gama gerado pela presença de uma hidroxila no carbono C-1 ou ainda no carbono C-7. No entanto, a presença de grupo $-\text{OH}$ em C-7 afetaria de forma significativa também o deslocamento químico do carbono C-4, o que não é observado.

Figura 83 - Correlações C-H observadas no espectro de correlação HMBC (a) e correlações H-H observadas no espectro de correlação COSY (b) para o anel A e B da saponina PqS1.



De modo geral, são descritas na literatura saponinas com hidroxilas nas posições C-1, C-3, C-6, C-16 (BOMBARDELLI et al., 1975; FACUNDO et al., 1993; VEROTTA et al., 1997; AHMAD et al., 1998). Não só a presença da hidroxila, mas também a estereoquímica do grupo –OH pode afetar diferentemente os valores dos deslocamentos químicos dos átomos vizinhos.

Esse efeito foi demonstrado por Verotta e colaboradores (1997), cuja hidroxila, na posição C-6, afeta distintamente os valores de deslocamento dos hidrogênios e carbonos vizinhos, quando em orientação α ou β . Esse efeito é claramente observado nos valores para H-19a e H-19b, a três ligações de distância (γ), e cujos sinais no espectro de ^1H RMN são de valor diagnóstico para essa agliconas (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN para os hidrogênios geminais do grupo ciclopropano (C-19) da saponina PqS1, quando avaliada a orientação da hidroxila.

	3β,6,16β-trihidroxi-9,19-ciclolanost-24-ene-3β,16β-diglicopiranosídeo*			
	PqS1		PqS1	
	H-19a	H-19b	H-19a	H-19b
6-OHα	0,21	0,45	0,35	0,65
6-OHβ	0,42	1,46		

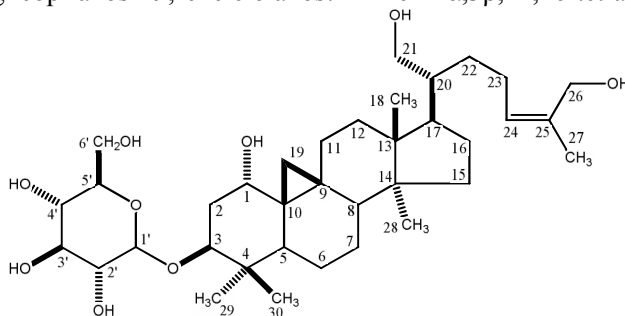
Referência: *Verotta e colaboradores (1997).

Por meio dessa comparação, os valores de deslocamento de PqS1, conforme apresentados na **Tabela 17**, em δ_{H} 0,35 (H-19a) e δ_{H} 0,65 (H-19b), indicam que a hidroxila em C-1 estaria em posição α , com H-1 β . Análises complementares, especialmente espectros de correlação NOESY, serão realizados para confirmação da configuração do C-1.

Finalizando, uma vez identificada a unidade glicosídica e a porção aglicona, foi definida a posição de união entre a glicose e o núcleo cicloartano. A análise do espectro HMBC indicou correlação entre o hidrogênio H-1' da glicose com o carbono C-3 (δ_{H} 5,00 \leftrightarrow δ_{C} 85,1), indicando ser essa posição da ligação açúcar-aglicona.

O conjunto de dados obtidos para esse composto, permitiu elucidar a estrutura da saponina PqS1 como sendo 3-O- β -D-glicopiranosil-9,19-ciclolanost-24Z-en-1 α ,3 β ,21,26-tetraol (**Figura 84**), saponina ainda não descrita na literatura.

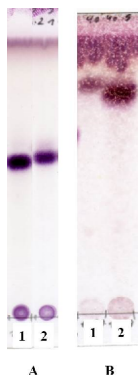
Figura 84 - Estrutura proposta para a saponina PqS1: 3-O- β -D-glicopiranosil-9,19-ciclanost-24Z-en-1 α ,3 β ,21,26-tetraol



4.4.2 Análise da substância PqS2

Análises por CCD em diversos sistemas cromatográficos (**Figura 85**), as substâncias PqS1 e PqS2 apresentam R_f's muito próximos, não sendo claramente distinguíveis por essa técnica. Esses dados revelam que essas substâncias possuam grande similaridade em relação à polaridade.

Figura 85 - Cromatograma em camada delgada das saponinas PqS1 e PqS2, em diferentes sistemas cromatográficos.



1: PqS1; 2:PqS2

FE: gel de sílica F_{254nm}; FM: (A) acetato de etila:acetona:ácido acético:água (6:2:1:1, v/v/v/v); (B) clorofórmio:etanol:ácido acético (40:40:5, v/v/v); Detecção: anisaldeído sulfúrico/aquecimento.

Entretanto, em análises por CLAE em fase reversa, a separação desses compostos foi possível, o que permitiu inclusive o isolamento das mesmas por CLAE preparativo, a partir da mesma fração da qual se obteve PqS1. Da substância codificada como PqS2 foi obtida uma massa de 22,4 mg, na forma de pó amorfo, com coloração branca.

A totalidade da massa obtida dessa substância foi enviada para análises por RMN, para a qual foram obtidos os espectros de ^1H RMN, HSQC, HMBC, COSY e TOCSY.

De igual maneira que para a saponina PqS1, para a substância PqS2 não foi adquirido o espectros de ^{13}C RMN. Na ausência deste, a análise iniciou-se pelo espectro de ^1H RMN em conjunto com o espectro de correlação HSQC.

No que diz respeito aos sinais diagnósticos, o espectro de ^1H RMN da substância PqS2 (**Figura 86**) apresentou muitos sinais em comum com a saponina PqS1, indicando também tratar-se de uma saponina. Foi observado o mesmo número de simpletos característicos de grupamento metila que para a saponina anteriormente elucidada. Juntamente com as análises do espectro de HSQC (**Figura 87**), foi possível atribuir a essas metilas, os valores de deslocamento de seus hidrogênios e carbonos ($\delta_{\text{C}} 21,0 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 1,04$; $\delta_{\text{C}} 20,4 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 1,12$; $\delta_{\text{C}} 16,7 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 1,12$; $\delta_{\text{C}} 27,0 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 1,37$ e $\delta_{\text{C}} 23,2 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 2,04$). Também se verifica a presença de sinais desblindados atribuíveis a um hidrogênio olefínico ($\delta_{\text{C}} 129,1 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 5,50$, t, $J=6.8$) e a hidrogênio e carbono anomérico ($\delta_{\text{C}} 108,0 \leftrightarrow \delta_{\text{H}} 5,01$, d, $J=7,7$).

Entretanto observa-se uma diferença significativa no que diz respeito aos sinais de hidrogênios geminais blindados referentes ao ciclopropano. Diferentemente de PqS1, na qual ocorrem dupletos em $\delta_{\text{H}} 0,35$ e $\delta_{\text{H}} 0,65$, no espectro de ^1H RMN de PqS2 é possível observar apenas um sinal com essa blindagem, em $\delta_{\text{H}} 0,50$ (d, $J=3,6$), para o qual o espectro HSQC indica correlação com o carbono de valor $\delta_{\text{C}} 24,8$, o qual também se correlaciona a um segundo hidrogênio, de valor $\delta_{\text{H}} 1,50$ (d, $J=3,6$). Esses dados sugerem um grupamento ciclopropano, contudo, afetados eletronicamente de maneira distinta aos hidrogênios H-19a e H-19b de PqS1.

Assim sendo, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios e seus respectivos carbonos, foram analisados de modo comparativo aos estabelecidos para PqS1, conforme apresentado na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN e HSQC da saponina PqS2, em piridina *d*-5, comparativamente aos observados para PqS1 (75 MHz).

C	PqS2 (δ_{H})	PqS2 (δ_{C})	PqS1 (δ_{H})	PqS1 (δ_{C})
1	4,05	70,4	3,73	72,4
2	2,29; 3,07	43,2	2,19; 2,81	37,8
3	3,67	87,4	4,41	85,1
4	-	42,1	-	42,1
5	1,32	46,4	2,47	40,4
6	0,86; 1,70	23,2	0,86; 1,68	21,2
7	1,40; 1,97	29,0	1,42; 1,95	27,9
8	1,51	51,8	1,52	48,5
9	-	20,2	-	20,2
10	-	26,9	-	26,3
11	2,68	25,6	2,70	26,1
12	1,37	37,6	1,33	36,0
13	-	46,2	-	45,9
14	-	50,3	-	49,3
15	1,78; 1,98	34,4	1,78; 1,98	32,6
16	1,12	27,8	1,32	26,3
17	1,75	44,6	1,76	43,3
18	1,12	20,4	1,10	18,9
19	0,50 (<i>d</i> , $J=3,6$); 1,50 (<i>d</i> , $J=3,6$)	24,8	0,35; 0,65	29,7
20	2,20	46,7	2,20	46,7
21	3,82; 4,05	62,6	3,84; 4,05	61,7
22	1,78; 1,85	32,0	1,78; 1,85	30,9
23	2,40	26,0	2,40	25,0
24	5,50	129,1	5,50	127,8
25	-	137,2	-	136,4
26	4,54	61,0	4,54	61,0
27	2,04	23,2	2,04	22,0

28	1,04	21,0	1,02	19,8
29	1,37	27,0	1,47	26,0
30	1,12	16,7	1,16	14,8
1'	5,01 (d, $J=7,7$)	108,0	5,00 (d, $J=7,8$)	106,9
2'	4,04 (t, $J=6,8$)	76,7	4,08 (t, $J=8,0$)	75,9
3'	3,98	79,5	3,84 (m)	78,0
4'	4,26	72,8	4,28 (d, $J=8,5$)	71,5
5'	4,27	79,9	4,22 (t, $J=8,5$)	78,7
6'	4,38; 4,49	64,0	4,40; 4,44	62,7

Entretanto, para algumas posições, em especial para carbonos e hidrogênios dos anéis A e B, os valores de deslocamento químico observados para a saponina PqS2 não correspondem aos valores descritos tanto para PqS1 quanto para o quadrangulosídeo, o que indica alguma característica distinta nesta parte da molécula.

Assim sendo, por meio das análises do espectro de HMBC (**Figuras 88**) juntamente com o espectro de COSY (**Figura 89**), foram avaliados os valores de deslocamento químicos para a atribuição da posição dos hidrogênios e carbonos do anel A e B, conforme demonstrado na **Figura 90**.

Figura 86 - Espectro de ^1H RMN da saponina PqS2 (piridina- d_5 ; 300 MHz)

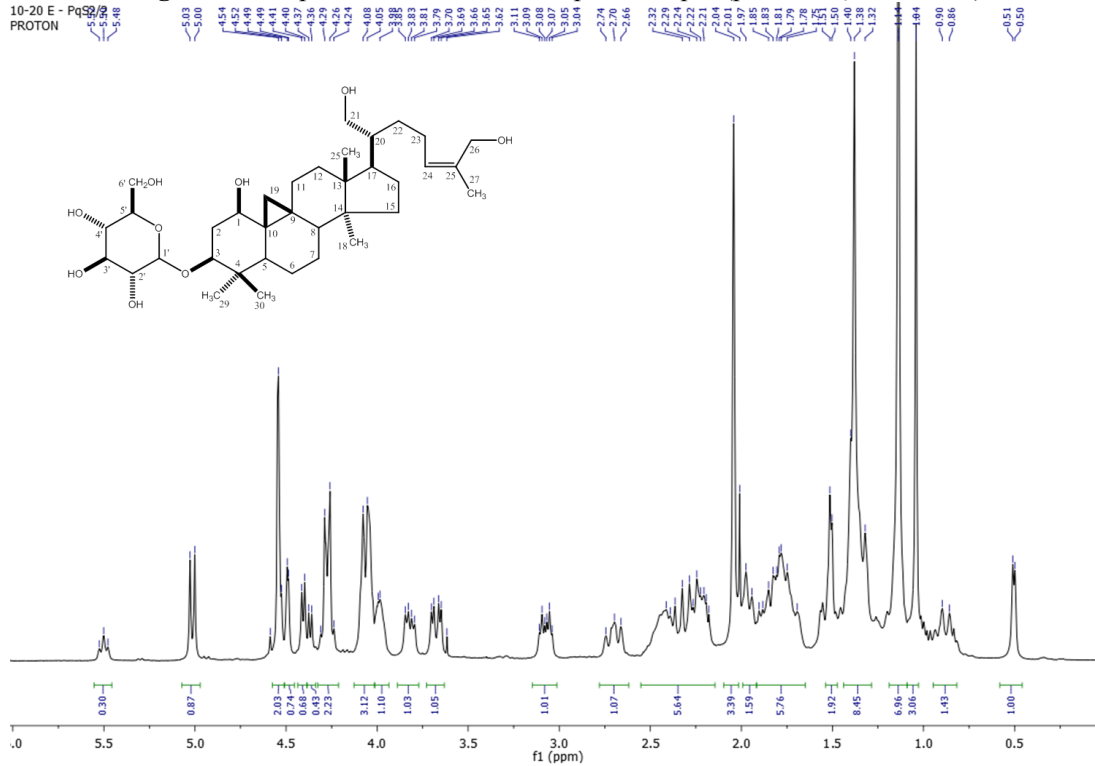


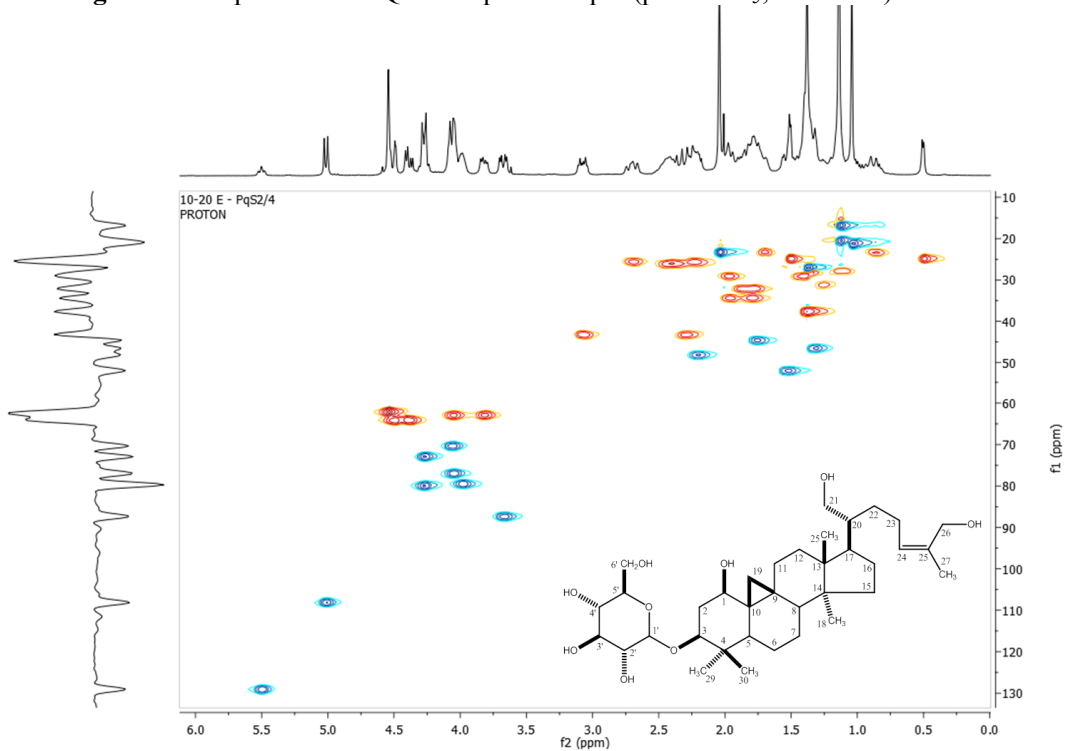
Figura 87 - Espectro de HSQC da saponina PqS2 (piridina- d_5 ; 300 MHz)

Figura 88 - Espectro de HMBC da saponina PqS2 (piridina- d_5 ; 300 MHz)

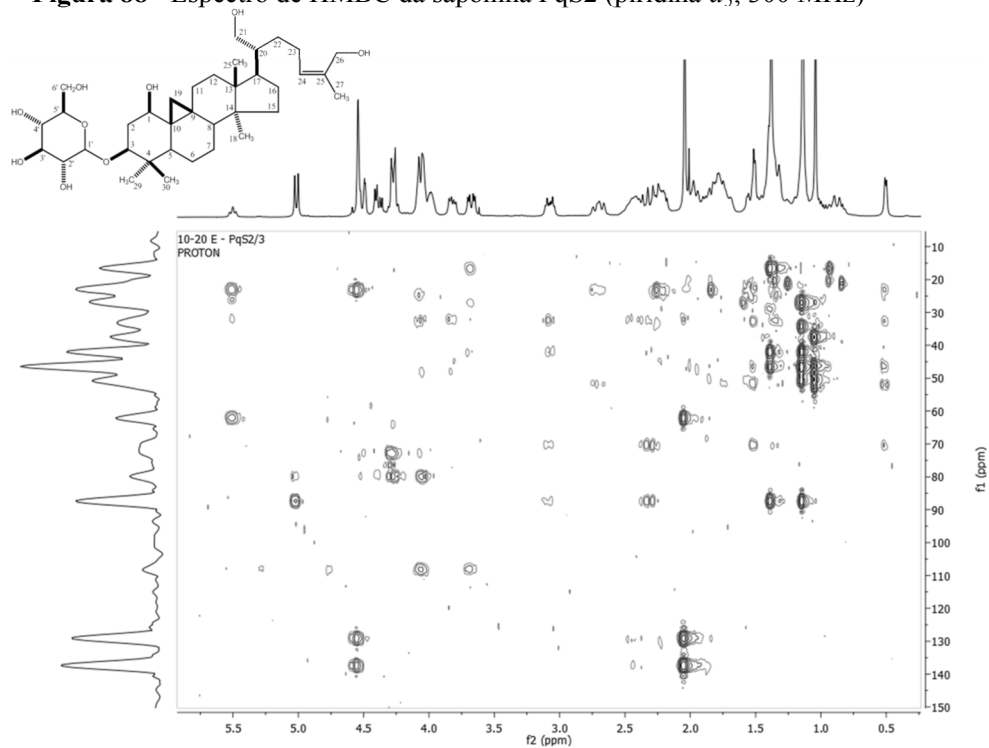


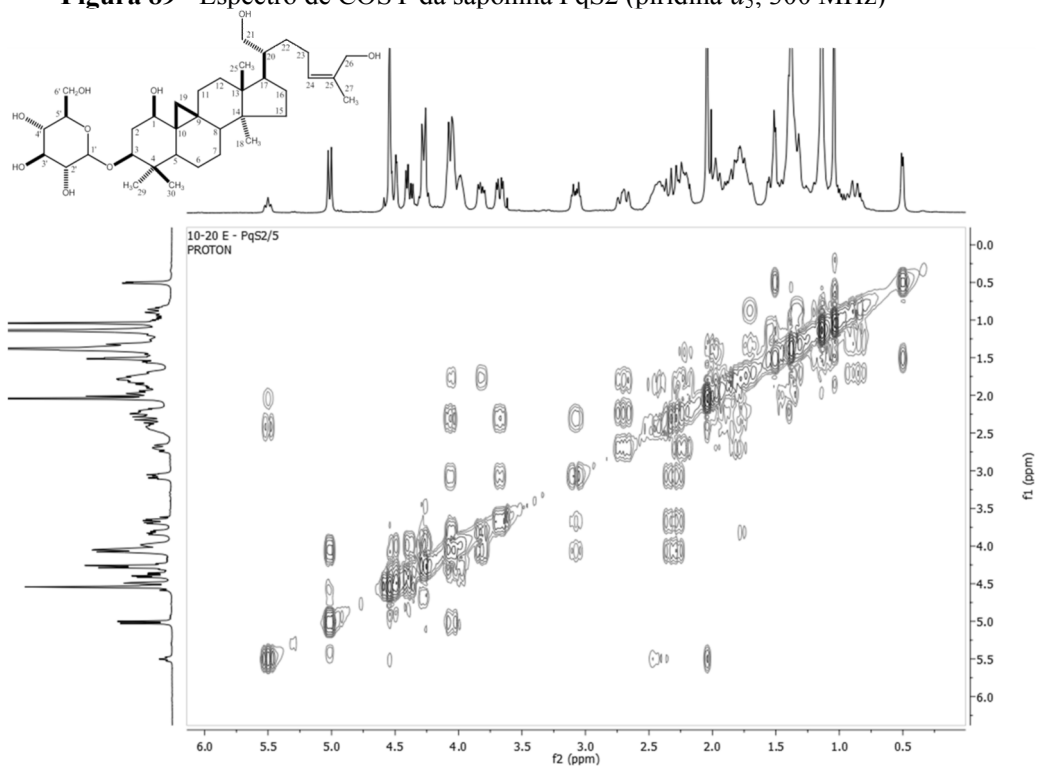
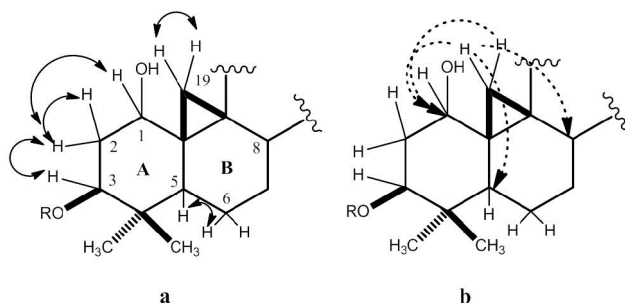
Figura 89 - Espectro de COSY da saponina PqS2 (piridina- d_5 ; 300 MHz)

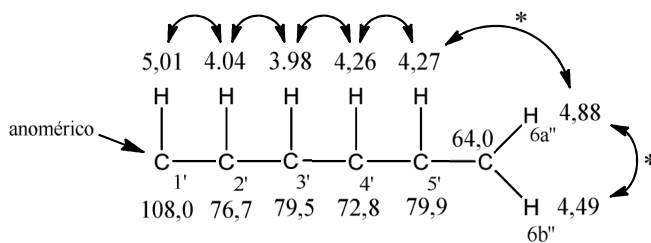
Figura 90 - Correlações H-H observadas no espectro de correlação COSY (a) e correlações C-H observadas no espectro de correlação HMBC (b) para o anel A e B da saponina PqS2.



Da mesma maneira que para a primeira saponina apresentada, à saponina PqS2 foram atribuídos os grupamentos metino ligado a oxigênio aos carbonos C-1 (δ_C 70,4 \leftrightarrow δ_H 4,05) e C-3 (δ_C 87,4 \leftrightarrow δ_H 3,67). Através de correlação observada por HMBC, foi possível identificar a ligação açúcar-aglicona entre o carbono C-3 e o hidrogênio anomérico da glicose H-1'' (δ_H 5,00 \leftrightarrow δ_C 85,1).

A partir da análise do espectro de correlação COSY foi possível caracterizar, a partir do hidrogênio anomérico, a sequência dos hidrogênios referentes a unidade de açúcar, sendo também identificada como glicose (**Figura 91**). O espectro de TOCSY confirmou os hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema acoplado de spin, compondo assim a unidade glicosídica.

Figura 91 - Sequencia de hidrogênios determinados por meio das correlações observadas no espectro COSY para a glicose da saponina PqS2.



*Correlações não claramente observadas.

Em relação a posição C-1, os valores de deslocamento do carbono e hidrogênio, ainda que também sejam coerentes quanto a presença de uma hidroxila, diferem dos valores observados para PqS1. Conforme já discutido na elucidação da saponina anterior, a presença de uma hidroxila em C-1 afeta diretamente os valores de hidrogênios e carbonos próximos. Assim como apresentado na **Tabela 19**, a posição dessa hidroxila pode vir a influenciar diferentemente os valores de deslocamento químico, quando esta se encontra em orientação α ou β .

Tabela 19 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H RMN para os hidrogênios geminais do grupo ciclopropano (C-19) da saponina PqS2, quando avaliada a orientação da hidroxila.

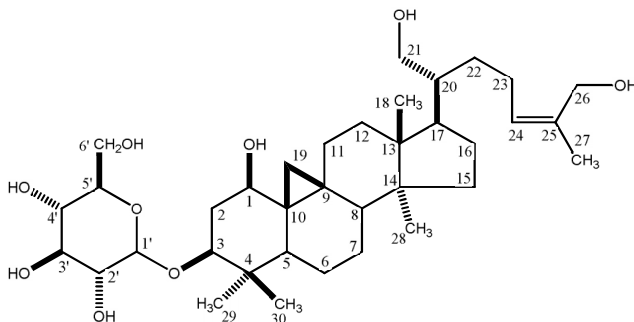
	3β,6,16β-trihidroxil-9,19-ciclolanost-24-ene-3β,16β-diglicopiranosídeo*		PqS1		PqS2	
	H-19a	H-19b	H-19a	H-19b	H-19a	H-19b
6-OHα	0,21	0,45	0,35	0,65		
6-OHβ	0,42	1,46			0,50	1,50

Referência: *Verotta e colaboradores (1997).

Nesse sentido, por meio da comparação dos valores dos hidrogênios da posição C-19 da saponina PqS1 (δ_{H} 0.35 e 0.65), cuja hidroxila em C-1 foi proposta como sendo α , com os valores observados para os mesmo hidrogênios em PqS2 (δ_{H} 0.50 e 1.50) e com os dados da literatura, é proposto que a hidroxila presente em C-1 esteja em orientação β . Essa diferença isomérica justificaria ainda algumas alterações nos valores de deslocamento químicos dos demais hidrogênios e carbonos do anel A (**Tabela 17**).

O conjunto de dados obtidos para esse composto, permitiu elucidar a estrutura da saponina PqS1 como sendo 9,19-ciclolanost-24Z-en-1 β ,3 β ,21,26-tetrahidroxil-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Figura 92**), saponina também inédita na literatura.

Figura 92 - Estrutura proposta para a saponina PqS2: 3-O-β-D-glicopiranosil-1β,3β,21,26-tetrahidroxi-9,19-ciclolanost-24Z-eno



4.4.3 Análise da substância PqS3

A substância foi isolada e purificada por CLAE preparativo, resultando em 8,7 mg de substância pura, na forma de pó amorfo, de coloração branca amarelada. As análises por CCD da substância isolada, além de indicar o grau de pureza, mostraram que a substância apresenta características mais polares que as saponinas isoladas anteriormente, assim como também difere em sua coloração, com cor rosa quando revelada com anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento (**Figura 76**).

A totalidade da massa obtida dessa substância foi enviada para análises por RMN, para a qual foram obtidos os espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN, HSQC e HMBC. A partir da interpretação dos dados espectroscópicos, juntamente com análise comparativa a dados da literatura, foi possível identificar a substância PqS3.

O espectro de ^{13}C RMN (**Figura 93**) apresentou 39 sinais, embora fossem observadas possíveis sobreposições de sinais. Analisando mais detalhadamente o espectro, é possível identificar a presença de sete metilas (δ_{C} 28,6, δ 15,8, δ 17,2, δ 17,8, δ 26,5, δ 33,7, δ 24,2), o que sugere tratar-se de uma estrutura triterpênica.

A partir da observação de alguns sinais diagnósticos característicos, foi possível confirmar o ácido oleanólico como aglicona. Os valores de δ_{C} 122,7 e 145,5, correspondentes aos carbonos C-12 e C-13 indicam a insaturação presente nesta posição em núcleo oleanólico. Os valores de deslocamento para esses carbonos permitem inclusive a distinção entre núcleos oleanólicos e ursólicos, cuja desblindagem, de

aproximadamente 5 ppm espectro de RMN de ^{13}C entre as séries urs-12-eno e olean-12-eno, ocorre devido ao efeito estérico gama gerado pela presença de um grupamento metila em C-19 α na série urs-12-eno, conforme apresentado na **Tabela 20**.

Tabela 20 - Comparação entre núcleo urseno e oleaneno para a posição C-12 e C-13 com dados da literatura.

	Núcleo urseno (δ_{C})		Núcleo oleaneno (δ_{C})	
	C-12	C-13	C-12	C-13
Urseno e oleaneno*	124	140	122	145
PqS3			122.7	145.5

Referência: *Mahato; Kundu (1994)

A absorção esperada correspondente a carboxila no carbono C-28, característica do ácido oleanólico, não foi observada em nenhum dos espectros adquiridos para a saponina PqS3, possivelmente por tratar-se de um carbono quaternário. Entretanto, a comparação do valor do carbono C-17 observada para a saponina isolada, em comparação com o valor descrito deste carbono para o ácido oleanólico, pode ser usado como indicativo da presença deste grupo químico nesta posição (**Tabela 21**).

Adicionalmente, o sinal em δ_{C} 89,3, correspondente ao carbono C-3 da aglicona indica ligação glicosídica do tipo éter na hidroxila deste carbono, uma vez que a absorção de C-3 do ácido oleanólico livre apresenta uma diferença de cerca de 11 ppm para campo mais blindado (**Tabela 21**).

Figura 93 - Espectro de ^{13}C RMN da saponina PqS3 (piridina- d_5 ; 75 MHz).

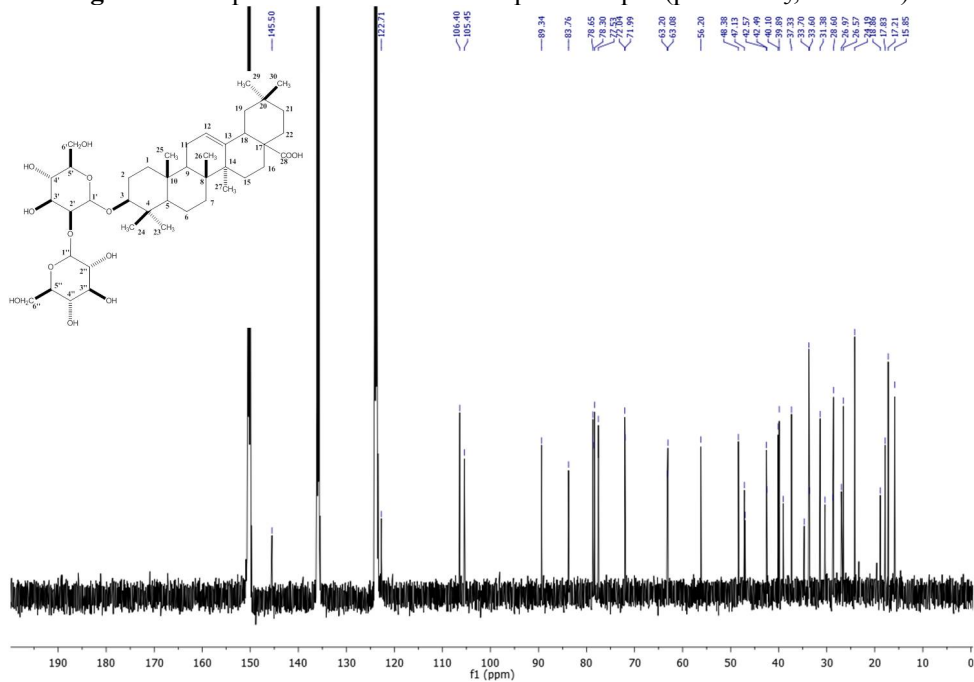


Tabela 21 - Deslocamentos químicos de ^{13}C RMN do ácido oleanólico e da saponina PqS3, para as posições C-3 e C-17.

	Ácido oleanólico*	PqS3
C-3	78,0	89,3
C-17	46,6	47,1

Referência: *Hidaka e colaboradores (1987)

Embora para *P. quadrangularis* até o momento tenham sido descritas predominantemente saponinas de núcleo do tipo cicloartano (conforme já apresentado no **Capítulo 1**) (BOMBARDELLI et al., 1975; ORSINI et al., 1986; SAKALEM et al., 2013), ocorre apenas um relato de saponina de núcleo ácido oleanólico para esta espécie (ORSINI et al., 1987), substância que posteriormente também foi descrita para a espécie *P. alata* (REGINATTO et al., 2001).

Sendo assim, foram comparados os valores de deslocamento químico da saponina isolada PqS3 com a saponina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico, conforme apresentado na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Valores de deslocamento químico observados nos espectros de ^1H e ^{13}C RMN da saponina PqS3, em piridina *d*-5, em comparação com dados da literatura^A.

C	PqS3 (δ_{H})**	PqS3 (δ_{C})	3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico*	3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico [†]
1		39.0	38,7	38.7
2		26.9	26,6	26.6
3	3,30	89.3	88,9	89.0
4		39.8	39,7	39.5
5	0,74 (d, $J=11,3$)	56.2	55,8	55.8
6		18.8	18,4	18.5
7		‡	34,2	33.3
8		40.1	39,4	39.7
9	1,63 (t, $J=8,9$)	48.3	47,9	48.0

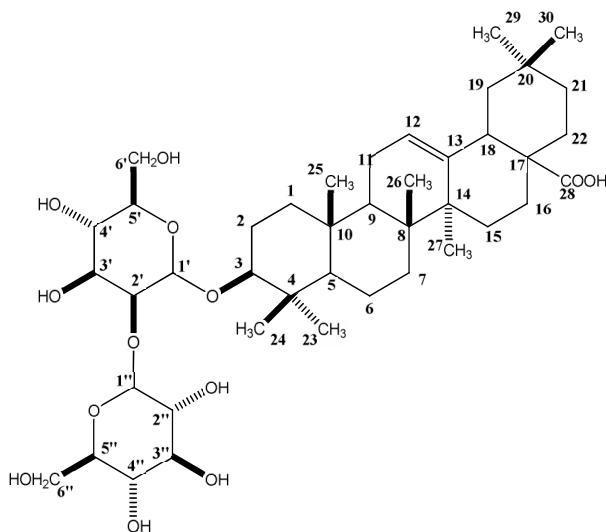
10		37.3	36,9	36.9
11		24.1	23,8	23.8
12	5,50 (t, J=3,3)	122.7	120,8	122.5
13		145.5	144,8	145.0
14		42.5	42,1	42.2
15		28.7	27,9	28.3
16		24.1	23,8	23.8
17		47.1	46,6	46.7
18	3,35 (dd, J=14; 4)	42.5	42,1	42.0
19	1,84 (t, J=14)	47.0	46,6	46.5
20		31.3	30,9	31.0
21		34.7	33,2	34.3
22		‡	29,7	33.3
23	1,31 (s)	28.6	28,2	28.2
24	0,84 (s)	15.8	15,4	15.5
25	1,12 (s)	17.2	16,8	16.8
26	1,01 (s)	17.8	17,4	17.4
27	1,32 (s)	26.5	26,1	26.2
28		‡	-	180.4
29	0,97 (s)	33.7	33,2	33.2
30	1,03 (s)	24.2	23,8	23.8
1'	4,94 (d, J=7,6)	105.4	104,1	105.1
2'	4,26 (m)	83.7	83,2	83.4
3'		78.4	77,7	78.0
4'		72.0	71,6	71.7
5'		78.7	78,2	78.4
6'		63.2	62,7	62.8
1''	5,40 (d, J=7,6)	106.4	105,8	106.0
2''		77.5	76,8	77.1
3''		78.3	77,9	77.9
4''		72.0	71,5	71.7
5''		78.6	77,7	78.3

Referências: *:(ORSINI et al., 1987); †: (REGINATTO et al., 2001).

^A: piridina-*d*₅; ‡: valores não observados; **: apenas alguns valores δ_H são apresentados.

Dessa forma, foi possível identificar a saponina PqS3 como sendo 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico (**Figura 94**), saponina já descrita para as folhas de *P. quadrangularis* e folhas de *P. alata*.

Figura 94 - Estrutura da saponina PqS3: 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico.



4.5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, foi possível concluir que:

- O extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis* apresentou diversidade de saponinas, com características distintas de polaridade e e do caráter ácido dessas substâncias;
- A partir da fração acetato de etila das folhas de *P. quadrangularis* foram isoladas três saponinas: 3-*O*- β -D-glicopiranosil-1 α ,3 β ,21,26-tetrahydroxi-9,19-ciclolanost-24Z-eno (**PqS1**), 3-*O*- β -D-glicopiranosil-1 β ,3 β ,21,26-tetrahydroxi-

9,19-ciclolanost-24Z-eno (**PqS2**), as duas descritas pela primeira vez na literatura, e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico (**PqS3**).

CAPÍTULO 5 - Análises comparativas entre *P. alata* e *P. quadrangularis*

5.1 INTRODUÇÃO

P. alata e *P. quadrangularis* possuem grande semelhança morfológica, especialmente nas suas folhas e flores, o que dificulta sua diferenciação, no entanto, apresentam frutos que podem ser diferenciados em relação ao seu tamanho e cor. Para *P. quadrangularis*, os frutos são maiores e de coloração mais esverdeada, quando comparada aos frutos pequenos e de coloração amarelada de *P. alata*. Outro fator que não é comum para estas espécies é o local de ocorrência. *P. alata* ocorre especialmente no Sudeste e Sul do Brasil, que apresentam clima predominantemente subtropical, enquanto que *P. quadrangularis* ocorre em zonas tropicais da América do Sul, como o Norte e Nordeste do Brasil, Colômbia e Equador (PIO CORRÊA, 1978; MORS et al., 2000 CARDOSO et al., 2011).

Considerando a grande semelhança morfológica, adicionalmente ao uso popular dessas espécies como plantas medicinais e o uso como matéria prima em fitomedicamentos, é necessário uma análise química comparativa entre as espécies, com o objetivo de diferenciar as espécies e contribuir para o controle de qualidade do material vegetal.

Birk e colaboradores (2005) sugerem saponinas como marcadores químicos para espécies de *Passiflora*, uma vez que o quadrangulosídeo foi identificado apenas em *P. alata*, comparativamente as demais espécies estudadas naquele trabalho. Contudo, a presença desta saponina em *P. alata* e a identificação de sua presença em *P. quadrangularis*, já descrita neste trabalho, não permitiria que este composto fosse usado na diferenciação química dessas duas espécies.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo, o qual descreve o isolamento da saponina majoritária das folhas de *P. alata* e também o isolamento do flavonoide majoritário das folhas de *P. quadrangularis*, para o uso desses como referencia para as análises qualitativas comparativas, a fim de serem utilizados como possíveis marcadores químicos para estas espécies.

5.2 OBJETIVO

- Realizar uma análise comparativa dos extratos aquosos das folhas de *P. alata* e *P. quadrangularis* por CLAE, sugerindo possíveis marcadores químicos que auxiliem na diferenciação química destas espécies.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A publicação exposta a seguir está apresentada conforme as normas da revista na qual foi publicada.

5.3.1 Publicação

Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn.

Geison M. Costa, Andressa C. Gazola, Fernanda A. Madógllo, Silvana M. Zucolotto, Flávio H. Reginatto, Leonardo Castellanos, Freddy A. Ramos, Carmenza Duque e Eloir P. Schenkel.

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.36, p.1697–1707, 2013.

(ISSN 1082-6076)

DOI:10.1080/10826076.2012.695316

VITEXIN DERIVATIVES AS CHEMICAL MARKERS IN THE DIFFERENTIATION OF THE CLOSELY RELATED SPECIES *PASSIFLORA ALATA* CURTIS AND *PASSIFLORA QUADRANGULARIS* LINN

Geison M. Costa,^{1,3} Andressa C. Gazola,¹ Fernanda A. Madógllo,¹
Silvana M. Zucolotto,² Flávio H. Reginatto,¹ Leonardo Castellanos,³
Freddy A. Ramos,³ Carmenza Duque,³ and Eloir P. Schenkel¹

¹*Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil*

²*Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil*

³*Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia*

□ *The species of Passiflora are widely used in folk medicine as mild sedatives and tranquilizers. P. alata and P. quadrangularis are distributed throughout South America, with widespread occurrence in Brazil and Colombia. Due to the difficulty in making a botanical distinction between these species, especially in the absence of flowers and fruits, the use of chemical markers for these plants offer an alternative method of identification. This work describes the isolation and identification of the major flavonoids and saponins from the leaves of P. alata and P. quadrangularis, as well as rapid and efficient HPLC-DAD methods for comparison of these compounds in both species. Vitexin derivatives are proposed as chemical markers in the identification of P. alata and P. quadrangularis and the detection of adulterations in raw material.*

Keywords flavonoids, HPLC-DAD, HSCCC, *Passiflora alata*, *Passiflora quadrangularis*, quadranguloside

INTRODUCTION

The genus *Passiflora* is the largest and most important genus of the family Passifloraceae. The leaves of several species of this genus are traditionally used in various countries as sedatives or tranquilizers, and their fruits are used as edible fruits or in the preparation of juices.^[1,2] *P. alata*

Address correspondence to Geison Modesti Costa, Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, Brazil, 88040-900. E-mail: geison_costa@yahoo.com.br

and *P. quadrangularis* are widely used in South America. Their fruits are widely consumed, and infusions of their leaves are used in popular medicine.^[3-5] In Brazil, *P. alata* is described in the Farmacopeia Brasileira^[6] and is used in some pharmaceutical composed preparations, indicated as mild sedatives.^[7]

These species possess leaves with similar morphological characteristics that make their differentiation difficult. However, the occurrence of these species is reported for different locations and different climates. *P. alata* occurs mainly in the Southeast and South of Brazil, regions with a subtropical climate, and *P. quadrangularis* occurs mainly in tropical parts of South America, such as Colombia, Ecuador, and North and the Northeast of Brazil.^[1,4] Reports on the chemical composition describe flavonoids and saponins as major constituents for both species. Some of these compounds (e.g., quadrangulose) have been reported for both species.^[8-10]

Considering that these species are both used as medicinal plants, including in phytopreparations, and that they are closely related from a morphological point of view, analytical methodologies to differentiate between these species should contribute significantly to their quality control as a raw material. Thus, the aims of this work were to evaluate the flavonoid and saponin fingerprints of *P. alata* and *P. quadrangularis* by HPLC-DAD and to isolate, identify, and quantify compounds that can be used as chemical markers in the differentiation of these species.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

Ethyl acetate and butanol (p.a. grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and formic acid (HPLC-grade) were provided by Tedia (RJ, Brazil). Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA). All the solutions prepared for HPLC analyses were filtered through a 0.45- μm membrane before use. Vitexin-2''-O-rhamnoside was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA), and quadrangulose was provided by Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto.^[9]

Plant Material and Extraction

Leaves of *Passiflora alata* were collected in Nova Santa Rita, Rio Grande do Sul State, Brazil. Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Institute of Biological Sciences of the Universidade de Passo Fundo, and were identified by Prof. Branca Severo. Leaves of *Passiflora quadrangularis* were purchased from a Garden Center in the town of Gigante, Huila Department, Colombia. The identification was performed by Prof. Luis

Carlos Jimenez and a voucher specimen was deposited at the National Institute of Sciences of the Universidad Nacional de Colombia. The leaves of both species were air-dried at 35–40°C for 3 d, powdered, and extracted by infusion (plant:water, 1:10, *w/v*, 95°C) for 10 min. After cooling, the aqueous extracts were filtered and lyophilized.

Isolation

Part of the aqueous crude extract of *P. alata* (1 g) was submitted to medium pressure liquid chromatography (Sepacore Büchi), on silica gel (23 cm × 2.6 cm i.d.; silica 230–400 mesh) using *n*-butanol saturated with water as the mobile phase, with the flow kept constant at 10 mL/min; 150 fractions were collected; fractions 76–150 yielded pure compound **1** (31.4 mg).

Aqueous crude extract of *P. quadrangularis* was fractionated by high-speed counter-current chromatography (HSCCC) using a P. C. Inc. apparatus. For the preparative separation, a four-step gradient elution was selected based on previous TLC analysis, using EtOAc:BuOH:H₂O (1:X:1) system (solvent systems A–D, where X = 0.1, 0.5, 0.7, and 1.2, respectively). The aqueous phase of system A was used as the stationary phase, while the organic phases of systems A–D were used as the mobile phase in the tail-to-head mode, at a flow rate of 3 mL/min and 800 rpm. The extract (775 mg) was dissolved in 6 mL of a 1:1 mixture of both phases of system A and injected in the 400 mL coil (previously equilibrated with stationary and mobile phase of system A, V_S = 250 mL, S_F = 62.5%). Fractions of 9 mL were collected, giving a total of 90 fractions: solvent system A, tubes 1–12; solvent system B, tubes 13–39; solvent system C, tubes 40–65; and solvent system D, tubes 66–90. Fractions 33–41 were collected according to their TLC profile and purified on a Sephadex LH-20 column, using methanol as mobile phase. Fractions 10–14 from Sephadex column yielded pure compound **2** (35.4 mg).

Compound **2**: vitexin-2''-O-xyloside. ESI-MS (+70 V) *m/z* 563 [M-H]⁻. ¹H NMR (Bruker[®], 300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.36 (1H, t, *J* = 12.0, H-5'''), 2.78 (1H, t, *J* = 8.0, H-2'''), 2.87 (1H, t, *J* = 8.0, H-3'''), 2.93 (1H, m, H-5'''), 2.97 (1H, m, H-4'''), 3.28 (1H, m, H-5''), 3.46 (1H, H-4''), 3.49 (1H, H-3''), 3.58 (1H, H-6''), 3.75 (1H, H-6''), 3.88 (1H, d, *J* = 7.1, H-1'''), 4.06 (1H, t, *J* = 9.2, H-2''), 4.79 (1H, d, *J* = 10.0, H-1''), 6.24 (1H, s, H-6), 6.80 (1H, s, H-3), 6.90 (2H, d, *J* = 8.7, H-3', H-5'), 8.03 (2H, d, *J* = 8.7, H-2', H-6'), 13.15 (1H, s, OH-5). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 163.9 (C2), 102.5 (C3), 182.1 (C4), 160.6 (C5), 98.2 (C6), 162.8 (C7), 103.8 (C8), 156.7 (C9), 103.9 (C10), 121.7 (C1'), 129.0 (C2', C6'), 116.0 (C3', C5'), 161.3 (C4'), 71.6 (C1''), 80.9 (C2''), 78.4 (C3''), 70.2 (C4''), 81.9 (C5''), 61.0 (C6''), 105.9 (C1'''), 73.8 (C2'''), 75.7 (C3'''), 69.4 (C4'''), 65.6 (C5''').

HPLC Analysis

For the HPLC analysis, each extract was dissolved in methanol:water (5:5, *v/v*), filtered through a 0.45- μm membrane and 20 μL (flavonoids: 3 mg/mL; saponins: 5 mg/mL) of each sample was injected into the HPLC.

The HPLC analyses of the leaves from *P. quadrangularis* and *P. alata* were carried out in a PerkinElmer Series 200 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) system, equipped with Diode Array Detection (DAD), quaternary pump, on-line degasser and autosampler. The data were processed using the TotalChrom Workstation software. The chromatographic analyses were performed at room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) with the mobile phase prepared daily and degassed by sonication (10 min) before use. The UV spectra were monitored over a range of 400 to 190 nm. For analysis of the flavonoids, a Vertical VertSep C₁₈ column (250 \times 4.6 mm i.d.; 5 μm) was used, with a gradient system of acetonitrile (solvent A) and formic acid 0.5% (solvent B), in a single step: 15–35% A (0–15 min). The flow rate was kept constant at 1.2 mL/min and the chromatograms were recorded at 340 nm. Analysis of saponins was carried out in a Phenomenex Bondclone phenyl column (300 \times 3.9 mm i.d.; 10 μm) with a gradient system of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) as follows: 29% A (0–10 min), 29–35% A (10–40 min), with flow rate at 1.2 mL/min and detection at 205 nm.

The analyses by LC-MS were carried out using a Shimadzu LC-10A coupled to a selective mass detector (LCMS-2010EV). Electrospray ion source (ESI)-MS spectra were acquired in negative ion mode, and the interface and MS detector parameters were as follows: detector voltage, 1.5 kV; CDL voltage, 150 V, CDL temperature, 250°C; heat block temperature, 250°C; QarrayRF voltage, 150 V and nitrogen as nebulizing gas, at a flow of 1 L/min. The chromatographic conditions were the same as those used in the HPLC-DAD analysis.

The major flavonoid from *P. alata* aqueous extract was quantified through a vitexin-2''-O-rhamnoside calibration curve with eight points, in a concentration range of between 2.5 to 200.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, whereas the major flavonoid from *P. quadrangularis* aqueous extract was quantified by a vitexin-2''-O-xyloside calibration curve with nine points, in a concentration range of between 1.0 to 200.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. All the standard solutions were analyzed in triplicate, and the peak average areas measured.

Validation of Analytical Procedures

The validated parameters were specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), and limit of quantification (LOQ). All the analytical procedures were performed according to ICH guidelines.^[11]

RESULTS AND DISCUSSION

Saponin Analysis

HPLC analysis of saponins of the aqueous extracts of both species (Figure 1) showed similar qualitative profiles at 205 nm, with a major compound in both species presenting the same chromatographic characteristics. This substance was isolated from *P. alata* crude aqueous extract, according to the methodology previously reported,^[9] with minor modifications, including the use of medium pressure liquid chromatography. An amount of 31 mg of pure compound **1** was obtained, identified by comparison with an authentic sample as quadranguloside (Figure 2), a saponin previously reported for *P. quadrangularis*^[8] and *P. alata*.^[9,10,12,13] However, the first report of quadranguloside was from a leaf extract of *P. quadrangularis*^[8] obtained from a plant material that the authors describe as having been collected in Curitiba, Brazil, a region for which the occurrence of *P. quadrangularis* has not been previously documented and which is also not characteristic for this species, although it has been documented for *P. alata*.^[4]

Previous HPLC analysis of *P. alata* showed that quadranguloside is the major saponin from the leaves of this species^[12] whereas for *P. quadrangularis*, there are no reports on HPLC analysis of the saponin profile. Birk and co-workers^[13] suggested saponins as quality markers for *Passiflora* species, as quadranguloside was identified in *P. alata*, despite the other species analyzed. However, the presence of this compound as the major saponin in both *P. alata* and *P. quadrangularis* means that this substance cannot be used to differentiate these two species.

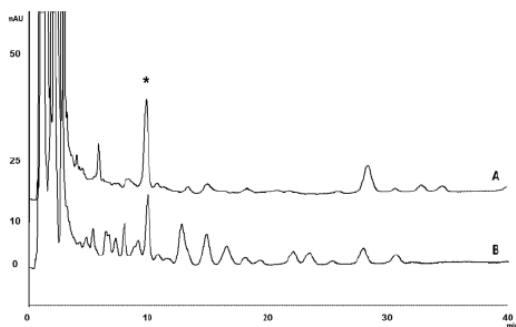


FIGURE 1 HPLC-DAD fingerprint of crude aqueous extracts of *P. alata* (A) and *P. quadrangularis* (B) leaves at 205 nm. *: quadranguloside. For chromatographic conditions, see the Experimental section.

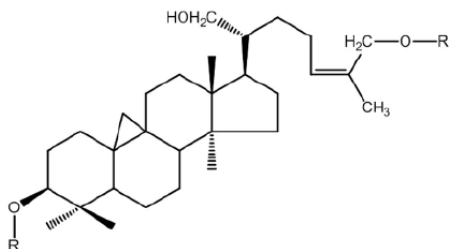


FIGURE 2 The structure of quadranguloside (R = gentiobiose).

The HPLC fingerprint at 205 nm also points to the presence of different minor constituents between these species, which could be saponins. Investigation of these minor saponins is currently in progress by our research group.

Flavonoid Analysis

The HPLC analysis of the extracts (Figure 3) showed a relatively simple pattern of flavonoids. Both extracts displayed one major peak, with similar retention time and identical UV spectra, suggesting an apigenin derivative (λ_{max} 269, 335 nm), but presenting different masses (m/z 578 for the *P. alata* major component and m/z 564 for the *P. quadrangularis* major component). Co-injection of both extracts showed that the major flavonoid in each species was different, as a double peak was observed, with retention times of

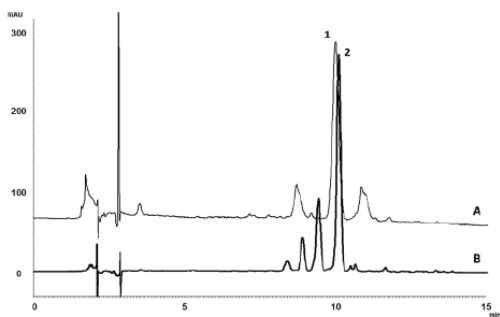


FIGURE 3 HPLC-DAD fingerprint of crude aqueous extracts of *P. alata* (A) and *P. quadrangularis* (B) leaves at 340 nm. 1: vitexin-2''-O-rhamnoside; 2: vitexin-2''-O-xyloside. For chromatographic conditions, see the Materials and Methods section.

10.0 and 10.2 min. Co-injection with reference standard led to the identification of vitexin-2''-*O*-rhamnoside as the major flavonoid from *P. alata*, while the major flavonoid from *P. quadrangularis* (Compound **2**) was isolated and identified as discussed in the following section (Figure 4).

Compound **2** was isolated from *P. quadrangularis* crude aqueous extract using two chromatographic procedures. The first was high-speed counter-current chromatography (HSCCC), using a gradient elution approach with a biphasic solvent mixture of EtOAc:BuOH:H₂O. The choice of an efficient solvent system for gradient elution in HSCCC can present several difficulties, as any change in the composition of one phase can cause changes in the other phase.^[14] This biphasic solvent system has already been proposed for the separation of other classes of compounds, such as phenylpropanoids,^[15] but using different ratios from those presented in this work. The second chromatographic step was purification of the flavonoid by a Sephadex column, resulting in 35 mg of pure flavonoid.

The analysis of this flavonoid by ¹H NMR presented characteristic signals for an apigenin nucleus, as suggested also by its UV spectra (λ_{max} 269 and 335 nm),^[16] with four protons assigned to a 1,4-disubstituted aromatic ring (ring B) (δ 8.03, 2H, d, $J=8.7$ Hz and δ 6.90, 2H, d, $J=8.7$ Hz),

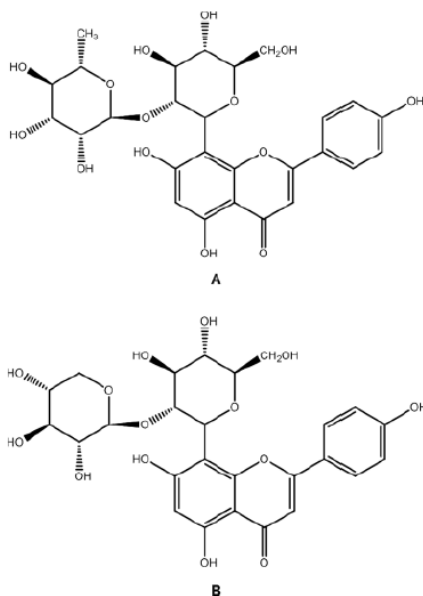


FIGURE 4 The structures of vitexin-2''-*O*-rhamnoside (A) and vitexin-2''-*O*-xyloside (B).

one hydrogen signal assigned to a pentasubstituted aromatic ring (ring A) (δ 6.24, 1H, s) and one signal for an olefinic proton (ring C) (δ 6.80, 1H, s). Additionally, signals for two anomeric protons (δ 4.79, 1H, d, $J=10.0$ Hz, and δ 3.88, 1H, d, $J=7.1$ Hz) suggested the presence of two sugar moieties. Assignment of the protons to the carbons was completed by HSQC correlations and some correlations observed in COSY allowed identify the sugars moieties as being glucose and xylose. These results were confirmed by comparison of the ^1H and ^{13}C NMR data with that of the literature.^[17]

As far as we are aware, our work is the first report of vitexin-2''-O-xyloside for *P. quadrangularis*. Notwithstanding, this compound has already been reported for *P. serratifolia*, *P. cyanea*, *P. oerstedii*, *P. serratodigitata*, *P. foetida*,^[18–21] and *P. alata*,^[22] but we were not able to detect it in the *P. alata* extract analyzed. Other studies that evaluated the chemical composition of *P. alata* leaves describe vitexin-2''-O-rhamnoside as the major flavonoid, but do not report vitexin-2''-O-xyloside.^[10,23,24] Based on these reports, together with our results, we can hypothesize that the work in which is described the occurrence of this compound in *P. alata* is controversial. Moreover, considering that the species does not occur at its collection site (Costa Rica), it is possible that the species collected was, in fact, another one, probably *P. quadrangularis*. The few comparative studies between these two related species described in the literature,^[24] together with their morphological resemblance, may have led to a poor identification of plant material in previous articles in the literature.

Quantitative HPLC Analysis

Quantitative differences between these flavonoids were evaluated by calibration curves of vitexin-2''-O-rhamnoside and vitexin-2''-O-xyloside. HPLC analyses showed linearity over the range 1.0–200.0 $\mu\text{g/mL}$, with a good linear relationship between peak area and concentration ($r^2 > 0.999$). The content of vitexin-2''-O-rhamnoside in aqueous extract of the leaves of *P. alata* was found to be 31.23 ± 0.04 mg/g of extract, whereas the content of vitexin-2''-O-xyloside in aqueous extract of the leaves of *P. quadrangularis* was 29.16 ± 0.11 mg/g of extract. Data on calibration, sensitivity, and precision are shown in Table 1 and accuracy data are described in Table 2.

To summarize, the presence of quadranguloside in both species indicates that the choice of this substance as chemical marker could give a false result. On the other hand, the major flavonoids are distinct for the different species, suggesting that vitexin-2''-O-rhamnoside could be used as chemical marker in the identification of *P. alata* and vitexin-2''-O-xyloside as a chemical marker for *P. quadrangularis*.

TABLE 1 Calibration, Sensitivity, and Precision Data of Vitexin Derivatives

Flavonoid	Linearity Range ($\mu\text{g/mL}$)	Calibration Equation ^a	Correlation Factor (r^2)	LOD ^b ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ^b ($\mu\text{g/mL}$)	Repeatability ^c		Intermediate Precision ^c	
						Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	R.S.D. (%)
Vitexin-2''-O-rhamnoside	2.5–200	$y = 11806x + 6093.5$	0.9998	1.0	2.5	10	0.7	80	0.5
						80	0.4		
Vitexin-2''-O-xyloside	1.0–200	$y = 22037x - 10641$	0.9999	0.5	1.0	200	0.1	80	0.8
						20	0.2		
						80	0.2		
						200	0.1		

^aVitexin-2''-O-rhamnoside: eight data points (n=3); vitexin-2''-O-xyloside: nine data points (n=3).

^bLOD= limit of detection, LOQ= limit of quantification.

^cLimits: RSD: <5%.

TABLE 2 Accuracy Data of Vitexin Derivatives

Specie	Flavonoid	Recovery ^a	
		Mean (%)	RSD (%)
<i>P. alata</i> (3 000 µg/mL)	Vitexin-2''-O-rhamnoside (120 µg/mL)	98.7	0.7
<i>P. quadrangularis</i> (3 000 µg/mL)	Vitexin-2''-O-xyloside (120 µg/mL)	97.8	0.1

^aRecovery was determined by injection of spiked samples, in triplicate, with standard solution.

CONCLUSION

Following the identification of the major compounds from the aqueous extract of the leaves of *P. alata* and *P. quadrangularis*, the use of the flavonoids vitexin-2''-O-rhamnoside and vitexin-2''-O-xyloside was proposed as chemical markers in the differentiation of these two species and also in the detection of adulterations in raw plant material.

ACKNOWLEDGMENT

The present work was carried out with support from CNPq, National Council of Scientific and Technology Development – Brazil and DIB – Universidad Nacional de Colombia. Geison M. Costa is grateful to CAPES for their PhD fellowship. The authors E. P. Schenkel and F. H. Reginatto are also grateful to CNPq for their research fellowships.

REFERENCES

1. Pio Corrêa, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
2. Blumenthal, M.; Goldeberg, A.; Brinckmann, J. *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*, American Botanical Council: Austin, TX, 2000.
3. Seaforth, C. E.; Adams, C. D.; Sylvester, Y. *A Guide for the Medicinal Plants of Trinidad & Tobago*, Marlborough House, Pall Mall: London, 1983.
4. Mors, W. B.; Rizzini, C. T.; Pereira, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*, Algomac: Rio de Janeiro, 2000.
5. Lorenzi, H.; Matos, F. J. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*, Instituto Plantarum: São Paulo, 2008.
6. *Farmacopéia Brasileira*, 5 Ed.; Andrei: Sao Paulo, 2010.
7. Anvisa. *Bulário Eletrônico*. Home page (<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico>) (Accessed March 16, 2012).
8. Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Verotta, L. Quadranguloside, a Cycloartane Triterpene Glycoside from *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry* **1985**, *25*, 191–193.
9. Reginatto, F. H.; Kauffmann, C.; Schripsema, J.; Guillaume, D.; Gosmann, G.; Schenkel, E. P. Steroidal and Triterpenoidal Glucosides from *Passiflora alata*. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 32–36.
10. 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. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 371–374.

11. International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)*. IFPMA: London, 2005.
12. Reginatto, F. H.; Gosmann, G.; Shripsema, J.; Schenkel, E. P. Assay of Quadranguloside, the Major Saponins of Leaves of *Passiflora alata*, by HPLC. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 195–197.
13. Birk, C. D.; Provensi, G.; Gosmann, G.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* **2005**, *28*, 2285–2291.
14. Costa, F. N.; Leitao, G. G. Strategies of Solvent System Selection for the Isolation of Flavonoids by Countercurrent Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 336–347.
15. Leitao, G. G.; Souza, P. A.; Moraes, A. A.; Brown, L. Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* **2005**, *28*, 2053–2060.
16. Markham, K. R. *Techniques of Flavonoids Identification*, Academic Press: London, 1982.
17. Compagnone, R. S.; Suarez, A. C.; Leitao, S. G.; Monache, F. D. Flavonoids, Benzophenones and a New Euphane Derivative from *Chusia columnaris* Engl. *Brazil. J. Pharmacog.* **2008**, *18*, 6–10.
18. Ulubelen, A.; Mabry, T. J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora seratifolia*. *J. Natural Prod.* **1980**, *43*, 162.
19. Ulubelen, A.; Ayyildiz, H.; Mabry, T. J. C-glycosylflavonoids and Other Compounds from *Passiflora cyanea*, *P. oerstedii* and *P. menispermifolia*. *J. Natural Prod.* **1981**, *44*, 368–369.
20. Ulubelen, A.; Kerr, R. R.; Mabry, T. J. Two new neoflavonoids and C-glycosylflavones from *Passiflora serratodigitata*. *Phytochem.* **1982**, *21*, 1145–1147.
21. Ulubelen, A.; Topcu, G.; Mabry, T. J.; Dellamonica, G.; Chopin, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora foetida* var. *hispida* and *P. foetida* var. *hibicifolia*. *J. Natural Prod.* **1982**, *45*, 103.
22. Ulubelen, A.; Oksuz, S.; Mabry, T. J.; Dellamonica, G.; Chopin, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and a *Adenia manii*. *J. Natural Prod.* **1982**, *45*, 783.
23. 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. *Phytochem. Anal.* **2004**, *15*, 241–248.
24. Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* **2012**, *23*, 232–239.

5.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, foi possível concluir que:

- A saponina quadrangulosídeo foi observada como sendo a saponina majoritária nos extratos aquosos de ambas as espécies *P. alata* e *P. quadrangularis*, não sendo um bom marcador na distinção entre essas espécies;
- Por meio do perfil de flavonoides obtido por CLAE, foi possível estabelecer potenciais marcadores químicos, com base nos flavonoides *C*-glicosídeos majoritários das folhas de cada espécie (2''-*O*-xilossil-vitexina, para *P. quadrangularis* e 2''-*O*-ramnosil-vitexina para *P. alata*).
- Os flavonoides majoritários de ambas as espécies, além de quimicamente semelhantes, também se apresentam em teor próximos, na ordem de 3% (m/m).

CAPÍTULO 6 – Isolamento de flavonoides glicosilados das folhas de *Passiflora bogotensis* por HSCCC

6.1 INTRODUÇÃO

A América Latina possui uma vasta diversidade no que diz respeito a espécies do gênero *Passiflora*. No entanto, a maior parte dos tanto químicos quanto farmacológicos são restritos a poucas espécies, especialmente *P. incarnata* e *P. edulis*.

Em um período recente, alguns trabalhos venham sendo realizados com espécies de *Passiflora* ainda pouco estudadas, mesmo que estas não estejam incluídas em Farmacopeias ou que não possuam uma cadeia produtiva estabelecida.

Como exemplo, pode-se citar os trabalhos realizados com *P. actinia*, que demonstraram atividades ansiolíticas e sedativas (em modelos de labirinto de cruz-elevada e campo aberto) para os extratos metanólicos das folhas, quando administrados via oral e intraperitoneal em camundongos (SANTOS et al., 2006; LOLLI et al., 2007), e também com *P. foetida*, para a qual também existem relatos de atividades anti-inflamatória, antinocepsiva (SASIKALA et al., 2011) e antidepressiva (SANTOSH et al., 2011) de extratos alcoólicos de suas folhas.

No que concerne a constituição química de ambas as espécies citadas, é descrita a presença de flavonoides C-glicosídeos, havendo sido identificada a isovitexina em *P. actinia* (SANTOS et al., 2006) e vitexina em *P. foetida* (PONGPAN et al., 2007).

Durante o desenvolvimento desta tese, foi iniciada a investigação da espécie *P. bogotensis*, uma espécie para a qual os estudos na literatura são escassos.

6.1.1 *Passiflora bogotensis* Benth.

A região andina da Colômbia apresenta uma grande variedade de espécies de *Passiflora*, e é considerada um centro de dispersão para muitas espécies desse gênero, tais como *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. ligularis* e *P. bogotensis*. (ASTURIZAGA et al., 2006; CARDOZO et al., 2011).

Embora algumas dessas espécies sejam cultivadas com fins alimentícios, para a comercialização da fruta *in natura*, ou para fabricação de sucos, outras espécies não possuem cadeia produtiva estabelecida, pois não são comercializadas com este intuito (CARDOZO et al., 2011). Esse é o caso de *P. bogotensis*, espécie silvestre, que de

modo geral, não é empregada de forma ornamental e nem com fins alimentícios.

Descrita como espécie nativa de Bogotá, raramente é encontrada fora dessa região. Dados da literatura sobre *P. bogotensis* são escassos, ocorrendo apenas algumas referências populares sobre a possível toxicidade de seus frutos (PASSIFLORA, 2012).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos na literatura sobre composição química ou atividades farmacológicas de *P. bogotensis*.

Este capítulo está composto por uma proposta de publicação que descreve o isolamento de seis flavonoides C-glicosídeos por Cromatografia Contracorrente realizada diretamente a partir da injeção do extrato aquoso bruto das folhas de *P. bogotensis*, bem como a análise estrutural dos componentes isolados.

6.2 OBJETIVOS

- Isolar por HSCCC os flavonoides das folhas de *P. bogotensis*
- Identificar os flavonoides isolados por técnicas como UV, EM e RMN.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta de publicação exposta a seguir está apresentada conforme as normas da revista para a qual foi submetida.

Após o manuscrito, são apresentados os espectros de RMN dos flavonoides codificados como PbF2 e PbF4, apresentados como material suplementar ao manuscrito (**Figuras 95 a 102**).

6.3.1 Proposta de publicação

Gradient High-Speed Counter-Current Chromatography for isolation of six flavonoids glycosides from *Passiflora bogotensis* Benth.

Geison Modesti Costa, Andressa Córneo Gazola, Leonardo Castellanos, Carmenza Duque, Flávio Henrique Reginatto, Freddy A. Ramos e Eloir Paulo Schenkel.

Artigo submetido para publicação.

Biomedical Chromatography (ISSN 1099-0801)

Gradient High-Speed Counter-Current Chromatography for isolation of six flavonoids glycosides from *Passiflora bogotensis* Benth.

Geison Modesti Costa^{a,b*}, Andressa Córneo Gazola^a, Leonardo Castellanos^b, Carmenza Duque^b, Flávio Henrique Reginatto^a, Freddy A. Ramos^b and Eloir Paulo Schenkel^a

^a Programa de Pós-graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-970, Brazil.

^b Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Carrera 30 number 45-03, Colombia.

* *Correspondence to:* Geison Modesti Costa, Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. CEP: 88040-900. Tel.: +55 48 3721 5065, Fax: +55 48 3721 9350. *E-mail address:* geison_costa@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Passiflora species are widely distributed throughout Latin America, and their leaves are traditionally used in tea preparations, for their sedative or calming effects. C-glycosylflavonoids has been described as the main components of these species but their separation in classical column chromatography is a challenging problem especially for irreversible adsorption onto solid supports. The separation and isolation of flavonoid glycosides from the aqueous crude extract of the leaves of *Passiflora bogotensis* by gradient HSCCC is described in this paper. The aqueous crude extract was direct injected in normal phase HSCCC, and a gradient was performed using the solvent system ethyl acetate:*n*-butanol:water,1:X:1, with an increase of *n*-butanol in four steps: 0.05, 0.2, 0.5 and 1.0. The structures of the isolated compounds were identified by HPLC-DAD, LC-MS and ¹H and ¹³CNMR. This separation enabled the isolation of four known flavonoid glycosides (isovitexin, isoorientin, isovitexin-2''-*O*-rhamnoside and isoorientin-2''-*O*-rhamnoside) and two new ones (apigenin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetyl)- β -D-glucopiranoside and luteolin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetyl)- β -D-glucopiranoside). The purity of each flavonoid was more than 81%. In this study, we applied a gradient HSCCC method that allowed, by direct injection of crude extract, the successful isolation of six flavonoids in a single run. This is the first study concerning the chemical composition of *Passiflora bogotensis*.

Keywords: *Passiflora bogotensis*; flavonoids; Gradient elution High-Speed Counter-Current Chromatography.

Abbreviations used: HSCCC, High-Speed Counter-Current Chromatography; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; DAD, Diode Array Detection; MS, mass spectrometry; CDL, curved desolvation line; ESI, Electrospray ion source, K, partition coefficient; NMR, nuclear magnetic resonance.

Introduction

High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) is a separation technique that uses, as stationary phase, a liquid matrix instead of the common-used solid support matrix, preventing the irreversible absorption of the samples onto the solid supports, and showing an excellent sample recovery (Srivastava, 2008; Conway, 2011). HSCCC is therefore a good alternative as a preparative technique to improve the separation of flavonoids glycosides, as the traditional separation methods, such as silica gel column chromatography, are often time consuming and can easily result in adsorption of the sample onto the solid support, making it difficult to be eluted from the matrix (Zhou *et al*, 2005). In addition, the use of gradient elution in HSCCC could be a good choice for the purification of mixtures containing several compounds with different polarities and partition coefficients, although only a small number of papers in the literature describe the use of

gradients in HSCCC, in contrast to the usual isocratic elution (Oliveira *et al.*, 2003; Leitão *et al.*, 2005).

Species of the genus *Passiflora* (Passifloraceae) are widely distributed throughout Latin America, and their fruits are widely consumed, or used in the preparation of juices. The leaves of some *Passiflora* species are traditionally used in several countries in tea preparations, for their sedative or tranquilizer properties (Pio Corrêa, 1978; Blumenthal *et al.*, 2000). Reports on the chemical composition of the leaf extract of *Passiflora* species have described mainly C-glycosylflavonoids (Raffaelli *et al.*, 1998, Abourashed *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2005; Zucolotto *et al.*, 2009; Zucolotto *et al.*, 2012) and saponins (Orsini *et al.*, 1985; Reginatto *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2013). Moreover, in recent years, pharmacological studies of these plants have pointed to a putative involvement of flavonoids in the neuropharmacological activities (Coleta *et al.*, 2002; De-Paris *et al.*, 2002; Sena *et al.*, 2009).

The Andean region of Colombia presents a wide variety of *Passiflora* species, and is considered a dispersion center for many species of this genus, such as *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. ligularis*, *P. quadrangularis* and *P. bogotensis* (Blumenthal *et al.*, 2000; Asturizaga *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2011). Although some of these species are cultivated for consumption as fresh fruit or fruit juices, other species have not been domesticated, and are not commercialized for this purpose (Cardoso *et al.*, 2011). Such is the case of *P. bogotensis*, a native species of the region of Bogota, which is used neither for ornamental purposes or as food. Literature data on *P. bogotensis* are

scarce, and as far as we are aware, there have been no studies on the chemical composition of this species.

As part of our continuing research on species of the genus *Passiflora* (Ramos *et al.*, 2010; Zucolotto *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2013), this study describes the isolation of flavonoid glycosides by HSCCC gradient from *P. bogotensis* leaves. This work is the first known report concerning the chemical composition of this species.

Experimental

Chemical and Reagents

Ethyl acetate and *n*-butanol were provided by Merck[®]. Acetonitrile and formic acid HPLC grade were purchased from Tedia[®]. Water was purified using a Milli-Q system (Millipore[®], Bedford, USA). All the solutions prepared for HPLC were filtered through a 0.45 mm membrane before use.

Plant Material and Extraction

The leaves of *Passiflora bogotensis* Benth. were collected in Nemocón, Cundinamarca-Colombia, in May 2011, and identified by Prof. Luis Carlos Jimenez. A voucher specimen was deposited at the Instituto de Ciencias Naturales of the Universidad Nacional de Colombia (COL 564523). The leaves (100 g) were dried at room temperature, powdered and then extracted by infusion with boiled, distilled water (90°C, 1:10 w/v) for 10 minutes. The extract was then filtered and freeze-dried. The crude extract yielded 16.8 g of solid material.

HPLC Analysis

For the HPLC-DAD analyses, a Merck-Hitachi apparatus was used, equipped with a L-6000A tertiary pump, a AS2000A autosampler and a L-4500 DAD detector. The chromatograms were recorded at 340 nm while the UV spectra were monitored over a range of 450 to 200 nm. The data were processed using D-6000-HSM software.

HPLC separations were performed in a Vertical VertSep C₁₈ column (250 x 4.6 mm i.d.; 5µm) using a gradient system of acetonitrile (solvent A) and formic acid 0.5% (solvent B), in a single step: 17-35% A (0-20 min). The flow rate was kept constant at 1.2 mL/min. The mobile phase was prepared daily and degassed by sonication before use.

The analyses by HPLC-MS were carried out using a Shimadzu LC-10A coupled to a selective mass detector (LCMS-2010EV). Electrospray ion source (ESI)-MS spectra were acquired in negative ion mode, and the interface and MS detector parameters were as follows: detector voltage, 1.5kV; CDL voltage, 150V, CDL temperature, 250°C; heat block temperature, 250°C; QarrayRF voltage, 150 V and nitrogen as nebulizer gas, at a flow rate of 1L/min.

Selection of Solvent Systems for HSCCC Gradient Separation

For the selection of the solvent system was employed methodology according to Leitão and co-workers (2005). Briefly, different ratios of the solvent system ethyl acetate:*n*-butanol:water (**Table 1**) was used to dissolve small amounts of aqueous crude extract of *P. bogotensis* in separate test tubes. The tubes were then equilibrated by shaking vigorously. 500 µL aliquots of each phase were evaporated to dryness,

diluted with 500 μ L methanol:water (1:1) and analyzed by HPLC-DAD, as described above. The partition coefficient (K) value was expressed as the peak area of target compounds in the upper phase (mobile phase) divided by that in the lower phase (stationary phase).

Table 1

Solvent systems tested for the separation of flavonoids from the aqueous crude extract of leaves of *P. bogotensis* by HSCCC gradient elution.

Solvent systems chosen	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
A	1	0.05	1
	1	0.1	1
B	1	0.2	1
C	1	0.5	1
D	1	1.0	1
	1	1.2	1

HSCCC Separation

The HSCCC separation was carried out using a P.C. Inc. Countercurrent Chromatograph with a multi-layer coil (400 mL) equilibrated by a counterweight. A Merck-Hitachi pump, model L-6000, and an Eldex universal fraction collector were also used. The lower aqueous phase of solvent system A was used as the stationary phase with the upper organic phase of solvent system A as the initial mobile phase. Once the stationary phase was pumped and filled in the column, the rotor speed

was set at 800 RPM and the initial mobile phase pumped in a tail to head direction at 3.0 mL/min. The retention of stationary phase for this solvent system was 76.7% ($V_s = 307$ mL). After reaching hydrodynamic equilibrium, 1 g of aqueous crude extract in 6 mL of a mixture of both phases (1:1 ratio) was injected, and fractions of 9 mL were collected.

The gradient elution was conducted as follows: a total volume of 350 mL of organic phase of solvent system A was pumped, being the initial 100 mL not collected. The remaining 250 mL filled tubes 1 to 21. Next, 250 mL of the upper organic phase of the solvent systems B and C filled tubes 22 to 44 and 45 to 70, respectively. For solvent system D, 480 mL of the organic phase was pumped through the column, filling tubes 71-127.

NMR Spectroscopy

The NMR experiments on **1-6** were carried out in a Bruker[®] 300 spectrometer, using DMSO- d_6 at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C NMR. Two-dimensional spectroscopies such as HSQC, HMBC, COSY and TOCSY were also recorded.

Results and Discussion

Selection of Solvent Systems

The counter-current chromatography technique allows the injection of large amounts of sample without prior purification, enabling to obtain large amounts of isolated substance (McAlpine and Morris, 2006). It also avoids some problems associated with flavonoid separation, such as irreversible adsorption, which is common in flavonoid glycoside

isolation in classical column chromatography, leading to lower yields and higher investment of time (Peng *et al.*, 2005).

The choice of an adequate solvent system is the most important step in the development of a HSCCC method, and is a crucial part of a successful separation (Srivastava, 2008). Recently, Costa and Leitão (2010) reviewed solvent systems developed for the isolation of flavonoids, discussing the solvent systems for both *O*-glycoside and *C*-glycoside flavonoids. The authors point out that three solvent "families" are the most commonly used in the isolation of such compounds by CCC: hexane-ethyl acetate-methanol-water (HEMWat); chloroform-methanol-water; ethyl acetate-butanol-water (EBuWat).

The EBUWat family, in gradient mode, has already been used in the separation of glycosylated phenylpropanoids and iridoids (Leitão *et al.*, 2005). In a previous work carried out by our group, we used this biphasic solvent system to isolate the major flavonoid from the leaves of *P. quadrangularis* (Costa *et al.*, 2013).

A similar strategy was used in this study for flavonoid isolation from the aqueous crude extract from *P. bogotensis* leaves. With an initial approach based in the studies of Leitão and co-workers (2005), different amounts of *n*-butanol were tested, as described in **Table 1**. The four steps of the gradient solvent system employed herein were selected based on HPLC analyses of the distribution of sample components in the upper and lower phases of the systems (**Figure 1**). The chromatograms show the distribution of flavonoids, which were initially retained in aqueous lower phase system A and later, as the polarity of the organic

phase increased (A \rightarrow D), the flavonoids were partitioned to the upper organic phases. The distribution coefficient (K) values of the flavonoids in the different ratios of *n*-butanol in systems A-D were determined by HPLC, expressed as the peak area of the compound in the upper phase divided by the peak area of the compound in the lower phase, and are presented in **Table 2**.

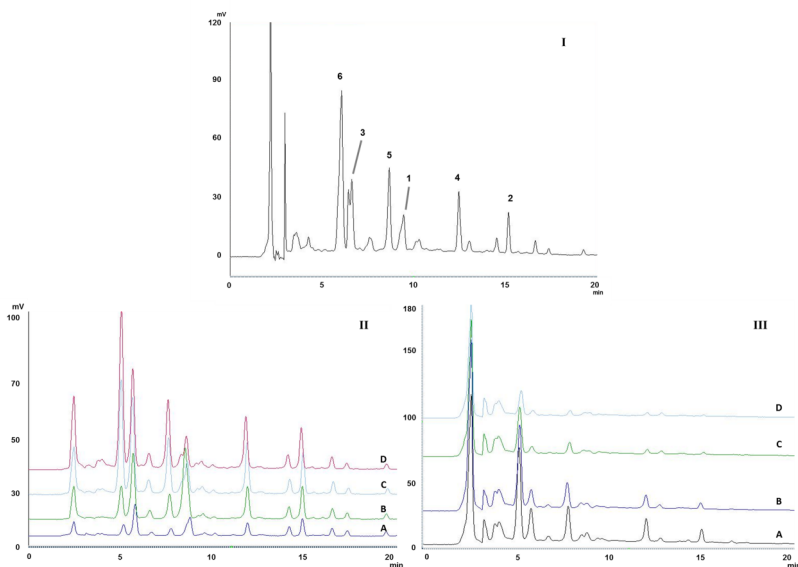


Figure 1. Chromatograms of the aqueous crude extract of *P. bogotensis* (I), together with the upper (II) and lower phases (III) obtained in the test tube experiments for the evaluation of the ratio of *n*-BuOH (A-D) in the solvent system EBUWat. Column: Vertical VertSep C18 (250 mm \times 4.6 mm; i.d. 5 μ m); mobile phase: (A) ACN : (B) formic acid 0.5%, 17-35% A (0-20 min); flow rate: 1.2 mL/min; detection wavelength: 340 nm.

Table 2

The *K* values of compounds in different *n*-BuOH ratios, in the EBUWat solvent system

Solvent composition	Compound					
	1	2	3	4	5	6
EtOAc: <i>n</i> -BuOH:H ₂ O (1:0.05:1)	0.50	0.68	0.45	0.27	0.07	0.04
EtOAc: <i>n</i> -BuOH:H ₂ O (1:0.2:1)	0.62	1.10	0.66	0.47	0.14	0.06
EtOAc: <i>n</i> -BuOH:H ₂ O (1:0.5:1)	7.41	7.37	4.70	3.59	1.64	0.87
EtOAc: <i>n</i> -BuOH:H ₂ O (1:1:1)	20.75	13.67	7.91	6.18	3.81	1.91

As observed in **Table 2**, the three solvent systems provide different ranges of *K* values for compounds **1-6**, according to the amount of *n*-BuOH in the solvent system, which acts as an organic phase modifier. It was also observed that for each compound, there are different distribution coefficients in each of the systems chosen, and its increase occurs in differentiated manner between the compounds, which shows distinct retention of the flavonoids in the lower phase.

Preparative HSCCC Separation of Crude Extract

The selected solvent systems were then applied to the simultaneous isolation of six flavonoids by HSCCC in a single operation, within less

than 7 hours, directly from the crude extract. The fractions obtained were evaporated under reduced pressure to yield compounds **1** (fraction 14-20, 8 mg), **2** (fr. 24-30, 9 mg), **3** (fr. 32-41, 14 mg), **4** (fr. 43-47, 24 mg), **5** (fr. 61-67, 15 mg) and **6** (fr. 73-80, 32 mg). The purity of the HSCCC fractions was determined by LC-MS (**Figure 2**) and the purity of the isolated compounds **1-6** was 86.6%, 85.4%, 88.9%, 81.2%, 90.2% and 97.3%, respectively.

Compared to the usual procedures of isolation of flavonoid glycosides previously performed in our laboratory (Zucolotto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011), the HSCCC separation was very effective in terms of the number of chromatographic steps, time and solvents consumed, and the number and amount of flavonoids isolated in a single analysis.

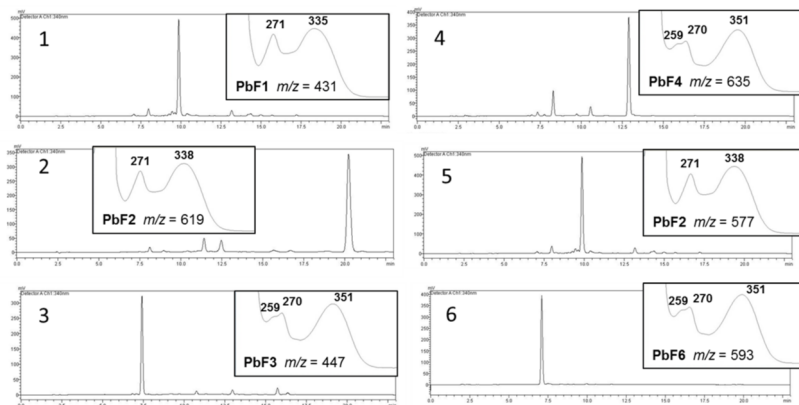


Figure 2. LC-MS chromatograms of the fractions 1-6 from HSCCC. Column: Vertical VertSep C18 (250 mm × 4.6 mm; i.d. 5 μm); mobile phase: (A) ACN : (B) formic acid 0.5%, 17-35% A (0-20 min); flow rate: 1.2 mL/min; detection wavelength: 340 nm.

Structural Identification of The Isolated Compounds

The compounds eluted from the gradient HSCCC were directly used for structural identification by LC-MS and NMR, without any other purification process. As shown in **Figure 2**, the UV and MS data from the isolated compounds indicated a glycosylflavones, with apigenin or luteolin nucleous (Markham, 1982). The flavonoids **1** (UV $_{\lambda_{\max}}$ 271 and 335 nm; m/z 431 [M-H]⁻) and **3** (UV $_{\lambda_{\max}}$ 259, 270 and 351 nm; m/z 447 [M-H]⁻) were identified based on their spectral data and by co-chromatography with authentic samples, as isovitexin and isoorientin, respectively (**Figure 3**).

Compounds **2**, **4**, **5** and **6** were identified by their spectroscopic data (**Table 3**). Comparison with the literature data (Hussein *et al.*, 2003; Rayyan *et al.*, 2005) led to the identification of flavonoids **5** and **6** as isovitexin-2''-*O*-rhamnoside and isoorientin-2''-*O*-rhamnoside, respectively (**Figure 3**). This is the first report of these compounds for the genus *Passiflora*, although Ferreres and co-authors (2007) have described 2''-*O*-deoxyhexosyl-*C*-hexosyl-flavones to *P. edulis*, but without indicating the position of attachment sugar-nucleus.

Table 3

¹H (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) data for compounds **2**, **4**, **5** and **6** in DMSO-*d*₆.

Position	2		4		5		6	
	C	H	C	H	C	H	C	H
2	163.3	-	163.6	-	163.5	-	163.4	-
3	102.4	6.79 (s)	102.6	6.68 (s)	102.5	6.79 (s)	102.5	6.67 (s)
4	182.0	-	182	-	181.9	-	182.0	-
5	161.1	13.57 (s, OH)	161.1	13.57 (s, OH)	160.8	13.56 (s, OH)	161.4	13.56 (s, OH)
6	108.6	-	108.6	-	108.9	-	108.7	-
7	161.9	-	161.9	-	162.3	-	163.2	-
8	93.3	6.52 (s)	93.3	6.51 (s)	92.7	6.50 (s)	92.7	6.48 (s)
9	156.4	-	156.4	-	156.3	-	156.2	-
10	103.4	-	103.9	-	103.6	-	103.5	-
1'	121.7	-	121.2	-	120.8	-	121.2	-
2'	128.2	7.93 (d, J=8.6)	113.0	7.40	128.5	7.93 (d, J=8.8)	112.8	7.39
3'	116.3	6.92 (d, J=8.6)	145.8	-	116.3	6.92 (d, J=8.8)	145.7	-
4'	161.5	-	149.8	-	161.4	-	149.7	-
5'	116.3	6.93 (d, J=8.6)	116.0	6.89 (d, J=8.3)	116.3	6.92 (d, J= 8.8)	115.8	6.89 (d, J= 8.3)
6'	128.2	7.93 (d, J=8.6)	118.8	7.42	128.5	7.93 (d, J=8.8)	118.6	7.43
1"	71.0	4.65 (t, J=10)	71.2	4.65 (t, J=10)	71.0	4.62 (t, J=10)	71.0	4.63 (t, J=10)
2"	75.4 [74.1]	4.25 [4.35] (t, J=9.2)	75.2 [74.2]	4.25 [4.35] (t, J=9.2)	75.5 [74.3]	4.19 [4.36] (t, J=9.0)	75.5 [74.3]	4.20 [4.37] (t, J=9.0)
3"	78.5	3.37	78.8	3.37	79.7	3.34	79.7	3.34
4"	70.6	3.35	70.7	3.35	70.3	3.60	70.3	3.61
5"	81.3	3.16	81.4	3.16	81.1	3.14	81.2	3.14
6"	64.3	4.37; 3.88	64.4	4.37; 3.88	61.2	3.70; 3.38	61.2	3.70; 3.38
1'''	100.2	-	100.2	-	100.2	-	100.2	-
2'''	[100.4]	5.08 [5.00] (s)	100.3 [100.5]	5.08 [5.00] (s)	100.2 [100.7]	5.08 [5.00] (s)	100.0 [100.3]	5.07 [5.01] (s)
3'''	70.2	3.12	70.2	3.11	70.2	3.11	70.2	3.11
4'''	70.4	3.61	70.5	3.61	70.5	3.60	70.5	3.61
5'''	71.4	2.91	71.5	2.92	71.5	2.91	71.3	2.92 (t, J=9)
6'''	68.1	2.28	68.1	2.30	68.8	2.30	68.0	2.30
CH ₃ COO	17.9 [17.6]	0.60 [0.50] (d, J= 6.0)	17.9 [17.6]	0.60 [0.50] (d, J= 6.0)	17.6 [17.4]	0.60 [0.51] (d, J=5.9)	17.6 [17.4]	0.60 [0.51] (d, J=5.6)
CH ₃ COO	20.8	1.99 (s)	20.8	1.99 (s)	-	-	-	-
CH ₃ COO	170.6	-	170.4	-	-	-	-	-

The ^1H and ^{13}C NMR spectra from compounds **2**, **4**, **5** and **6** presented some unusual characteristics, such as the δ values of δ 0.60 for the rhamnose methyl protons, instead of the usual δ 1.50. This shielded shift is due to the spatial shielding effect of ring A of the flavonoid unit, as the sugar moieties are attached to the flavonoid nucleus at position 6 (Cheng *et al.*, 2000; Rayyan *et al.*, 2005). Furthermore, some ^1H and ^{13}C signals were duplicated (H and C-2'', H and C-1''', H and C-6'''). This effect is observed as a result of the rotational barrier around the C-glycosidic linkage (Hussein *et al.*, 2003).

Describing compound **4**, characteristic patterns of a luteolin nucleus was observed through the presence of olefinic proton at δ 6.68 (1H, s, H-3), a pentasubstituted aromatic ring at δ 6.51 (1H, s, H-8), and signals for a 1,3,4-trisubstituted aromatic ring at δ 7.42 (1H, d, $J = 8.3$, H-6'), δ 7.40 (1H, s, H-2') and δ 6.89 (1H, d, $J = 8.3$, H-5'). Protons signals between δ 5.08 and δ 2.30 indicated the presence of sugar moieties, which was defined as two sugar units, by the number of signals and by the presence of two anomeric proton signals at δ 4.65 (1H, t, $J = 10.0$, H-1'') and δ 5.08 (1H, s, H-1'''). Assignment of the protons to the carbons was completed by HSQC correlations and some correlations observed in HMBC. The analysis of these two-dimensional correlation spectra, together with the TOCSY correlations, led to the identification of glucose and rhamnose as the sugar moieties. Glucose was proposed as the C-linked sugar at C-6 by the HMBC correlation between the proton C-1'' at δ_{H} 4.65 and the carbons C-6 at δ_{C} 108.6, C-7 at δ_{C} 161.9 and C-5 at δ_{C} 161.1. Likewise, the glucose-rhamnose link was proposed at C-2'' by HMBC correlation between the proton C-2'' at δ_{H} 4.25 and the carbons C-1''' at δ_{C} 100.3. Flavonoid **4** presented ^1H and ^{13}C NMR

signals similar to those of compound **5**, but a mass difference of 42 m/z between these two compounds indicates the presence of a possible acetyl group, which was confirmed by the observation of the signals at δ H 1.99, δ C 20.8 and δ C 170.4. Due the deshielded shift of the glucose methylene protons (δ 4.37 and δ 3.88) and carbon (δ 64.4), the acetyl group was then located on the glucose in position C-6''. These data allowed determination of flavonoid **4** as luteolin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6'')-*O*-acetyl)- β -D-glucopiranoside (**Figure 3**).

In the same way, the ^1H and ^{13}C NMR signals of flavonoid **4** were similar to those of flavonoid **2**, except for the signals for an apigenin nucleus, with signals of a *para*-substituted aromatic ring (ring B) at δ 6.92 (2H, d, $J = 8.6$, H-3' and H-5'), δ 7.93 (2H, d, $J = 8.6$, H-2' and H-6'). These comparison led to the determination of flavonoid **2** as apigenin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6'')-*O*-acetyl)- β -D-glucopiranoside (**Figure 3**).

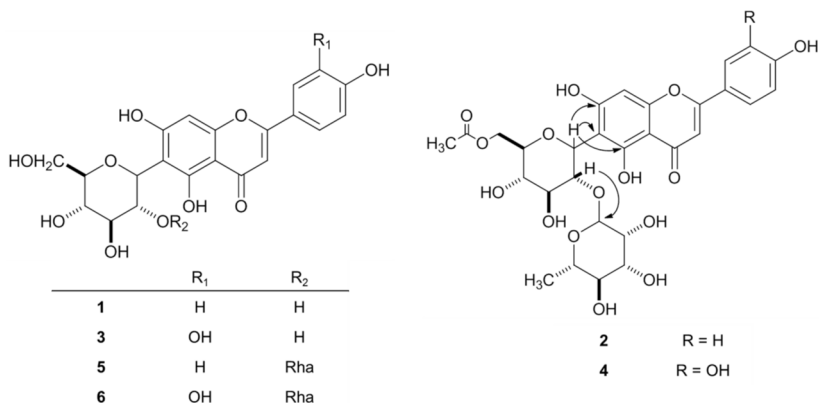


Figure 3. Structures of compounds **1**, **3**, **5** and **6** and structure of the new flavonoids apigenin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranoside (**2**) and luteolin-6-*C*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranoside (**4**). Rha = rhamnose. \rightarrow : relevant HMBC correlations.

To the best of our knowledge, flavonoids **2** and **4** have not been previously reported in the literature, and this is also the first report of compounds **5** and **6** in the genus *Passiflora*.

Conclusion

In this study, we applied a gradient HSCCC method that allowed, by direct injection of crude extract, the successful isolation of six flavonoids, two of them reported for the first time in nature. This is also the first study concerning the chemical composition of *Passiflora bogotensis*.

Acknowledgments

This work was carried out with support from CNPq, National Council of Scientific and Technology Development – Brazil and DIB – Universidad Nacional de Colombia. Geison M. Costa is grateful to CAPES for granting the PhD fellowship. The authors E. P. Schenkel and F. H. Reginatto are also grateful to the CNPq for granting the research fellowships.

Supplementary data

Supplementary data (NMR spectra) of the new flavonoids (2 and 4) can be found in the online version, at: <http://onlinelibrary.wiley.com/>

References

- Abourashed EA, Vanderplank JR and Khan I. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 2002; **40**: 81-91.
- Asturizaga AS, Ollgaard B and Balslev H. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Bogotá, 2006.
- Blumenthal M, Goldeberg A and Brinckmann J. *Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs*. American Botanical Council: Austin, 2000.
- Cardoso RH, Córdoba SL, Gonzalez JD, Guzmán, JR, Lancheros HO, Mesa LI, Pacheco RA, Pérez BA, Ramos FA, Torres ME and Zúñiga PT. *Especies útiles en la Región Andina de Colombia*, Tomo II. Imprensa Nacional de Colombia: Bogotá, 2011.

- Cheng G, Bai Y, Zhao Y, Tao J, Liu Y, Tu G, Ma L, Liao N and Xu X. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron* 2000; **56**: 8915-8920.
- Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, De Lima TCM and Cunha AP. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander. and *Passiflora edulis* Sim. *Phytotherapy Research* 2006; **20**: 1067-1073.
- Conway WD. Counter-current chromatography: simple process and confusing terminology. *Journal of Chromatography A* 2011; **1218**: 6015-6023.
- Costa FN, Leitão GG. Review Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science* 2010; **33**: 336-347.
- Costa GM, Gazola AC, Madóglia FA, Zucolotto SM, Reginatto FH, Castellanos L, Ramos FA, Duque C and Schenkel EP. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis. and *Passiflora quadrangularis* Linn. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2013; **36**: 1697-1707.
- Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP and Reginatto FH. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011; **22**: 1096-1102.
- De-Paris F, Petry RD, Reginatto FH, Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro JB, Kapczinski F, Ortega GG and Schenkel EP. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and

- Passiflora edulis* Sim. *Latin American Journal of Pharmacy* 2002; **21**: 5-8.
- Ferreres F, Sousa C, Valentao P, Andrade PB, Seabra RM and Gil-Izquierdo A. New C-Deoxyhexosyl Flavones and Antioxidant Properties of *Passiflora edulis* Leaf Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; **55**: 10187-10193.
- Hussein AA, Gomez B, Ramos M, Heller M, Coley PD, Solis PN and Gupta MP. Constituents of *Hiraea reclinata* and their anti-HIV activity. *Revista Latinoamericana de Química* 2003; **31**: 5-8.
- Leitao GG, Souza PA, Moraes AA and Brown V. Step gradient CCC separation of phenylpropanoid and iridoid glycosides from roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2005; **28**: 2053-2060.
- Markham KR. *Techniques of Flavonoids Identification*, Academic Press: Londres, 1982.
- McAlpine JB and Morris P. Separation by High-Speed Countercurrent Chromatography. In: *Methods in Biotechnology*. Sarker SD, Latif Z, Gray AI (Eds). Humana Press: Totowa, 2006; 185-211.
- Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M and Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; **37**: 399-403.
- Oliveira RR, Moraes MCC, Castilho RO, Valente AP, Carauta JPP, Lopes D and Kaplan MAC. High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochemical Analysis* 2005; **14**: 96-99.

- Orsini F, Pelizzoni F and Verotta L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. *Phytochemistry*, 1985; **25**: 191-193.
- Peng J, Fan G, Hong Z, Chai Y and Wu Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005; **1074**: 111-115.
- Pio Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978.
- Raffaelli A, Moneti G, Mercanti G and Tojæ E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *Journal of Chromatography A* 1997; **777**: 223-231.
- Ramos FA, Castellanos L, López C, Palacios L, Duque C, Pacheco R and Guzmán A. An Orientin Derivative Isolated from *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. *Latin American Journal of Pharmacy* 2010; **29**: 141-143.
- Rayyan S, Fossen T, Nateland HS and Andersen ØM. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Hawthorn). *Phytochemical Analysis* 2005; **16**: 334-341.
- Reginatto FH, Kauffman C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G and Schenkel EP. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2001; **12**: 32-36.
- Sena LM, Zucolotto SM, Reginatto FH, Schenkel EP and De Lima TCM. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-

glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine* 2009; **234**: 976-975.

Srivastava SK. Counter-current Chromatography. In *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (Eds.). ICS Unido: Trieste, 2008; 209-238.

Zhou X, Peng J, Fan G and Wu Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A* 2005; **1092**: 216-221.

Zucolotto SM, Fagundes C, Reginatto FH, Ramos FA, Castellanos L, Duque C and Schenkel EP. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* 2012; **23**: 232-239.

Zucolotto SM, Goulart SM, Montanher A, Reginatto FH, Schenkel EP, Frode TS. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica* 2009; **75**: 1221-1226.

6.1.1 Dados suplementares – Espectros dos flavonoides PbF2 (2) e PbF4 (4)

Figura 95 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PbF2 (DMSO- d_6 ; 300 MHz)

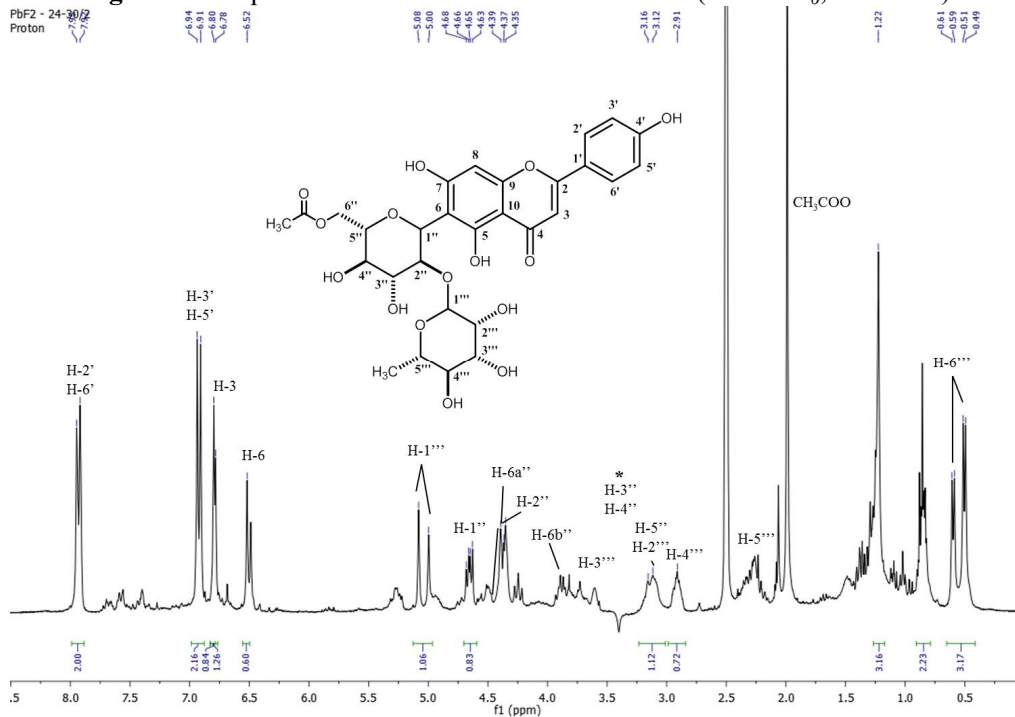


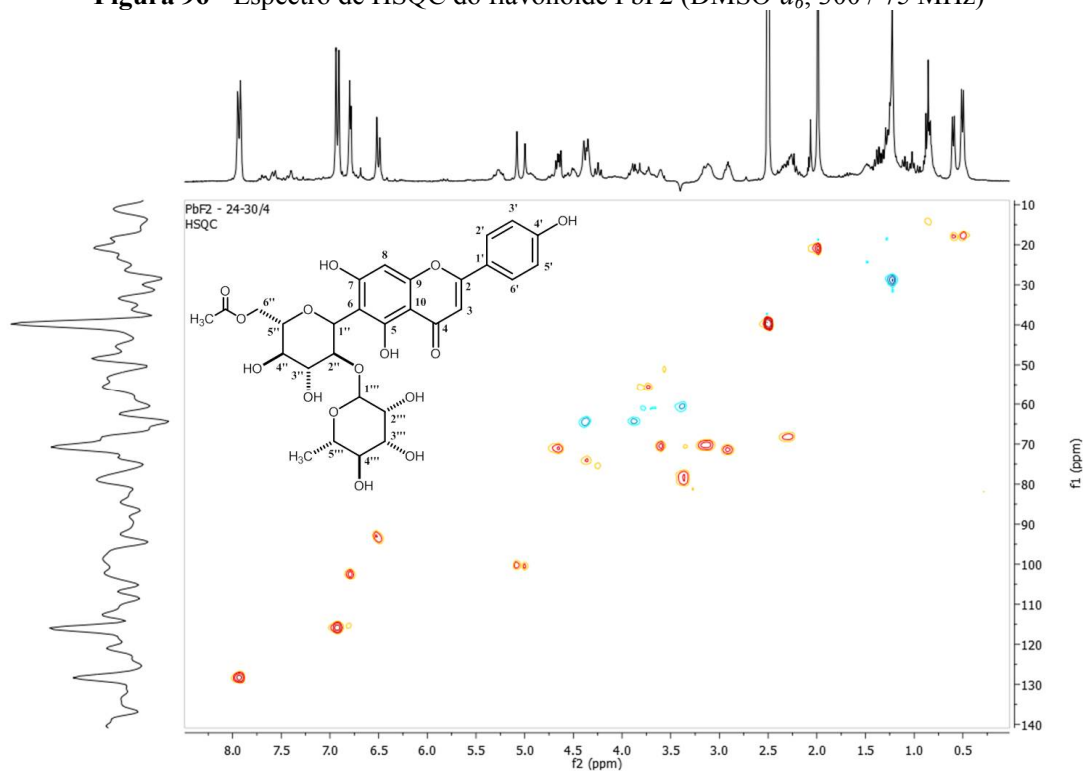
Figura 96 - Espectro de HSQC do flavonoide PbF2 (DMSO-*d*₆; 300 / 75 MHz)

Figura 97 - Espectro de HMBC do flavonoide PbF2 (DMSO-*d*₆; 300 / 75 MHz)

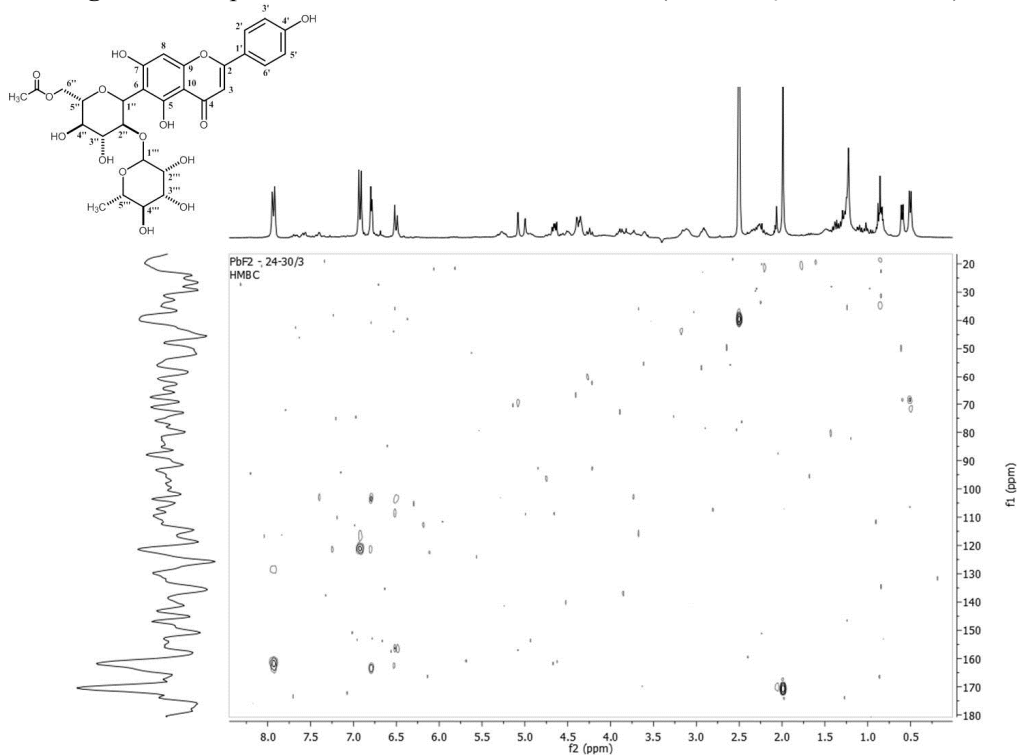


Figura 98 - Espectro de ^1H RMN do flavonoide PbF4 (DMSO- d_6 ; 300 MHz)

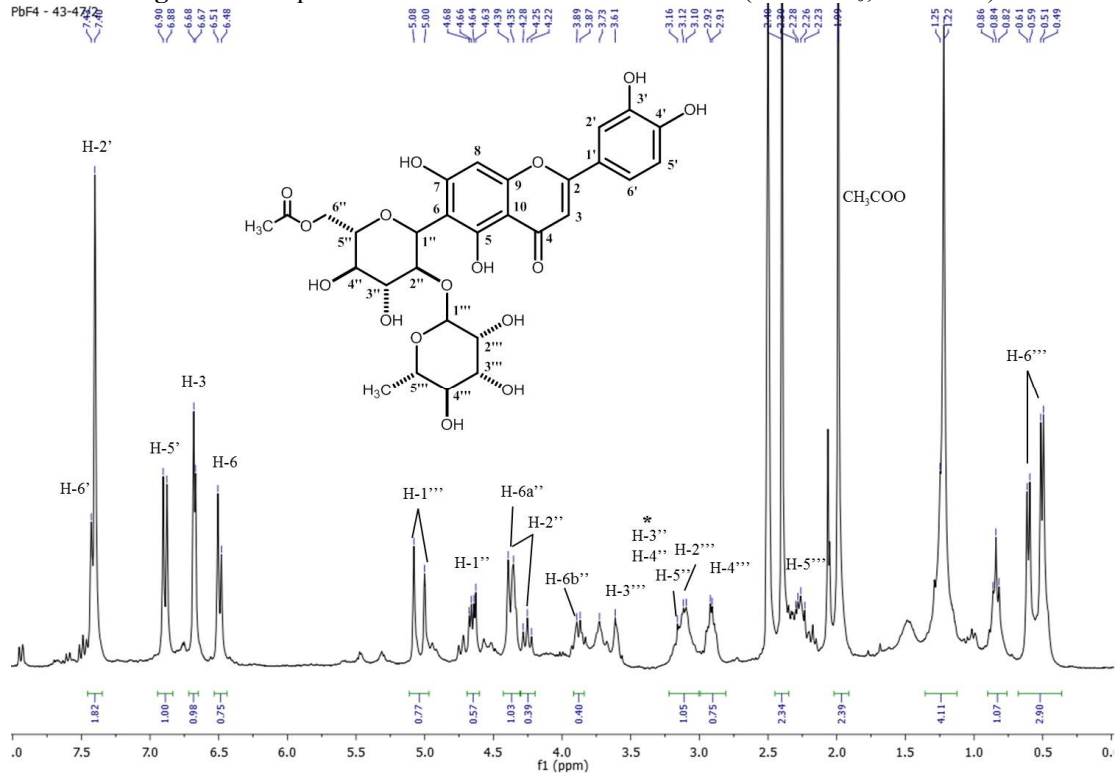


Figura 99 - Espectro de ^{13}C RMN do flavonoide PbF4 (DMSO- d_6 ; 75 MHz)

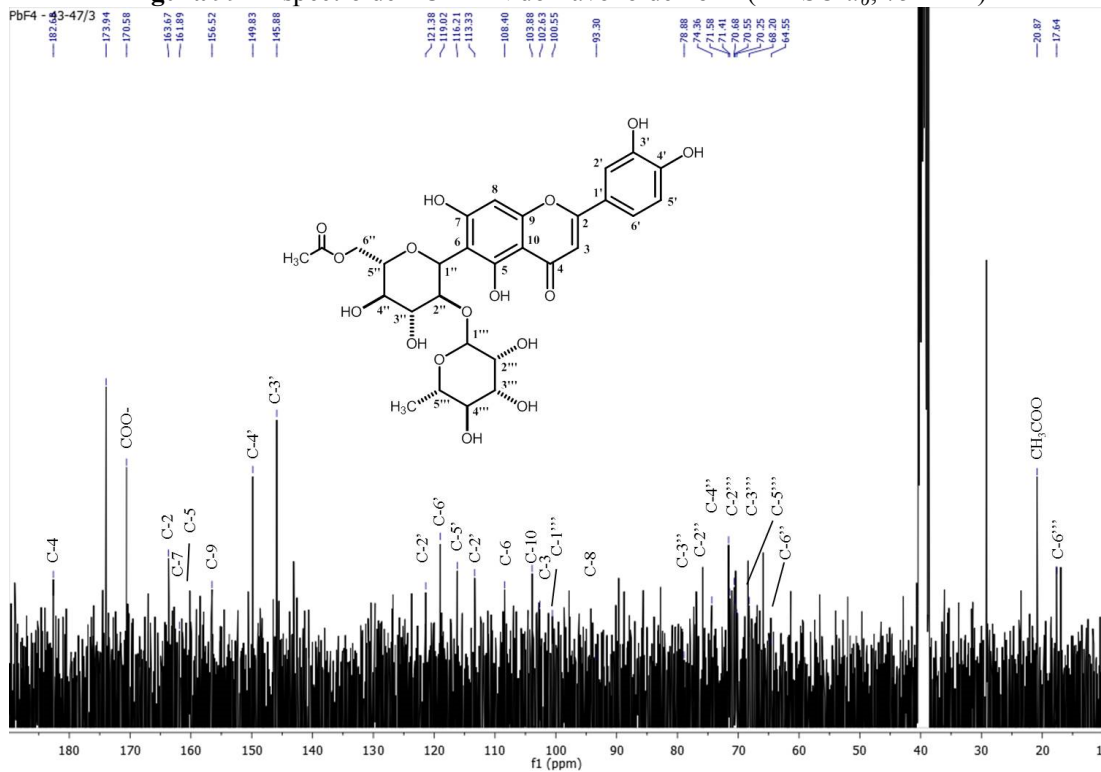


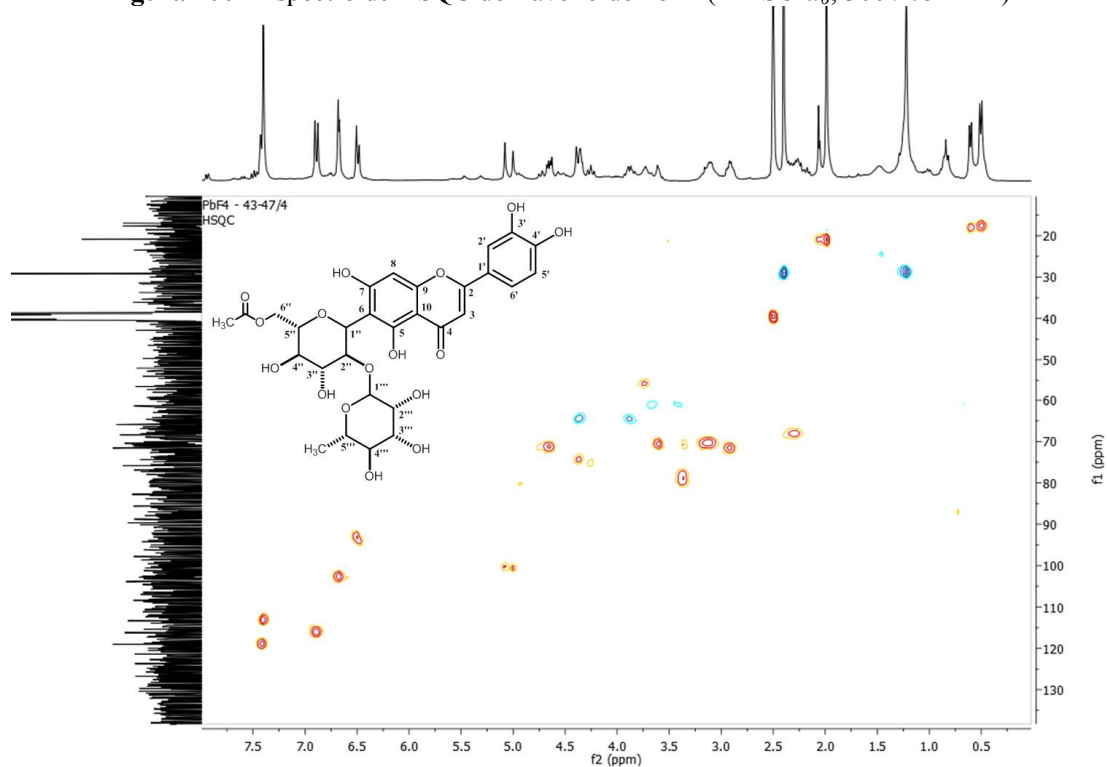
Figura 100 - Espectro de HSQC do flavonoide PbF4 (DMSO- d_6 ; 300 / 75 MHz)

Figura 101 - Espectro de HMBC do flavonoide PbF4 (DMSO- d_6 ; 300 / 75 MHz)

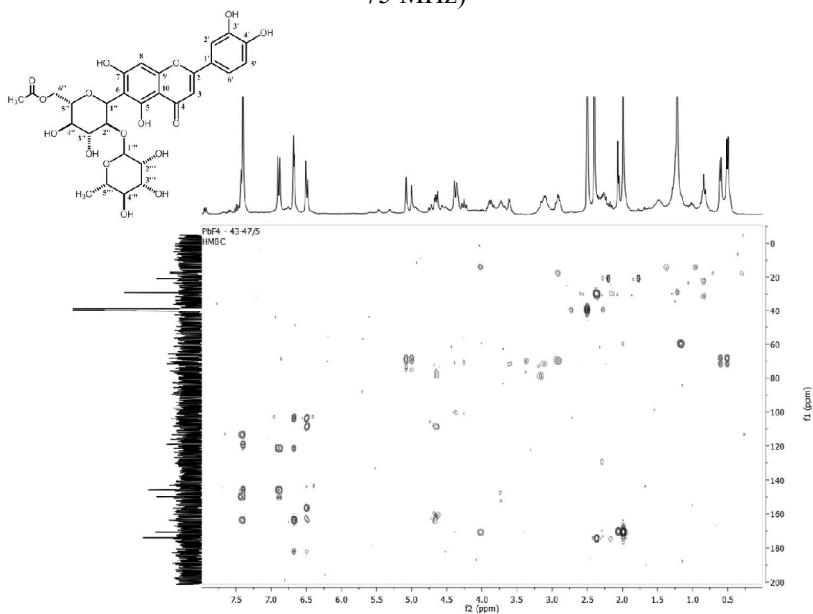
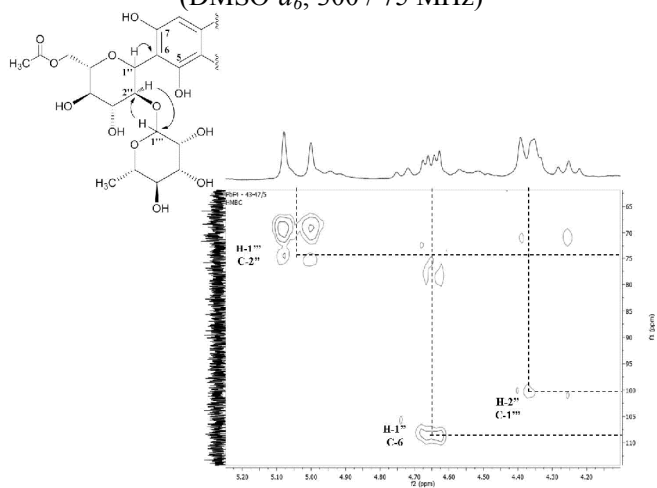


Figura 102 - Ampliação do espectro de HMBC do flavonoide PbF4 (DMSO- d_6 ; 300 / 75 MHz)



6.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, foi possível concluir que:

- A técnica de HSCCC, com eluição em modo gradiente, permitiu o isolamento direto de seis flavonoides *C*-glicosídeos em uma única etapa cromatográfica, a partir da injeção direta do extrato aquoso bruto das folhas de *P. bogotensis*;
- Por meio de técnicas espectroscópicas e espectrofotométricas, foi possível identificar os flavonoides isolados como isovitexina (**1**), isoorientina (**3**), 2''-*O*-ramnosil-isovitexina (**5**) e 2''-*O*-ramnosil-isoorientina (**6**), além de dois flavonoides inéditos, 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetil)- β -D-glicopiranosil-apigenina (**2**) e 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetil)- β -D-glicopiranosil-luteolina (**4**).

DISCUSSÃO GERAL

As espécies do gênero *Passiflora* possuem grande importância no âmbito farmacêutico tendo em vista que extratos de diferentes espécies (principalmente de *P. incarnata*, mas também de *P. alata* e *P. tripartita* var. *mollissima*) são empregados em medicamentos fitoterápicos como sedativos e leves indutores do sono. Adicionalmente, possuem grande emprego popular como calmante e tranquilizante e algumas espécies apresentam ainda relevância econômica pela utilização na indústria alimentícia, especialmente *P. edulis* (LEWIS; ELVIN-LEWIS, 1977; PIO CORREA, 1978;).

A maior parte dos estudos na literatura com as espécies de *Passiflora* foram conduzidos com *P. incarnata* e também com *P. edulis* (var. *edulis* e var. *flavicarpa*). A primeira constitui a espécie mais difundida na Europa e América do Norte, estando descrita em farmacopeias de diferentes países desses continentes. No Brasil, a primeira espécie desse gênero a constar na Farmacopeia Brasileira foi *P. alata* (BRASIL, 1977), a qual também apresenta diversos estudos na literatura, tanto químicos quanto farmacológicos (**Capítulo 1**). *P. edulis*, embora também apresente diversos estudos, somente foi incluída na Farmacopeia Brasileira em sua edição mais recente (5^a ed.) (BRASIL, 2010). Cabe ressaltar que essa atual edição consta com duas monografias de *Passiflora*, cada qual correspondendo a uma espécie, *P. alata* e *P. edulis*. Todavia, a atual edição da Farmacopeia não faz distinção em relação a qual variedade de *P. edulis* é considerada oficial, sendo que estudo da literatura já demonstrou que as espécies *P. edulis* var. *edulis* e *P. edulis* var. *flavicarpa* possuem distintos perfis químicos e também farmacológicos (LI et al., 2011; ZUCOLOTTO et al., 2012).

Em nosso grupo de pesquisa, espécies de *Passiflora*, especialmente *P. alata* e *P. edulis* var. *flavicarpa*, veem sendo estudadas tanto no âmbito químico (BIRK et al., 2005; MADOGLIO et al., 2010; REGINATTO et al., 2001; 2004; ZUCOLOTTO et al., 2012) como também no farmacológico (BARBOSA et al., 2008; DE PARIS et al., 2002; PETRY et al., 2001; REGINATTO et al., 2006; SENA et al., 2009; ZUCOLOTTO et al., 2009). Especialmente sobre o aspecto químico, uma das características que se destaca nessas espécies é a presença de saponinas como metabólitos majoritários em folhas de *P. alata*, em contraste com a predominância de flavonoides C-glicosídeos

em *P. edulis* var. *flavicarpa* (REGINATTO et al., 2001; ZUCOLOTTO et al., 2009).

Em vista da cooperação estabelecida com a Universidad Nacional de Colombia, surgiu o interesse em aprofundar os estudos com as espécies de *Passiflora* amplamente cultivadas e comercializadas na Colômbia. Inicialmente foram selecionadas algumas das espécies de maior ocorrência no território colombiano. Nesta tese foram incluídas inicialmente duas espécies de ocorrência colombiana: *P. quadrangularis* e *P. tripartita* var. *mollissima*.

Conforme apresentado no **Capítulo 5**, a similaridade morfológica entre as espécies *P. quadrangularis* e *P. alata* levou ao interesse de investigar comparativamente a composição química dessas espécies.

Já *P. tripartita* var. *mollissima* possui grande destaque devido ao amplo uso de seus frutos como alimento e também pelo fato do extrato de suas folhas ser empregado terapeuticamente em medicamentos registrados e comercializados em território colombiano.

A inserção de *P. bogotensis* neste trabalho ocorreu posteriormente, durante o estágio doutoral no exterior. Diferentemente dessas espécies anteriormente citadas, *P. bogotensis* não é utilizada como alimento, e o interesse surgiu por se tratar de uma espécie de ocorrência local, para a qual não foram encontrados estudos na literatura.

A partir deste contexto, foi proposto para esta tese a investigação química das espécies *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. bogotensis*.

Cabe mencionar que, simultaneamente, essas espécies estão sendo investigadas sob o ponto de vista farmacológico, com ênfase na atividade no SNC, pela estudante de doutorado Andressa Córneo Gazola, sob orientação do Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e co-orientação da Profa. Dra. Thereza C. M. de Lima. Entre os resultados preliminares desse trabalho destacam-se as atividades sedativas verificadas para os extratos de folhas e pericarpos das espécies *P. quadrangularis*, *P. alata* e *P. edulis* var. *edulis*.

Na primeira parte desta tese foram realizadas diversas análises cromatográficas (CCD, CLAE e CLUE) e também eletroforéticas (EC), com o intuito de caracterizar os principais constituintes químicos dos extratos aquosos das espécies. Até o presente momento, técnicas como CLUE e EC não são consideradas técnicas farmacopêicas, tanto no

Brasil quanto em outros países, e ainda não são tão difundidas nos laboratórios de pesquisa comparativamente ao CLAE, embora apresentem algumas vantagens, conforme já apresentado no **Capítulo 2**.

As análises, tanto cromatográficas quanto eletroforéticas, apontaram a presença de flavonoides como compostos de destaque nos extratos de todas as espécies estudadas. Por meio das várias metodologias empregadas foi possível observar diferentes perfis cromatográficos ou eletroforéticos para os flavonoides entre as espécies. A comparação dos extratos aquosos com padrões de flavonoides C-glicosídeos permitiu a identificação alguns componentes, resultados esses sumarizados na **Tabela 23**.

Tabela 23 - Flavonoides C-glicosídeos identificados nos extratos aquosos das espécies analisadas, por meio de comparações cromatográficas por CCD, CLAE e CLUE e eletroforéticas por EC.

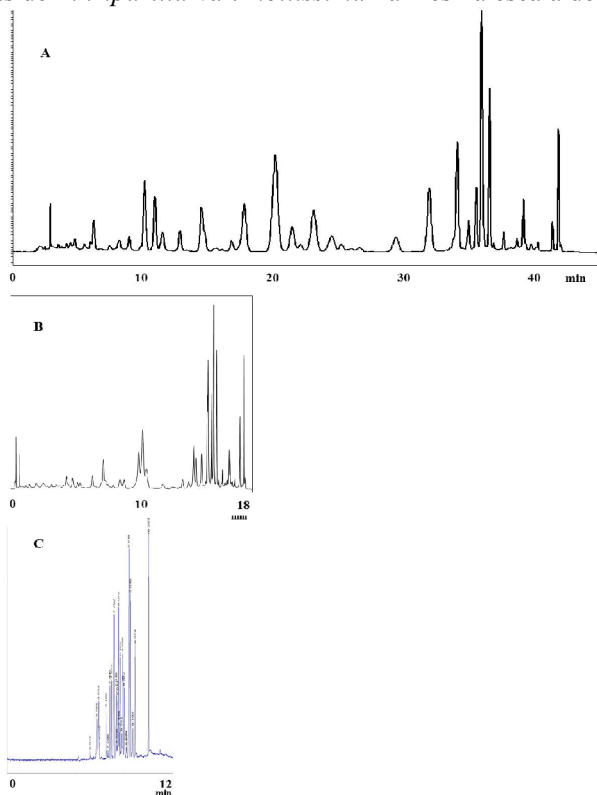
Espécie	Flavonoides C-glicosídeos identificados
<i>P. alata</i>	orientina, isovitexina e vitexina-2''-O-ramnosídeo
<i>P. bogotensis</i>	isoorientina* e isovitexina*
<i>P. quadrangularis</i>	vitexina*
<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	isoorientina, orientina e swertisina

*: substância ainda não descritas na literatura para referida espécie.

As análises por CLAE empregando um gradiente único para todos os extratos, permitiu a diferenciação dos perfis de flavonoides C-glicosídeos, tendo sido observado uma maior diversidade desses compostos na espécie *P. tripartita* var. *mollissima*. Esse dado corrobora com resultados obtidos em estudo prévio (ZUCOLOTTO et al., 2012). Entretanto, no método cromatográfico desenvolvido nesta tese, foi empregada uma constituição de fase móvel diferente da utilizada no estudo anterior. Isso possibilitou uma maior resolução entre alguns picos e consequentemente melhor diferenciação do perfil entre as espécies (**Figura 25, Capítulo 2**). Posteriormente, por meio do aperfeiçoamento do gradiente utilizado, foi possível uma melhor visualização da complexidade da constituição química de flavonoides no extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima*, com a visualização de mais de 20 picos referentes a flavonoides C-glicosídeos (**Figura 26, Capítulo 2**).

Buscando comparar técnicas analíticas distintas, o perfil de flavonoides também foi analisado por CLUE e EC. Em especial para EC, o método desenvolvido permitiu uma melhora na resolução e simetria de picos observados, quando comparados às técnicas cromatográficas (**Figura 32, Capítulo 2**). Considerando o tempo de análise, ambas as técnicas, mesmo possuindo princípios diferentes, permitiram análises mais rápidas que a técnica de CLAE. A fim de proporcionar uma melhor visualização da redução desse tempo requerido em cada técnica, a Figura 32 é apresentada de outra maneira, preservando a escala de tempo (**Figura 103**).

Figura 103 - Comparação dos perfis de flavonoides do extrato aquoso das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima* na mesma escala de tempo.



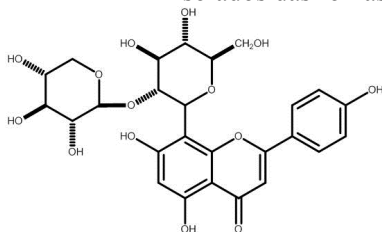
A: cromatograma por CLAE; B: cromatograma por CLUE; C: eletroferograma por EC.

A partir da observação da riqueza de flavonoides nestas espécies, foram iniciados os trabalhos de isolamento e elucidação estrutural desses compostos. Para tanto, foi empregada a Cromatografia Contracorrente, especificamente HSCCC. Essa técnica, por utilizar fase estacionária líquida, não apresenta adsorção dos compostos em fase estacionária sólida, o que geralmente é uma desvantagem nos processos cromatográficos clássicos de isolamento de flavonoides glicosilados.

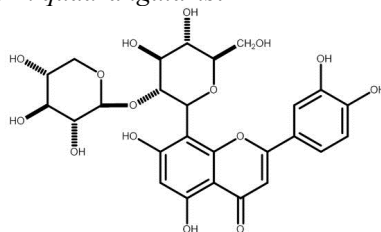
Nesses processos dificilmente se consegue bons rendimentos, impossibilitando às vezes, obter quantidades acima de 20 mg, de modo geral. Dessa forma, é importante o uso de uma técnica que permita uma obtenção rápida, em quantidades suficientes para a realização dos experimentos de identificação e possíveis ensaios farmacológicos, e que garanta a integridade química desses compostos.

Assim, das folhas de *P. quadrangularis*, foram isolados quatro flavonoides *C*-glicosídeos, todos apresentando duas unidades de açúcar na molécula, sendo dois com o núcleo apigenina e dois com o núcleo luteolina (**Figura 104**).

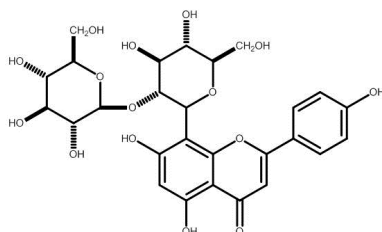
Figura 104 - Estruturas químicas dos flavonoides *C*-glicosídeos isolados das folhas de *P. quadrangularis*.



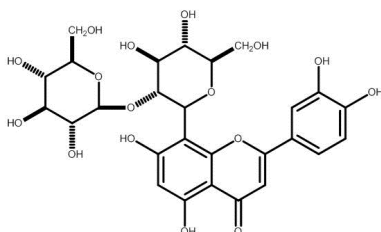
2''-*O*-xilossil-vitexina
(2''-*O*-xilossil-(1→2)-8-*C*-glicosil-apigenina)



2''-*O*-xilossil-orientina
(2''-*O*-xilossil-(1→2)-8-*C*-glicosil-luteolina)



2''-*O*-glicosil-vitexina
(2''-*O*-glicosil-(1→2)-8-*C*-glicosil-apigenina)



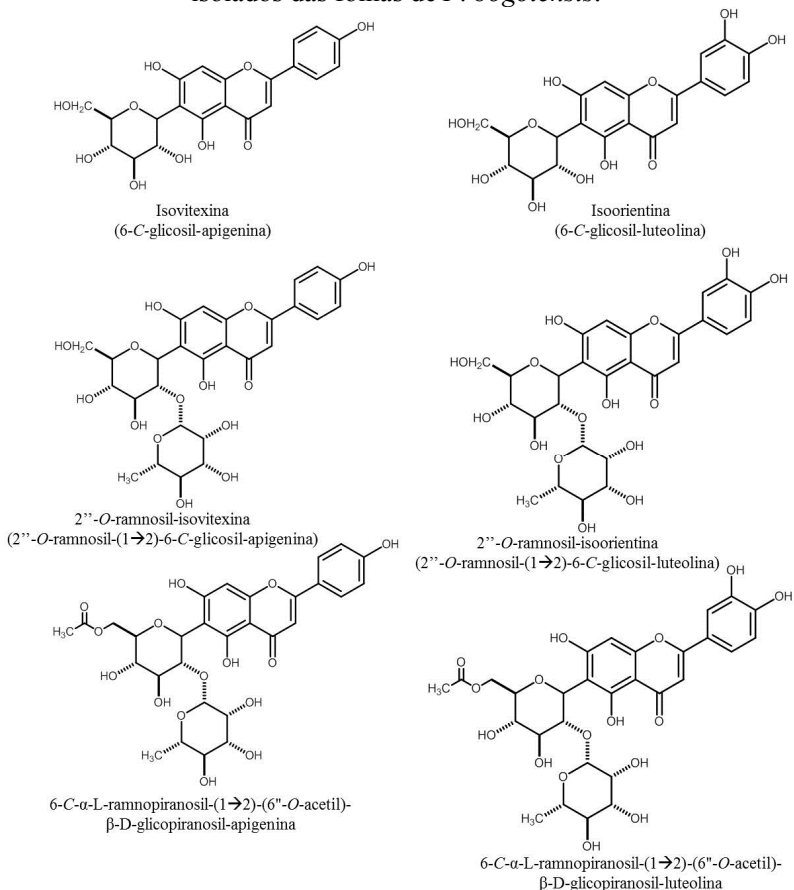
2''-*O*-glicosil-orientina
(2''-*O*-glicosil-(1→2)-8-*C*-glicosil-luteolina)

O isolamento desses flavonoides *C*-glicosídeos foi possível com a utilização da técnica de HSCCC em modo gradiente. O sistema de solventes empregado nesta separação (AcOEt:BuOH:H₂O) foi escolhido tendo como ponto de partida o sistema previamente descrito por Leitão e colaboradores (2005), o qual havia sido utilizado na separação de fenilpropanoides e iridoides. As etapas do gradiente foram determinadas a partir de análises prévias da distribuição dos compostos de interesse entre as fases destas etapas (**Tabela 6, Capítulo 3**).

Este é o primeiro relato do isolamento desses flavonoides a partir do extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*, embora, durante a elaboração dessa tese, três desses flavonoides (vitexina-2''-*O*-xilósídeo, vitexina-2''-*O*-glicosídeo, orientina-2''-*O*-xilósídeo) tenham sido identificados no extrato hidroetanólico dessa mesma espécie com base nos dados de análise por CLAE-DAD-ESI-MS/MS (SAKALEM et al., 2012).

Posteriormente, para o isolamento dos flavonoides *C*-glicosídeos de *P. bogotensis*, foi utilizada a mesma estratégia previamente descrita. A partir do extrato aquoso das folhas de *P. bogotensis*, foram isolados seis flavonoides *C*-glicosídeos, sendo dois deles inéditos na literatura. Cabe ressaltar que, nesse caso, em apenas uma análise, a partir do extrato bruto, foi possível o isolamento direto dessas substâncias (**Figura 105**).

Figura 105 - Estruturas químicas dos flavonoides *C*-glicosídeos isolados das folhas de *P. bogotensis*.



Os flavonoides isovitexina e isoorientina foram previamente observados nas análises qualitativas cromatográficas e eletroforéticas. Em relação aos demais flavonoides isolados, 2''-*O*-ramnosil-isovitexina e 2''-*O*-ramnosil-isoorientina não haviam sido relatados previamente no gênero *Passiflora*, embora Ferreres e colaboradores (2007) tenham descrito flavonas-2''-*O*-deoxihexosil-*C*-hexosídeos para *P. edulis*, sem descrever, contudo, quais hexoses ou a posição de ligação açúcar-genina. Já os flavonoides 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-(6''-*O*-acetil)- β -D-glicopiranosil-luteolina e 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-(6''-*O*-

acetil)- β -D-glicopiranosil-apigenina são descritos aqui pela primeira vez.

Cabe citar que o isolamento por HSCCC não empregou ácido na fase móvel, uma prática comumente executada nos processos clássicos de isolamento de flavonoides glicosilados. O uso do ácido nessas situações, em pequenas concentrações, justifica-se com o objetivo de evitar a ionização desses compostos e obter melhores resoluções, assim como diminuir a perda dos mesmos junto a fase estacionária devido a adsorções irreversíveis. Entretanto, essa prática pode levar a hidrólise de alguns glicosídeos, gerando a perda do constituinte ou ainda, ocasionar o isolamento de estruturas mais estáveis, como um mono-C-glicosídeo ou uma aglicona. Nesse caso, esses flavonoides isolados não corresponderiam aos compostos originalmente presentes no material vegetal. Considerando que dos dez flavonoides isolados nesta tese, oito são flavonoides diglicosilado, é possível assumir que esta técnica permite o isolamento de flavonoides C-glicosídeos mantendo sua integridade estrutural.

Em relação à presença de saponinas, foi observado o acúmulo desses compostos apenas nos extratos aquosos das folhas das espécies *P. alata* e *P. quadrangularis*.

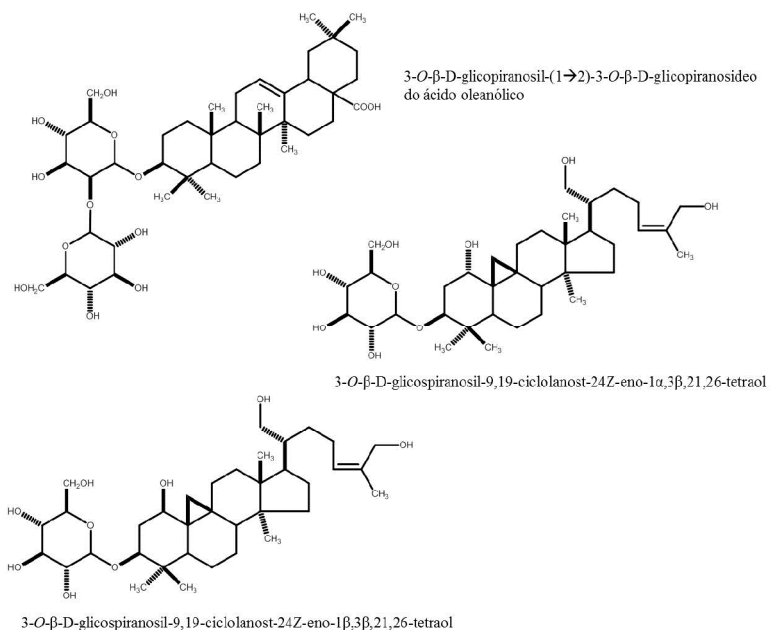
Os perfis de saponinas por CLAE foram obtidos empregando como fase estacionária uma coluna fenila, de acordo com metodologia previamente descrita por Reginatto e colaboradores (2004). Embora essa fase estacionária tenha permitido uma boa separação desses compostos, a não disponibilidade dessa fase estacionária para CLUE, impossibilitou as análises desses compostos por esta técnica. Por EC, por sua vez, a análise de saponinas poderia ser realizada seguindo o mesmo modo de separação que o anteriormente empregado para flavonoides C-glicosídeos, embora as saponinas não sejam facilmente ionizáveis, em especial aquelas que não apresentam grupamentos ácidos. Nesse caso, uma alternativa seria a utilização de outros tipos de separação eletroforética, como por exemplo, a Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC, do inglês '*micellar electrokinetic chromatography*') (SHEU; CHEN, 1995; UNGER, 2009). Nesse caso, a adição de um tensoativo ao eletrólito de corrida leva a formação de micelas juntos aos compostos de interesse, que antes se encontravam neutro. Isso permitiria uma mobilidade eletroforética diferenciada destes compostos no EOF, e sua consequente separação.

Nas análises por CCD e CLAE, utilizando amostra de referência da saponina quadrangulosídeo, foi possível observar a presença dessa saponina como a majoritária tanto para o extrato aquoso das folhas de *P. alata* como para *P. quadrangularis*. Adicionalmente, foi observado uma grande variedade desses compostos nessas duas espécies (**Figura 34, Capítulo 2**).

A partir dessa constatação, foram iniciados os trabalhos de isolamento e elucidação estrutural das saponinas presentes no extrato aquoso das folhas de *P. quadrangularis*. Priorizou-se o estudo das saponinas dessa espécie tendo em vista que *P. alata* já vem sendo estudada pelo nosso grupo (REGINATTO et al., 2001, 2004; BIRK et al., 2005; MADOGLIO, 2010).

Foram isoladas seis saponinas, sendo três a partir da fração BuOH do extrato aquoso, as quais não são apresentadas nesta tese pois ainda se encontram em processo de identificação. As três saponinas já identificadas foram isoladas a partir da fração AcOEt (**Figura 106**).

Figura 106 - Estruturas químicas das saponinas isoladas das folhas de *P. quadrangularis*

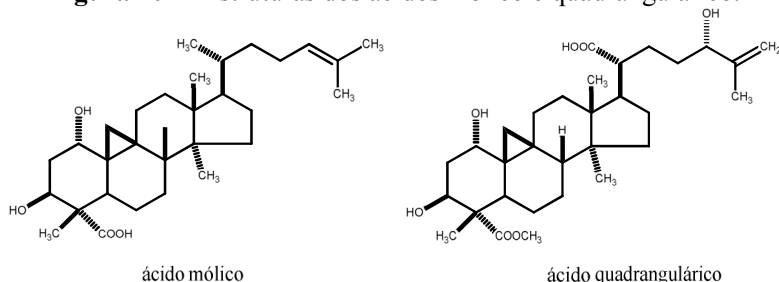


O 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico já havia sido previamente relatado para a espécie *P. quadrangularis* (ORSINI et al., 1987; SAKALEM et al., 2012), assim como para *P. alata* (REGINATTO et al., 2001).

As outras duas saponinas isoladas possuem núcleo cicloartano, comum para outras saponinas previamente descritas espécies desse gênero (BOMBARDELLI et al., 1975; ORSINI et al., 1986; SAKALEM et al., 2012). Essa característica sugere uma possível rota biossintética comum a diversas saponinas nas espécies de *Passiflora*, especialmente se considerarmos a estrutura do quadrangulosídeo, saponina majoritária das espécies *P. alata* e *P. quadrangularis*.

A característica estrutural diferencial dessas saponinas é quanto a presença de uma hidroxila na posição 1. Esse grupamento nessa posição, entretanto, tampouco é algo incomum, já tendo sido descrito, por exemplo, para os ácidos mólico e quadrangulárico e seus glicosídeos, isolados de espécies *Combretum molle* e *C. quadrangulare* (BANSKOTA et al, 2000; FACUNDO et al., 1993; PEGEL; ROGERS, 1976) (**Figura 107**), assim como para as saponinas ‘ciclopasiflosideos’ (YOSHIKAWA et al., 2000a,b) (**Figura 15, Capítulo 1**).

Figura 107 - Estruturas dos ácidos mólico e quadrangulárico.



Referência: Facundo e colaboradores (1993); Pegel; Rogers (1976)

A diferença observada entre essas duas saponinas inéditas, diz respeito à orientação do grupamento hidroxila na posição 1 do núcleo cicloartano. Essa pequena diferença dificulta a separação cromatográfica dessas substâncias, em especial por CCD, na qual ambas apresentam R_f muito semelhantes. O isolamento foi obtido apenas por CLAE em modo preparativo. A diferença estrutural foi observada somente após análise detalhada dos espectros de correlação de RMN, observando-se os valores de carbono e hidrogênios principalmente do anel A do núcleo

cicloartano, assim como dos valores dos hidrogênios na posição 19 do grupamento ciclopropano. Todavia, necessitam-se análises mais detalhadas para a confirmação da configuração deste grupamento. Nesse sentido, espectros de NOESY serão realizados.

A constatação de certa similaridade química entre os extratos aquoso das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata*, em virtude principalmente das saponinas, e somado ao fato da morfologia das folhas e flores dessas espécies também serem bastante semelhantes, suscitaram o interesse na realização de uma análise química comparativa entre essas espécies.

Até o presente momento, havia inclusive alguns trabalhos na literatura que davam margem a incertezas quanto às composições químicas dessas espécies, conforme discutido no **Capítulo 5**. Sendo assim, com base nos resultados previamente descritos, foi elaborada uma publicação na qual foram sugeridos os flavonoides C-glicosídeos majoritários como marcadores químicos na diferenciação destas espécies. Esses resultados são relevantes, já que representam um dado importante na caracterização química de espécies de *Passiflora* nativas da América do Sul, contribuindo para a padronização de extrativos vegetais que contenham estas espécies como componentes ativos.

A presença de alcaloides em espécies de *Passiflora* tem sido investigada desde a década de 70, devido ao interesse em determinar o papel desses compostos nas atividades farmacológicas sobre o SNC. Alguns trabalhos neste período descreveram a presença de alcaloides em diversas partes do vegetal, nas espécies *P. incarnata* (POETHKE et al., 1970) e para *P. edulis* (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI, MALEK; RYBACKA, 1975).

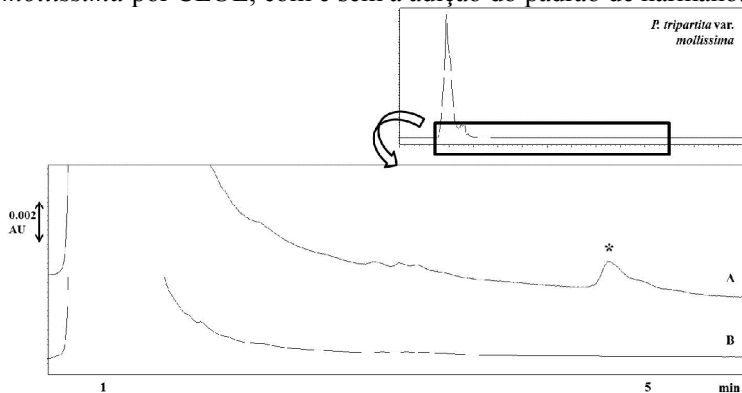
Como citado anteriormente no **Capítulo 1**, estudos neurofarmacológicos recentes com alcaloides do tipo harmano demonstraram que os mesmos possuem ação estimulante do SNC, pela inibição da monoamina oxidase (MAO), e não atividade sedativa (HARRAIZ et al., 2010; HERRAIZ; CHAPARRO, 2005; McKENNA, 2004). Adicionalmente a esse fato, análises químicas realizadas com espécies de *Passiflora*, utilizando com metodologias mais sensíveis e robustas (como CLAE), não detectaram a presença desses alcaloides em concentrações superiores a 0,1 ppm (GRICE; FERREIRA; GRIFFITHS, 2001; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; SANTOS et al., 2006).

Todavia, a não detecção desses alcaloides em concentrações consideráveis não significa que não poderiam estar presentes em outras espécies de *Passiflora*. Nesse contexto, foi investigada a possível presença dessa classe de metabólitos nos extratos aquosos das espécies estudadas. Contudo, não foi possível observar a presença desses compostos em nenhum dos extratos, analisados por diferentes técnicas cromatográficas (CCD, CLAE e CLUE) e também eletroforéticas (EC).

Cabe destacar que nesta tese foram avaliados os possíveis teores de alcaloides em extratos aquosos das folhas, cujo preparo não é exaustivo e não sofreu nenhum tipo de pré-concentração previamente as análises, uma vez que se buscou mimetizar as preparações mais comuns da medicina popular.

A partir da realização de uma análise quantitativa, com base em uma curva de calibração do alcaloide harmano, com o intuito de determinar os limites de detecção dos métodos empregados, foi possível constatar a ausência de alcaloides em concentração superior a 0,0187 $\mu\text{g/mL}$ ($=0,0187$ ppm) nos extratos aquosos das espécies citadas conforme foram preparados (**Figura 108**).

Figura 108 - Cromatograma do extrato aquoso de *P. tripartita* var. *mollissima* por CLUE, com e sem a adição do padrão de harmano.



Fonte: autor.

A: extrato aquoso bruto com adição de padrão; B: extrato aquoso bruto sem adição de padrão. *: harmano (0,125 $\mu\text{g/mL}$).

FE: coluna C18 (100 x 2,9 mm; 1,8 μm i.d.); FM: fosfato dibásico de sódio (50mM, pH 8,0):MeOH:ACN; fluxo: 0,2 mL/min; detecção: 245 nm.

Em relação às análises de aminoácidos, por meio de CCD dos extratos aquosos das folhas comparativa com padrões de aminoácidos proteicos foi possível verificar a presença de prolina, ácido glutâmico e ácido γ -aminobutírico em todas as espécies analisadas. Já alanina, entretanto, foi observada apenas para o extrato de *P. quadrangularis*.

Para as análises dos aminoácidos presentes nos extratos aquosos também foram realizadas análises preliminares por EC. Foram avaliadas duas metodologias distintas, em ambas utilizando detecção UV, sem a necessidade de derivatização prévia da amostra.

Descrevendo sucintamente, a primeira metodologia (JIANG et al., 2009) emprega como eletrólito de corrida uma solução de sulfato de cobre (50 mmol L^{-1} , com 0,05% ácido acético, pH 4,5). A presença do cobre em solução promove uma complexação desse cátion com os aminoácidos presentes na amostra, ocasionando um pré-concentração do analito on-line, denominada, em inglês, 'coordination sweeping'. Esse efeito promove um aumento na absorvidade dos aminoácidos, permitindo sua detecção direta por UV, inclusive para aqueles que não possuem grupos cromóforos. Já a segunda metodologia (TAK; SOMSEN; JONG, 2011) utiliza como eletrólito o ácido fórmico (1 mol L^{-1} , pH 1,8), seguido de uma 'junção dinâmica de pH', por meio da injeção de hidróxido de amônio previamente a injeção da amostra, o que ocasiona uma maior absorvidade dos aminoácidos. Nas análises preliminares realizadas com esses métodos, não foi obtida a reprodução dos resultados dos autores, embora o uso do ácido fórmico como eletrólito tenha mostrado resultados mais promissores. Esses resultados, entretanto, não são apresentados nesta tese, pois ainda são necessários ajustes dessas metodologias ou ainda desenvolvimento de novas para alcançar resultados conclusivos.

O conjunto de resultados obtidos nesta tese vem a contribuir para o conhecimento químico de espécies de *Passiflora* nativas da América do Sul, ao apresentar diferentes metodologias analíticas para a caracterização desses extrativos vegetais, sugerir potenciais marcadores químicos, e também identificar novos constituintes químicos destas espécies, em especial, flavonoides em *P. quadrangularis* e *P. bogotensis* e saponinas em *P. quadrangularis*. Além das publicações anexadas a tese, outras publicações serão elaboradas com bases nos resultados obtidos e apresentados nos capítulos 2, 3 e 4.

A partir da investigação realizada vários aspectos adicionais surgiram e que não puderam ser abordadas no âmbito deste trabalho de doutorado e que serão abordadas em investigações futuras:

As folhas das espécies *P. quadrangularis* e *P. alata* possuem uma grande diversidade de saponinas, sendo que a identificação de novas substâncias para essas espécies ainda se faz possível. Adicionalmente, ensaios farmacológicos com essa classe de compostos, inclusive ensaios toxicológicos, são oportunos, visto que estudos recentes veem demonstrando esses efeitos para os extratos aquosos de *P. alata* (**Capítulo 1**).

A espécie *P. bogotensis*, cujos resultados obtidos nesta tese contribuem com o conhecimento químico dessa espécie, ainda carece de estudos farmacológicos. A realização desses ensaios, inclusive de seus possíveis efeitos sobre o SNC, se mostra interessante e necessária, para que também haja um aporte em relação as suas potenciais atividades farmacológicas.

P. tripartita var. *mollissima* possui grande importância, visto que, além de se tratar de uma das espécies de *Passiflora* mais representativas da Colômbia há produtos farmacêuticos, aprovados pelo Instituto Nacional de Vigilância de Medicamentos e Alimentos da Colômbia (INVIMA, 2009), que contêm extrato das folhas dessa espécie para uso como sedativo e hipnótico. Nesse sentido, a caracterização química e farmacológica dos extratos das folhas dessa espécie é de grande relevância farmacêutica.

Nossos resultados mostraram a grande diversidade de flavonoides C-glicosídeos no extrato aquoso das folhas dessa espécie, em concordância com trabalho recém-publicado, que descreveu diversos flavonoides para os frutos dessa espécie (SIMIRGIOTIS et al., 2013). Entretanto, as avaliações neurofarmacológicas realizadas até o presente momento não apontaram atividades sedativas ou hipnóticas para o extrato aquoso utilizado nesta tese. Desse modo, novas avaliações estão em andamento com extratos preparados de modo similar (hidroetanólico) ao empregado como matéria prima em medicamentos fitoterápicos. Para esse extrato também serão realizadas análises de caracterizações químicas, com base em métodos desenvolvidos nesta tese.

Parte desses trabalhos aqui apresentados como perspectivas tendem a ser realizados brevemente em um programa de investigação intitulado RITFRUTBIO, recentemente aprovado por órgão de fomento colombiano (COLCIENCIAS), junto a Universidad Nacional de

Colombia, e que contempla uma bolsa de pós-doutorado inserida no subprojeto *Caracterización metabólica, de la actividad biológica y funcional de especies frutales tropicales*, coordenado pelo Prof. Dr. Freddy Alejandro Ramos.

CONCLUSÕES GERAIS

- Flavonoides *C*-glicosídeos foram observados em todas as espécies analisadas, com um perfil distinto para cada espécie, visualizado tanto por técnicas cromatográficas quanto por eletroforéticas. *P. tripartita* var. *mollissima* foi a espécie que apresentou o perfil de flavonoides *C*-glicosídeos mais complexo.
- Nas folhas das espécies de *Passiflora*, as análises iniciais comparativas com padrões disponíveis no laboratório permitiram detectar os seguintes flavonoides *C*-glicosídeos:
 - *P. alata*: orientina, isovitexina e vitexina-2''-*O*-ramnosídeo;
 - *P. quadrangularis*: vitexina
 - *P. bogotensis*: isoorientina e isovitexina
 - *P. tripartita* var. *mollissima*: isoorientina, orientina, vitexina, swertisina, 4'-*O*-metil-8-*C*-(6''-acetil)-glicopiranosil-luteolina
- A partir do extrato aquoso bruto das folhas de *P. quadrangularis* foram isolados e identificados quatro flavonoides glicosilados: 2''-*O*-xilossil-vitexina, 2''-*O*-glicosil-vitexina, 2''-*O*-xilossil-orientina, 2''-*O*-glicosil-orientina.
- Do extrato aquoso bruto das folhas de *P. bogotensis* foram isolados seis flavonoides glicosilados: isovitexina, isoorientina, 2''-*O*-ramnosil-isovitexina e 2''-*O*-ramnosil-isorientina, além de dois *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides inéditos: 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetil)- β -D-glicopiranosil-apigenina e 6-*C*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(6''-*O*-acetil)- β -D-glicopiranosil-luteolina
- A presença de saponinas foi observada nas folhas de *P. quadrangularis* e *P. alata*. A saponina quadrangulosídeo foi identificada como a majoritária nos extratos aquosos brutos de ambas as espécies.
- A partir da fração acetato de etila das folhas de *P. quadrangularis* foram isoladas três saponinas: 3-*O*- β -D-glicopiranosil-1 α ,3 β ,21,26-tetrahidroxi-9,19-ciclolanost-24Z-eno, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-1 β ,3 β ,21,26-tetrahidroxi-9,19-ciclolanost-24Z-eno, essas descritas

pela primeira vez na literatura, e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo do ácido oleanólico.

- Análises comparativas por CLAE-DAD dos perfis de flavonoides e saponinas de *P. quadrangularis* e *P. alata* permitiram estabelecer potenciais marcadores químicos, com base nos flavonoides majoritários das folhas de cada espécie, sendo estes identificados e quantificados. O teor de vitexina-2''-*O*-xilósídeo em folhas de *P. quadrangularis* foi de $29,16 \pm 0,11$ mg/g de extrato, e o teor de vitexina-2''-*O*-ramnosídeo em folhas de *P. alata* foi de $31,23 \pm 0,04$ mg/g de extrato.
- As análises cromatográficas (CCD, CLAE e CLUE) e eletroforéticas (EC) qualitativas não indicaram a presença de alcaloides do tipo harmano nos extratos aquosos brutos das espécies analisadas neste trabalho.
- Análises quantitativas permitiram afirmar que os extratos aquosos brutos das folhas das espécies de *Passiflora* analisadas não possuem alcaloides do tipo harmano em concentração superior a 0,0187 ppm.
- Em relação à constituição de aminoácidos, foi observada a presença de prolina, ácido glutâmico e ácido γ -aminobutírico em todas as espécies analisadas. Para *P. quadrangularis* foi observada ainda a presença de alanina.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.K.; BANSAL, M. Flavonoids glycosides. In: AGRAWAL, P.K. (Ed) **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier Science Publishers. 1989. p.283-364.
- AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H. R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy**. v.26, p. 363-367, 2001.
- AMARAL, K. M.; SCHENKEL, E. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas Wistar. **Acta Farmacêutica Bonaerense**. v. 20, p. 215-20, 2001.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. M. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- ARBELAEZ, E. P. **Plantas utiles de Colombia**. 5ª ed. Bogotá: Jardim Botânico José Celestino Nutis, 1996.
- ASTURIZAGA, A. S.; OLLGAARD, B.; BALSLEV, H. Frutos comestibles. **Botânica Econômica de los Andes Centrales**, p.329-346, 2006.
- AVULA, B.; WANGA, Y.H.; RUMALLA, C.S.; SMILLIE, T.J.; KHAN, I.A. Simultaneous Determination of Alkaloids and Flavonoids from Aerial Parts of *Passiflora* Species and Dietary Supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. **Natural Product Communications**. v.7, p.1177-1180, 2012.
- 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, p. 282- 288, 2008.

BARRIGA, H.G. **Flora Medicinal de Colombia**. Bogotá: Instituto de Ciências Naturales, 1975.

BASKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; TRAN, K.Q.; TANAKA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Thirteen Novel Cycloartane-Type Triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Journal of Natural Products**. v.63, p.57-64, 2000.

BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1097–1105, 2007.

BHATTARAM, V.A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**. v.9, p.1-33, 2012.

BHUSHAN, R. Amino Acids. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. (Eds). **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008, p.299-330.

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 and Related Technology**. v.28, p.2285-2291, 2005.

BLUMENTHAL, M.; GOLDEBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs**. Austin: American Botanical Council. p.293-296, 2000.

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.

BOMBARDELLI, E.; BONATTI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2661-2665, 1975.

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

BRAGA, A; STEIN, A.C.; STOLZ, E.D.; DALLEGRAVE, E.; BUFFON, A; DO REGO, J.C.; GOSMANN, G., VIANA, A.F.; RATES, S.M.K. Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**. v.145, p. 59-66, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília, DF, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília, DF, 2010.

MEIER, B., *Passiflora incarnata* L. Flor-da-Paixão: Retrato de uma planta medicinal. **Zeits Phytotherapie**. v.16, p.115-126, 1995.

CARDOSO, R.H.; CÓRDOBA, S.L.; GONZALEZ, J.D; GUZMÁN, J.R.; LANCHEROS, H.O.; MESA, L.I.; PACHECO, R.A.; PÉREZ, B.A.; RAMOS, F.A.; TORRES, M.E.; ZUÑIGA, P.T. **Especies útiles en la Región Andina de Colombia, Tomo II**. Jardín Botánico de Bogotá, Bogotá: Imprensa Nacional de Colombia, 2011.

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

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

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.

CCI – Corporación Colombia Internacional. **Maracuyá**. Bogotá: Perfil de Producto, 2002.

CHIMICHI, S.; MERCATI, V.; MONETI, G.; RAFFAELLI, G.; TOJA, E., Isolation and Characterization of an unknown flavonoid in dry extracts from *P. incarnata*. **Natural Product Letters**, v,11, p.225-232, 1998.

CHOPIN, J.; DURIX, A.; BOUILLANT, M.L. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris**., Series C, v.266, p.1334, 1968.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M.L. C-glycosylflavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J; MABRY, H. **The Flavonoids**. New York: Academic Press. 1975. p.613.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; LIMA, T.C.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 1067-73, 2006.

COLOMBIA. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. **Encuesta Nacional Agropecuaria**. Bogotá, 2011.

COMPAGNONE, R. S.; SUAREZ, A. C.; LEITAO, S. G.; MONACHE, F. D. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, p.6-10, 2008.

CONWAY, W. D. **Contercurrent Chromatography. Apparatus , Theory and Applications**. New York: Wiley & Sons Inc. 1990.

CONWAY, W. D. Counter-current chromatography: Simple process and confusing terminology. **Journal of Chromatography A**. v.1218, p.6015-6023, 2011.

COSTA, F. N.; LEITAO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **Journal of Separation Sciences**. v.33, p.336-347, 2010.

COSTA, G.M., ORTMANN, C.F., SCHENKEL, E.P., REGINATTO, F.H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v.22, p.1096-1102, 2011.

COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; ZUCOLOTTI, S.M.; REGINATTO, F.H. CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P. Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis. and *Passiflora quadrangularis* Linn. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**. no prelo. 2013.

COURTS, F.L.; WILLIAMSON, G. The C-glycosyl flavonoid, aspalathin, is absorbed, methylated and glucuronidated intact in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.53, p.1104-1111, 2009.

DA CUNHA, N.S. **De Von Martins aos Ervateiros da Bahia**, 1941.

DA SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B; COLOMEU, T.C, BATISTA, A.G; MELETTI, L.M.M; PASCHOAL, J.A.R.; JÚNIOR, S.B.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; JÚNIOR, M.R.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**. No prelo. 2013.

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.; DHAWAN, S; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.1-23, 2004.

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, p. 5-8, 2002.

DE SOUZA, M. S. S.; BARBALHO, S. M.; DAMASCENO, D.C.; RUDGE, M.V.C.; DE CAMPOS, K.E.; MADI, A.C.G; COELHO,B.R.; OLIVEIRA, R.C.; DE MELO, R.C.; DONDA, V.C. Effects of *Passiflora edulis* (Yellow Passion) on Serum Lipids and Oxidative Stress Status of *Wistar* Rats . **Journal of Medicinal Food**. v.15, p.78-82, 2012.

DER MARDEROSIAN, A. **The review of natural products**. St. Louis: Facts and Comparisons. 2004. p. 455-458.

DESCHNER, E.E. Dietary quercetin and Rutin. In: HO, C.T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.T. **Phenolic compounds in food and their effects on health II**. Washington: American Chemical Society, p.265-268, 1992.

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, p.371-374, 2005.

DU, Y.; WANG, F.; LI, H.; ZHANG, W.; CHENG, Z.; YING, X.; KANG, T. Tissue distribution and pharmacokinetics of vitexin-2''-O-rhmanoside in mice after oral and intravenous administration. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.30, p.1519-1524, 2011.

DUBOIS, M.A.; ILYAS, M.; WAGNER, H. Cussonosides A and B, two triterpenes saponins from *Cussonia barteri*. **Planta Medica**. v.52, p.80-83, 1986.

EDWIN, E.; SHEEJA, E.; DHANABAL, S. P.; 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, p. 940-949, 2010.
- ESCOBAR, L. A. Passifloraceae. In: PINTO, P.; LOZANO, G. (eds). **Flora de Colombia**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1988.
- FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**. v.32, p.411-415, 1993.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005, 677 p.
- FERRERES, F.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P.B.; Valentao, P.; Tomás-Barberán, F.A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1161, p.214–223, 2007.
- FILMORE, D. HSCCC and natural food pigments. **Today's Chemistry**. v.10, p.21-22, 2001.
- FLORA BRASILEIRA. 1ª Enciclopédia de Plantas do Brasil. v. 3. São Paulo: Três Livros, 1984.
- GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.
- GEIGER, H.; MARKHAM, K.R. The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift für Naturforschung B**. v.41, p.949-950, 1986.
- GERVASIO, A.P.G; LAVORANTE, A.F.; MORAES, M.C.B.; GINÉ, M.F. MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**. v.26, p.65-74, 2003.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. *Passiflora incarnata* – Monographie médicalisée. **Phytothérapie**, v.5, p.281 – 284, 2007.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.43-49, 2005.

GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A., GRIFFITHS, L. R. Identification and simultaneous analysis of hamane, harmine, harmol, isovitexin, and vitexin in *Passiflora incarnata* extracts with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, p. 2513-2523, 2001.

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 Medica**. v. 74, p. 1769-1773, 2008.

GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical and Biomedical Chemistry**. v.397, p.1069-1082, 2010.

GUPTA M.A. **Plantas medicinales Iberoamericanas**. Bogotá: CYTED-Secab-UNESCO, 1995.

GUPTA, R.K.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A.K.; MAITHANI, M.; SINGH, R.. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v.139, p. 801-806, 2012.

HATTORI, M.; SHU, Y.Z.; SEDAWY, E.; NAMBA, T. Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. **Journal of Natural Products**, v.51, p.874-878, 1988.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J; MABRY, H. **The Flavonoids**. New York: Academic Press. 1975. p.613.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HAMILTON, M. L.; CAULFIELD, J. C.; PICKETT, J. A.; HOOPER, A. M. C-Glucosylflavonoid biosynthesis from 2-hydroxynaringenin by *Desmodium uncinatum* (Jacq.) (Fabaceae). **Tetrahedron Letters.**, v.50, p.5656-5659. 2009.

HELLER, M. **Eletroforese capilar aplicada ao estudo de adulterações de amostras em uísques.** Florianópolis, 2010. 74p.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.326, p.378–386, 2005.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.839–845, 2010.

HIDAKA, K.; ITO, M.; MATSUDA, Y.; KOHDA, H.; YAMASAKI, K.; YAMAHARA, J.; CHISAKA, T.; KAWAKAMI, Y.; SATO, T.; KAGEI, K.; New triterpeno saponins from *Ilex pubescens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.35, p.524-529, 1987.

HOFFMANN, D. **Medical Herbalism:** The science and practice of herbal medicine. Rochester: Healing Arts Press, 2003.

HORHAMMER, L.; WAGNER, W.; GLOGGENLESSER, F., *Archiv der Pharmazie*, p.291, 1958. *apud* BANDYUKOVA, V.A.; YUGIN, V.A. Natural Flavonoids C-glycosides. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**. v.1, p.5-24, 1981.

HOSTTETMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins.** Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 548 p.

IBGE. **Produção agrícola municipal.** 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2007/comentari o.pdf>. Acesso em 20 de março de 2013.

ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)**. London, 2005.

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, p.718-721, 2006.

INVIMA – Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. **Normatividad para Productos Fitoterapéuticos**. 2009. Disponível em:

<http://www.invima.gov.co/Invima//normatividad/farmaceuticas.jsp?codigo=190>. Acesso em: 08 de novembro de 2012.

JAY, M.; VIRICEL, M.R.; GONNET, J.F. C-glycosylflavonoids. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. (Coord.) **Flavonoids**. Boca Raton: CRC Press. 2006.

JAROSZEWSKI, J.W.; OLAFSDOTTIR, E.S.; WELLENDORPH, P.; CHRISTENSEN, J.; FRANZYK, H.; SOMANADHAN, B.; BUDNIK, B.A.; JØRGENSEN, L.B.; CLAUSEN, V. Cyanohydrin glycosides of *Passiflora*: distribution pattern, a saturated cyclopentane derivative from *P. guatemalensis*, and formation of pseudocyanogenic α -hydroxyamides as isolation artefacts. **Phytochemistry**, v. 59, p.501-511, 2002.

JASTRZEBSKA, I. Chemistry of Steroidal Sapogenins – New Advances in a Classical Field. **Current Organic Chemistry**, v.16, p.353-337, 2012.

JIANG, X.; XIA, Z.; WEI, W.; GOU, Q. Direct UV detection of underivatized aminoacid using capillary electrophoresis with online sweeping enrichment. **Journal of Separation Science**. v.32, p.1927-1933. 2009.

KONTA, E.M.; ALMEIDA, M.R.; AMARAL, C.L; DARIN, J.D.C.; DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the Antihypertensive Properties of

Yellow Passion Fruit Pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in Spontaneously Hypertensive Rats. **Phytotherapy Research**. *No prelo.* 2013.

KREEN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; PETR, U.; KOPP, B. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. **Zeitschrift Naturforsch**, v.58, p.11-16, 2003.

LEITÃO, G.G.; EL-ADJI, S.S.; DE MELO, W.A.L.; LEITÃO, S.G.; BROWN, L. Separation of Free and Glycosylated Flavonoids from *Siparuna guianensis* by Gradient and Isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.28, p.2041–2051, 2005.

LEITÃO, G.G; DE SOUZA, P.A; MORAES, A.A. BROWN, L. Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.28, p.2053–2060, 2005.

LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P. F. **Medical botany**: Plants affecting man's health. Toronto: Wiley-Interscience, 1977, 515 p.

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, p.1085-1090, 2011.

LI, Y.; LIANG, X.; XIAO, H.; BIA, K., Determination of spinosin in rat plasma by reversed-phase high-performance chromatography after oral administration of Suanzaoren decoction, **Journal of Chromatography B**, v.787, p.421–425, 2003.

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-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 308-314, 2007.

LORENZI, H., MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 371-374, 2008.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische Untersuchungen der Drogen der Gattung *Passiflora*. IV. Mittlg: Der Vergleich des Alkaloidgehaltes in verschiedenen Harmandrogen. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.

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* form *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, p. 112-21, 1975.

MA, G.; JIANG, X.H.; CHEN, Z.; REN, J.; LI, C.R.; LIU, T.M. Simultaneous determination of vitexin-4''-O-glucoside and vitexin-2''-O-rhamnoside from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by HPLC method and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.243–249, 2007.

MADOGGIO, F.A. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. Florianópolis, 2011. 219p.

MAHATO, S.; KUNDU, A. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, p.1517-1575, 1994.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, p.214-222, 2009.

MALUF, E.; BARROS, H. M. T.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BENTI, R.; LEITE, J. R. Assesment of the Hypnotic/Sedative Effects and Toxicity of *Passiflora edulis* Aqueous Extract in Rodents and Humans. **Phytotherapy Research**, v. 5, p. 262-266, 1991.

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

MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. **Planta Medica**, v. 69, 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, p. 3486- 3487, 1991.

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

MARONA, H.R.N.; SCHENKEL, E.P.; ORTEGA, G.G.; BERGENTHAL, D. Aminoácidos não protéicos de *Ateleia glazioviana* Baillon. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v.15, p.183-95, 1993.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. (Coord.) **Flavonoids**. Boca Raton: CRC Press. 2006.

MARTIUS C.F.P. **Systema de Materia Medica Vegetal Brasileira**. Rio de Janeiro: Eduardo & Henrique Laemmert, 1854.

MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização em São Paulo**. Campinas: IAC, 1996. 26 p.

McKENNA, D.J. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p.111 – 129, 2004.

MEIER, B. *Passiflorae herba* – Pharmazeutische Qualität. **Zeitschrift für Phytotherapie** v.16, p.90-99, 1995.

MOLNÁR-PERL I; FÜZFAI, Z.S. Chromatographic, capillary eletrophoretic and capillary eletrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1073, p.201-227, 2005.

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, p.281–288, 2007.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, 2000. 247 p.

MOVAFEGH, A.; ALIZEDEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study. **Anesthesia & Analgesia**, v.106, p.1728-1732, 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, p. 399-403, 2005.

NATIONAL JUICE PRODUCTS ASSOCIATION. **World Crop Report Passion Fruit**. Sydney, 2003. Disponível em: www.njpa.com/ifu/crop/passionfruit.ppt. Acesso: 23 de abril de 2013.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effect of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, p.6, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEUE, U.D.; KELE, M. Performance of idealized column structures under high pressure. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.236-244, 2007.

NGAN, A.; CONDUIT, R. A double-blind, placebo-controlled investigation of the effects of *Passiflora incarnata* (passionflower) herbal tea on subjective sleep quality. **Phytotherapy Research**, v.25, p.1153-1159, 2011.

NGUYEN, D.T.T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μm stationary phases in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1128, p.105-113, 2006.

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

OLESZEK, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v.967, p.147-162, 2002.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para a produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 259-262, 2002.

OLIVEIRA, R. R.; MORAES, M. C. C.; CASTILHO, R. O.; VALENTE, A. P.; CARAUTA, J. P. P.; LOPES, D.; KAPLAN, M. A. C. High-speed Countercurrent Chromatography as a Valuable Tool to Isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miguel. **Phytochemical Analysis**, v.14, p.96-99, 2003.

ORSINI, F. VEROTTA, L. Separation of natural polar substances by reverse-phase high-performance liquid chromatography, centrifugal thin-layer chromatography and droplet counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, v.349, p.69-75, 1985.

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

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; RICCA, G.; VEROTTA, L. Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. **Phytochemistry**, v.26, p.1101-1105, 1987.

ORTH, P.P.C. **A Flora Medicinal do Herbário Anchieta na Exposição Farrroupilha**. Porto Alegre: Livraria do Globo, 1937.

OSÓRIO, C.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. Oxygenated monoterpenoids from badea (*Passiflora quadrangularis*) fruit pulp. **Phytochemistry**, v. 53, p.97-101, 2000.

PAN, Y.; LU, Y. Recent progress in countercurrent chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.30, p.649-670, 2007.

PASSIFLORA Online. Disponível em:

<http://www.passionflow.co.uk/passiflora-bogotensis.htm>. Acesso: 17 abril de 2012.

PASTENE, E.R.; BOCAZ, G.; PERIC, I.; MONTES, M.; SILVA, V.; RIFFO, E. Separation by capillary electrophoresis of C-glycosylflavonoids in *passiflora sp.* extracts. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**. v.45, p.461-467, 2000.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.50-52, 2005.

PEGEL, K.H.; ROGERS, C.B. Mollic acid 3- β -D-glucoside, a novel 1 α -hydroxycycloartane saponin from *Combretum molle* (Combretaceae). **Tetrahedron Letters**. v.47, p.4299-4302, 1976.

PENG, J.; FAN, G.; HONG, Z.; CHAI, Y.; WU, Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1074, p.11-115. 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, p.241-248, 2004.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G., SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P.; Comparative pharmacological study of *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162-164, 2001.

PIETROGRANDE, M.C.; DONDIA, F.; CIOGLI, A.; GASPARRINIB, F.; PICCINC, A.; SERAFINIC, M. Characterization of new types of stationary phases for fast and ultra-fast liquid chromatography by signal processing based on AutoCovariance Function: A case study of application to *Passiflora incarnata* L. extract separations. **Journal of Chromatography A**. v.1217, p.4355-4364, 2010.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 5. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978, 626 p.

POETHKE, V.W., SCHWARZ, C., GERLACH, H., Substances of *Passiflora incarnata* 1. (Constituents of *Passiflora bryonioides*). Alkaloids. **Planta Medica** 18, 303–314, 1970.

PONGPAN, N.; LUANRATANA, O.; SUNTORNSUK, L. Rapid reverse-phase high performance liquid chromatography for vitexina analysis and fingerprinting of *Passiflora foetida*. **Current Science**, v. 93, p. 378-382, 2007.

POTTERAT, O.; HAMBURGUER, M.. Drug discovery and development with plant-derived compounds. **Progress in Drug Research**. v.65, p.46-118, 2008.

PRIMOT, S.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; RIOUX, V.; PÉREZ, J. A. O.; GARCIN, F. Variación morfológica de tres especies de curuba (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el valle del cauca (Colômbia). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.467-471, 2005.

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, p. 845-851, 2008.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**. v.50, p.586-621, 2011.

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

RAHMAN, K.; KRENN, B.; KOPP, B.; SCHUBERT-TZILAVECZ, M.; MAYER, K.K; KUBELKA, W. Isoscoparin-2''-O-glicoside from *Passiflora incarnata*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1093-1094, 1997.

RAMÍREZ, G.C., GONZÁLEZ, V.R. **La Curuba de Castilla** *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey Bogotá: Jardim Botánico de Bogotá, 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, p.141-143, 2010.

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

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

REGINATTO, F.; 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, p. 348-351, 2006.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 69, 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, p.96-100, 1995.

REIS, J.; PAIVA, P.C.A.; VON TIESENHAUSEN, I.M.E.V.; REZENDE, C.A.P. Composição química, consumo voluntário e digestibilidade de silagens de resíduos do fruto do maracujá (*P. edulis*

- var. *flavicarpa*) e de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) CV. Cameroon e suas combinações. **Ciência agrotecnológica**, v.24, p.213-224, 2000.
- RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A** v.1112, p.31-63, 2006.
- ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Evaluation of anxiolytic and antidepressant activities in mice with fluid extracts and aqueous fraction obtained from the leaves of *Passiflora alata*. **Acta Scientiarum-Health Sciences**, v.28, p.159-164, 2006.
- RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, 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, p. 656–661, 2007b.
- SACCO, J. C. Passifloráceas. In: Reitz, R (Ed). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: PASS. 1980. 132p.
- SAKALEM, M.E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.22; p.1219-1232, 2013.
- SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic Effects of Fractions Obtained from *Passiflora incarnata* L. in the Elevated Plus Maze in Mice. **Phytotherapy Research**. v.25, p.789-795, 2011.
- SANTOS, K.C.; KURTZ, S.M.T.F.; MÜLLER, S.D.; BIAVATTI, M.W.; DE 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.

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, p.112-115, 2011.

SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v.4, p.600-603, 2011.

SATO, G.S.; CHABARIBERY, D.; BESSA JR., A.A. Panorama da produção e de mercado do maracujá. **Informações Econômicas**, v. 22, p. 17-31, 1992.

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, 2011. p.711-740.

SCHILCHER, H.; Zur Kenntnis der Flavon-C-Glykoside in *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift für Naturforschung B**. v.23, p.1393, 1968.

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.

SENA, L. M; ZUCOLOTTI, 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, p.967-975, 2009.

SHEU, S.J.; CHEN, H.R. Simultaneous determination of twelve constituents of I-tzu-tang, a Chinese herbal preparation, by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.704, p.141-148, 1995.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v.30, p.740-744, 2007.

SIMIRGIOTIS, M.J; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E.J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. **Molecules**. v, 18, p.1672-1692, 2013.

SIMPSON JR., S.L.; QUIRINO, J.P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v.1184, p.504–541, 2008.

SOARES, L.V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 266-278 p.

SPARG; S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J.V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**. v.94, p.219–243 2004.

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

SPERONI, E; MINGHETTI, A. Neuropharmacological Activity of Extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v. 54, p. 488-491, 1988.

SPERONI, E; BILLI, R.; PERELLINO, N.C.; MINGHETTI, A. Role of chrysin in the sedative effects of *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 98-100, 1996.

SRIVASTAVA, S. K. Counter-current Chromatography. In: HANDA, S. S.; KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. (Ed) **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: ICS Unido. 2008. 260p

STALIKAS, C.D Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, p.3268–3295, 2007

SUNTORNSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.27, p.679–698, 2002.

SUTHERLAND, I. A.; FISHER, D. Role of counter-current chromatography in the modernization of Chinese herbal medicines. **Journal of Chromatography A**. v.1216, p.740-753, 2009.

TAK, Y.H.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Optimization of dynamic pH junction for the sensitive determination of amino acids in urine by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.401, p.3275–3281, 2011.

TALHI, O.; SILVA, A.M.S. Advances in C-glycosylflavonoid Research. **Current Organic Chemistry**. v.16, p.859-896, 2011.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese Capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**. v.19, p.173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**. v.20, p.493-511, 1997.

TOURSARKISSIAN, M. **Plantas Medicinales de la Argentina** – sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1980.

ULUBELEN, A., MABRY, T.J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora serratifolia*. **Journal of Natural Products**. v.43, p.162, 1980.

ULUBELEN, A; AYYILDZ, H.; MABRY, T. J. C-glycosylflavonoids and other compounds from *Passiflora cyanea*, *P. oerstedii* and *P.menispermifolia*. **Journal of Natural Products**. v.44, p.368-369, 1981.

ULUBELEN, A.; KERR, R. R.; MABRY, T. J. Two new neoflavonoids and C-glycosylflavones from *Passiflora serratodigitata*. *Phytochemistry*. v.21, p.1145-1147, 1982a.

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

ULUBELEN, A.; TOPCU, 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, p. 103, 1982c.

UNGER, M.; STOCKIGT, D.; BELDER, D.; STOCKIGT, J. General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.767, p.263-276, 1997.

UNGER, M. Capillary Electrophoresis of Natural Products: Current Applications and Recent Advance. *Planta Medica*, v.75, p.735-745, 2009.

VEROTTA, L.; ORSINI, F.; TATÓ, M.; EL-SABAKHY, N.A.; TOAIMA, S.M. A cycloartane triterpeno 3 β ,16 β diglucoside from *Astragalus trigonus* and its non natural 6-hydroxy epimer. **Phytochemistry**. v.49, p.845-852, 1997.

VOIRIN, B.; SPORTOUCH, M.; RAYMOND, O.; JAY, M.; BAYET, C.; DANGLES, O.; HAJJI, H.E. Separation of Flavone C-Glycosides and Qualitative Analysis of *Passiflora incarnata* L. by Capillary Zone Electrophoresis. **Phytochemical Analysis**. v.11, p.90-98, 2000.

WAGNER, H.; OTT, S.; JURCIC, K.; MORTON, J.; NESZMELY, I. ¹³C-NMR study and pharmacology of two saponins from *Colubrina asiatica*. **Planta Medica**. v.48, p.136-141, 1983.

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

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis**: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. 2005. 334-354p.

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

WREN, S.A.C. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.38, p.337- 343, 2005.

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

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, p. 112–119, 2007.

VOIRIN, B.; SPORTOUCH, M.; RAYMOND, O.; JAY, M.; BAYET, C.; DANGLES, O.; HAJJI, H. Separation of flavone C-glycosides and Qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by Capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 90-98, 2000.

XU, F.; WANG, C.; YANG, L.; LUO, H.; FAN, W.; ZI, C.; DONG, F. HUA, J.; ZHOU, J. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Food Chemistry**. v.136, p.94–99, 2013.

YAN, C.; LIN, L.; LIU, H.J.; ZHANG, Y.J.; CHEN, Y.H. Study on pharmacokinetic and tissue distribution of isovitexin in rats by HPLC. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v.30, p.376-382, 2011.

YAO, S.; WU, T.; LI, X.; TU, B.; SONG, H. Ten Years of Research into Phytomedicines Analysis - An Era in New Technologies and Methods. **Current Pharmaceutical Analysis**. v.6, p.269-288, 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, p. 1229-1234, 2000a.

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

ZERAIK, M.L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; YARIWAKE, J.H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v.128, p. 259-265, 2011.

ZHANG, Y.; TIE, X.; BAO, B.; WU, X.; ZHANG, Y., Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**. v.97, p.484-494, 2007.

ZHOU, X.; PENG, J.; FAN, G.; WU, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. **Journal of Chromatography A**. v.1092, p.216-221, 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, p.408-416, 2007.

ZOTOU, A. An overview of recent advances in hplc instrumentation. **Central European Journal of Chemistry**. v.10, p.554-569, 2012.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. 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, 2011. p.577-614.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A.B.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory C-Glycosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v.75, p.1-6, 2009.

ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P.. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*. v.23, p.232-239. 2012.

ANEXO A – Colaboração em outros trabalhos

1. GAZOLA, Andressa Córneo; COSTA, Geison Modesti; ZUCOLOTTO, Silvana Maria; MADOGLIO, Fernanda Angélica; CASTELLANOS, Leonardo; RAMOS, Freddy Alejandro; REGINATTO, Flávio Henrique; DUQUE, Carmenza, DE LIMA, Thereza Christina Monteiro; SCHENKEL, Eloir Paulo. The sedative activity of South American *Passiflora* species and the putative involvement of flavonoids constituents. **Artigo submetido para publicação.**
2. MORRONE, Maurilio da Silva; DE ASSIS, Adriano Martimbianco; DA ROCHA, Ricardo Fagundes; COSTA, Geison Modesti; ZUCOLOTTO, Silvana Maria; CASTELLANOS, Leonardo; RAMOS, Freddy Alejandro; SCHENKEL, Eloir Paulo; REGINATTO, Flávio Henrique; GELAIN, Daniel Pens; MOREIRA, José Cláudio. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protect against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. **Artigo submetido para publicação.**