



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

SILVANA MARIA ZUCOLOTTO LANGASSNER

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Passiflora*

Tese de Doutorado

2009



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

SILVANA MARIA ZUCOLOTTO LANGASSNER

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE *Passiflora*

Tese apresentada a Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM FARMÁCIA.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Sílvia Fröde

Florianópolis
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silvana Maria Zucolotto Langassner

**Avaliação da composição química e atividades biológicas de
espécies de *Passiflora*.**

Tese apresentada a Pós-Graduação em Farmácia, da
Universidade Federal de Santa Catarina, como parte
dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR
EM FARMÁCIA.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Co-orientador: Profa. Dra. Tânia Sílvia Fröde

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Prof. Dr. Jorge Alejandro Palermo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Waldemar e Carmen, por todo amor, compreensão, confiança e principalmente pelo grande esforço para realizar meus sonhos. Eu sei que vocês estão tão felizes quanto eu!

Ao meu esposo Gustavo, pelo seu amor, compreensão e paciência nessa etapa importante da minha vida. Sua companhia e seu otimismo me deram forças nos momentos mais difíceis e me motivaram a continuar sempre. Te amo!

Ao meu orientador, Eloir Paulo Schenkel, por ser um exemplo de professor e pesquisador. Toda sua dedicação, orientação e paciência no decorrer desses anos, possibilitaram a realização deste trabalho e contribuíram intensamente para a formação do meu conhecimento. Agradeço por ter sempre me apoiado e motivado durante toda a trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de doutorado para a parte realizada no país e pela bolsa do Programa de Estágio de Doutorado no Exterior (PDEE), para a parte desenvolvida em Bogotá, Colômbia, durante o doutorado (Processo nº BEX 1996/08-8)

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, especialmente a minha co-orientadora Profa. Dra. Tânia Sílvia Frode, por me aceitar em seu laboratório, por toda orientação e conhecimentos dispensados e ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, pela amizade, orientação, sugestões e ensinamentos fundamentais para a realização desse trabalho.

À Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, do Departamento de Farmacologia desta Universidade, pelo trabalho que vem sendo realizado em cooperação e acima de tudo pela amizade.

Às técnicas dos Laboratórios de Química Farmacêutica e Farmacognosia, Solange e Claudinha, por todo carinho, amizade e apoio para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosia e Química Farmacêutica, Andressa, Karen, Maria Izabel, Geison, Cíntia, Vanessa, Tatiana, Cassandra, Virgínia, Simone, Fernanda, Caroline, Lara, Thaís, Solomon, Teca, Thiaguinho, Débora, Jadel e Rodrigo, pela amizade, carinho, ajuda, troca de experiências e por todos os momentos de alegrias que passamos juntos! A companhia de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Sentirei muita falta de vocês! Em especial gostaria de agradecer a minha aluna de iniciação científica, Carize Fagundes, que me ajudou muito na fase final do doutorado, auxiliando nos momentos que mais precisei. Obrigada!

À recém-doutora Ligia Moreiras Sena, por todo trabalho que foi realizado, que nos rendeu muitos frutos, não só na vida acadêmica, mas na vida pessoal, já que a

partir da cooperação estabelecida, ganhei uma grande amiga e confidente. Obrigada por tudo!

Aos colegas do laboratório de Imunologia Clínica, Janaina, Ziliane, Silvana, Rafael, Jucélia, Vanessa, Diana, Eduardo, Gustavo e Ana Beatriz, pela amizade, ajuda nos experimentos e momentos que passamos juntos! Em especial gostaria de agradecer à Stella Goulart, que me auxiliou muito no início dos experimentos!

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo, da Universidad de Buenos Aires, na Argentina e ao Prof. Miguel Caro, do Departamento de Química, desta Universidade, por todo carinho e boa vontade para realização dos espectros de RMN.

Aos professores da Universidad Nacional de Colombia, em especial à Profa. Dra. Carmenza Duque Beltrán, Prof. Dr. Freddy A. Ramos, Prof. Dr. Leonardo Castellanos, Prof. Dr. Humberto Mayorga e Prof. Dr. Oscar Osorno, que abriram as portas do laboratório e permitiram um grande crescimento profissional em minha vida. Agradeço pela oportunidade.

Aos amigos colombianos do laboratório de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, Tatiana, Lucho, Edisson, Katterine, Johan, José, Eduardo, Hebellin, Gina, Paola e Ana Milena, por todo carinho, amizade, momentos alegres e por conseguirem fazer com que eu me sentisse em casa durante os cinco meses em Bogotá. Extraño mucho ustedes! Em especial gostaria de agradecer o aluno César Andrés Lopez que me auxiliou muito durante esse estágio. Obrigada!

Aos professores do Laboratório de Controle de Qualidade, especialmente o Prof. Dr. Marcos Segatto, e aos colegas do laboratório pela amizade!

À agrônoma Rosilda Helena Feltrin, da Epagri e aos proprietários dos cultivos de maracujá-amarelo, do município de Antônio Carlos-SC, por todo apoio e disposição prestados nas coletas dos materiais vegetais.

Ao meu irmão André e aos meus avós, Etelvina e Mansueto (*in memoriam*), que sempre foram pessoas muito importantes na minha vida.

À família Langassner, que são pessoas maravilhosas, que sempre me acompanharam durante esses anos, dando muito apoio, incentivo e força. Amo vocês!

E a todos, aqui não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
APRESENTAÇÃO	19
CAPÍTULO 1: O gênero <i>Passiflora</i>	22
1. Introdução.....	23
2. Uso Popular.....	27
3. Produção.....	27
4. Composição química.....	28
4.1 Flavonóides.....	29
4.2 Alcalóides.....	30
4.3 Triterpenos.....	32
4.4 Saponinas.....	33
4.5 Glicosídeos Cianogênicos.....	36
5. Informações Farmacológicas.....	39
CAPÍTULO 2: Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> por meio de um fracionamento biomonitorado	45
1. Introdução.....	46
2. Revisão da Literatura.....	48
2.1 Processo inflamatório.....	48
2.2 Modelo de inflamação.....	51
<i>Publicação: Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C glucosylflavones from <i>Passiflora edulis</i></i>	53
CAPÍTULO 3: Avaliação da composição química e atividades neurofarmacológicas do extrato aquoso do pericarpo de <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	60
1. Introdução.....	61
2. Revisão da literatura.....	63

2.1 Atividades farmacológicas relatadas para o pericarpo.....	63
2.2 Composição química do pericarpo.....	66
<i>Publicação: Neuropharmacological activity of the pericarp of Passiflora edulis flavicarpa Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids...</i>	68
3. Continuidade do fracionamento biomonitorado.....	77
3.1 Processo de fracionamento.....	77
3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	78
3.3 Resultados obtidos.....	79
CAPÍTULO 4: Análise qualitativa entre espécies de <i>Passiflora</i> da América do Sul por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	81
1. Apresentação.....	82
2. Revisão da Literatura.....	82
3. Espécies colombianas de <i>Passiflora</i>	82
<i>Publicação: Fingerprinting of C-glycosyl flavonoids of South American Passiflora species by HPLC-DAD.....</i>	89
CAPÍTULO 5: Uso de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade para o isolamento de flavonóides C-glicosídeos das folhas de <i>Passiflora edulis</i> variedade <i>flavicarpa</i>.....	111
1. Introdução.....	112
2. Revisão da literatura.....	116
<i>Publicação: High-speed Counter-current Chromatography as a tool to isolate glycosyl flavonoids from Passiflora edulis var. flavicarpa leaves.....</i>	120
DISCUSSÃO GERAL.....	136
CONCLUSÕES.....	150
REFERÊNCIAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flor e fruto de <i>P. alata</i>	24
Figura 2: Flor e frutos de <i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	25
Figura 3: Alcalóides descritos para a espécie <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	31
Figura 4: Ácidos ciclopassiflóricos A, B, C, E, F e G de <i>P. edulis</i> Sims.....	32
Figura 5: Ácidos ciclopassiflóricos D de <i>P. edulis</i> Sims.....	33
Figura 6: Estrutura química do triterpeno 3 β , 16 β - diacetoxiurs-12-eno.....	33
Figura 7: Saponina passiflorina	34
Figura 8: Ciclopassiflosídeos I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X e XI de <i>P. edulis</i> Sims.....	35
Figura 9: Ciclopassiflosídeos VI de <i>P. edulis</i> Sims.....	35
Figura 10: Glicosídeos cianogênicos descritos para a espécie <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	37
Figura 11: Estrutura do fruto de <i>Passiflora</i> var. <i>flavicarpa</i>	63
Figura 12: Cromatograma da fração butanólica do pericarpo de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , do composto isoorientina e da sub-fração sem isoorientina.....	80
Figura 13: Flor de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	83
Figura 14: Fruto de <i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	84
Figura 15: Flor de <i>P. ligularis</i>	84
Figura 16: Frutos de <i>P. ligularis</i>	85
Figura 17: Flor e frutos de <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	85
Figura 18: Frutos de <i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	86
Figura 19: Flor de <i>P. quadrangularis</i>	86

Figura 20: Frutos de <i>P. quadrangularis</i>	87
Figura 21: Flor e fruto de <i>P. manicata</i>	88
Figura 22: Esquema representativo do sistema da Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade.....	115
Figura 23: Equipamento de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade.....	116
Figura 24: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e das sub-frações A- D.....	138
Figura 25: Cromatografia em camada delgada da sub-fração C das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e dos compostos isolados.....	139
Figura 26: Mecanismo anti-inflamatório proposto para o extrato aquoso, sub-frações e compostos isolados das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> , no modelo de pleurisia induzida por carragenina.....	141
Figura 27: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de espécies de <i>Passiflora</i>	145
Figura 28: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH do pericarpo de espécies de <i>Passiflora</i>	146
Figura 29: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e do composto 8.....	149
Figura 30: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i> e do composto 1.....	149
Figura 31: Cromatografia em camada delgada das sub-frações obtidas por Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade da fração BuOH (em fase reversa) das folhas de <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química dos flavónoids C-glicosídeos relatados para a espécie <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	30
Tabela 2: Comparação da concentração de HCN em diferentes partes e fases de maturação do fruto do maracujá roxo e amarelo.....	39
Tabela 3: Estudos pré-clínicos e clínicos relatados para a espécie <i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	40
Tabela 4: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de flavonóides C-glicosídeos por CCC.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA= adenosina deaminase

CCC= Cromatografia em Contracorrente

CCD= Cromatografia em Camada Delgada

CLAE= Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CXC= Classe de quemocinas quimiotáticas para neutrófilos

GABA= ácido γ -amino butírico

HSCCC= High-Speed Counter- Current Chromatography (Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade)

IL-1 β = Interleucina 1 beta

IL-8= Interleucina 8

IL-6= Interleucina 6

KC= Quemocina para neutrófilos

MIP-2= Proteína inflamatória de macrófago 2

MPO= mieloperoxidase

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral alfa

RESUMO

As espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae), conhecidas no Brasil como maracujás, são distribuídas principalmente em países da América do Sul e são utilizadas popularmente como sedativas, calmantes, diuréticas e em casos de problemas inflamatórios. *P. edulis* variedade *flavicarpa* (maracujá-amarelo) constitui a espécie mais cultivada no país, principalmente para a preparação de suco industrializado. Neste trabalho, esta espécie foi um dos principais objetos de estudo, na qual foi investigada a composição química e as atividades biológicas das folhas e do pericarpo. Adicionalmente foi realizada uma análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), entre espécies de *Passiflora* nativas da América do Sul. Também foi utilizada a técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC) para o isolamento de flavonóides glicosilados da fração butanólica das folhas da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*. Por meio de um fracionamento biomonitorado para caracterizar os possíveis compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, foi observado o envolvimento dos flavonóides C-glicosídeos, isoorientina, vicenina-2 e spinosina, na resposta inflamatória, no modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos, via i.p. No pericarpo dos frutos da variedade *flavicarpa*, também foi observada a presença dos flavonóides C-glicosídeos isoorientina, vicenina-2, spinosina e crisina 6,8-di-C-glicopiranosídeo. A avaliação de possíveis atividades neurofarmacológicas demonstrou atividade tipo-ansiolítica e sedativa, e foi possível caracterizar a presença desses flavonóides C-glicosídeos nos extratos ativos do pericarpo. A análise cromatográfica qualitativa, por CLAE-DAD, das folhas e do pericarpo, de diferentes espécies de *Passiflora*: *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. ligularis* e *P. manicata*, permitiu a caracterização dos extratos vegetais, que apresentaram diferentes perfis cromatográficos e diferentes compostos majoritários, que podem ser utilizados como marcadores químicos para o controle de qualidade desses extrativos vegetais. A técnica de HSCCC foi utilizada para o isolamento de flavonóides glicosilados da fração butanólica das folhas da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*. O sistema acetato de etila: n-butanol: água (2:1:3, v/v/v), permitiu a partir de 1g da fração, a obtenção de 46 mg de um composto ainda não identificado e 30 mg de isoorientina, além de permitir a retenção dos flavonóides di-C-glicosilados na fase estacionária, facilitando o processo de purificação desses compostos.

ABSTRACT

The *Passiflora* species genus (Passifloraceae), known in Brazil as “maracujás”, are mostly distributed in South America and are used in popular medicine as sedative, tranquilizer, diuretic and in inflammatory problems. *P. edulis* variedade *flavicarpa* (“maracujá-amarelo”) is the specie more cultivated in Brazil, mainly to juice preparation. In this work, the main specie studied was *P. edulis* var. *flavicarpa*. We evaluated the chemical composition and the biological activities of the leaves and pericarp. In addition, was carried out a qualitative chromatographic analysis among South American *Passiflora* species using High Performance Liquid Chromatographic with diode array detector (HPLC-DAD) and High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) was used to purify glycosyl flavonoids of butanolic fraction of the leaves from *P. edulis* var. *flavicarpa*. Through a bioguided fractionation procedure was characterized the involvement of the C-glycosyl flavonoids, isoorientin, vicianin-2 and spinosin, in the inflammatory response showed by the aqueous extract of the leaves from *P. edulis*, in mouse model of pleurisy induced by carrageenan, by i.p. route. In the pericarp from *P. edulis* var. *flavicarpa*, was also observed the presence of C-glycosyl flavonoids isoorientin, vicianin-2, spinosin and 6,8-di-C-glycosylchrysin. The evaluation of possible neuropharmacological activities, showed anxiolytic-like and sedative effects and was possible characterize the presence of these C-glycosyl flavonoids in active pericarp' extracts. The qualitative chromatographic analysis by HPLC-DAD from leaves and pericarp of different *Passiflora* species: *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. ligularis* e *P. manicata*, allowed the characterization these extracts, that showed different chromatographic profile and different major compounds. Then, the presence of these components, can be used as chemical markers for authentication of samples. The HSCCC was used to purify C-glycosyl flavonoids of the butanolic fraction from *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves. Using the solvent system ethyl acetate: n-butanol: water (2:1:3, v/v/v), two compounds, 46 mg of an unknown compound and 30 mg of isoorientin, were obtained from 1 g butanolic fraction. In addition, the solvent system allowed the retention of di-C-glycosylflavonoids in the stationary phase, allowing to obtain more easily these compounds.

“O que vale na vida não é o ponto de partida, mas sim a caminhada; caminhando e semeando, sempre terás o que colher no final”

Cora Coralina

Eu aprendi...

“Que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a”.

William Shakespeare

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos principais, avaliar a composição química referente à presença de flavonóides C-glicosídeos das folhas e dos frutos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* e, paralelamente, a avaliação de atividades biológicas, utilizando como ferramenta o fracionamento biomonitorado, com o intuito de caracterizar os compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória das folhas e pelas ações neurofarmacológicas do pericarpo.

Adicionalmente, foi realizado um estágio doutoral no exterior em Bogotá, Colômbia, no Departamento de Química, da Universidad Nacional de Colombia, no Grupo “Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”, liderado pela Profa. Dra. Carmenza Duque Beltrán. Maiores detalhes estão descritos no capítulo 4 do presente trabalho. O estágio doutoral teve um período de duração de cinco meses, com início em novembro de 2008 e término em abril de 2009 e teve como objetivos: a análise qualitativa da composição química referente a flavonóides C-glicosídeos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos, entre diferentes espécies de *Passiflora* da América do Sul; aplicar a técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade para o isolamento de flavonóides glicosilados das folhas da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* (amostra coletada no Brasil) e o isolamento e elucidação estrutural dos flavonóides glicosilados das folhas de *P. tripartita* var. *mollissima*, espécie amplamente cultivada na Colômbia (resultados não apresentados neste trabalho).

Diante dos objetivos propostos, a tese foi organizada em cinco capítulos:

O capítulo 1 é constituído por uma revisão sobre o gênero *Passiflora*, destacando a espécie *P. edulis* var. *flaviarpha*, na qual foram abordadas informações referentes às características botânicas, uso popular, composição química e atividades farmacológicas.

O capítulo 2 descreve o fracionamento biomonitorado para identificar os flavonóides *C*-glicosídeos envolvidos na resposta inflamatória no extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, utilizando o modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

O capítulo 3 apresenta a identificação dos compostos presentes no extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* var. *flavicarpa* e o fracionamento biomonitorado para caracterizar os componentes responsáveis pelas atividades neurofarmacológicas desse extrato.

O capítulo 4 apresenta a análise qualitativa por CLAE, entre espécies de *Passiflora* da América do Sul, em relação à presença de flavonóides *C*-glicosídeos.

O capítulo 5 descreve o uso da técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade para o isolamento de flavonóides glicosilados das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*.

CAPÍTULO 1: O GÊNERO *Passiflora*

“O nome maracujá, de origem indígena, é empregado exclusivamente para designar as espécies do gênero *Passiflora*, da família *Passifloraceae*, a maioria das quais é nativa da América do Sul. O nome de origem tupi, significa ‘alimento em forma de cuia’ e na língua inglesa é denominada flor da paixão (*passion fruit e/ou passion flower*)” (PIO CORRÊA, 1978).

1. INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu e Augustin Pyramus de Candolle e inclui dezessete gêneros, e cerca de 600 espécies tropicais e temperadas, compreendendo lianas, arbustos e árvores. A grande maioria das espécies descritas nessa família são herbáceas ou lenhosas, em geral trepadeiras. Dentre as principais espécies da família *Passifloraceae*, destacam-se os gêneros *Passiflora*, *Adenia* e *Tetraphaea* (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).

O gênero *Passiflora* constitui o maior gênero da família, com cerca de 400 espécies, ocorrendo, principalmente, nas Américas, registrando-se a ocorrência de somente cerca de 10 % de suas espécies na Ásia Tropical, Polinésia e Austrália (COSTA, 1977; SACCO, 1980).

No Brasil, as espécies de *Passiflora* são conhecidas popularmente como maracujás e duas espécies apresentam maior interesse comercial: *Passiflora alata* Curtis, descrita na Farmacopéia Brasileira 3ª edição (F. BRAS, 1976) e *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener, que foi incluída na 5ª edição da Farmacopéia Brasileira (F. BRAS, 2009) e constitui a espécie mais cultivada no país para a produção de suco industrializado (SATO et al., 1992; REIS et al., 2000).

A espécie *P. alata*, conhecida popularmente como maracujá-doce, apresenta flor com pétalas verde na fase dorsal, carmin na fase ventral e aristada no ápice,

com elementos filamentosos de coloração vermelha, branca e roxa (Figura 1). 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. Essa espécie é muito próxima da espécie *P. quadrangularis*, apresentando pequenas diferenças morfológicas nas flores e folhas, sendo que a grande diferença entre as duas espécies são os frutos, já que a espécie *P. quadrangularis* apresenta frutos marcadamente maiores que os frutos de *P. alata* (maiores detalhes da espécie *P. quadrangularis* são apresentados no capítulo 4) (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).



Figura 1: Flor e fruto de *P. alata*.

Já, em relação à espécie *P. edulis*, cabe destacar que essa espécie produz dois tipos de frutos, amplamente consumidos: o fruto de cor amarela (*Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* Degener) e o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims variedade *edulis*) (SPENCER; SEIGLER, 1983; VALE; LEITE, 1983; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). Essas formas são infra-específicas, sendo portanto, citadas erroneamente como variedades ou citadas de maneira incompleta em alguns trabalhos, especialmente quando alguns autores se referem ao maracujá- amarelo ou roxo somente como *P. edulis* ao invés de diferenciá-las, como corretamente citados em poucos trabalhos. O maracujá amarelo apresenta uma série de

características consideradas superiores ao maracujá-roxo, tais como: maior tamanho do fruto e maior peso. Também são citados maior teor de caroteno, maior acidez total, maior resistência às pragas e maior produtividade por hectare (CARVALHO-OKAMO; VIEIRA, 2001). Maiores detalhes sobre o maracujá-roxo são apresentados no capítulo 4 deste trabalho.

Especificamente em relação à espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*, principal objeto deste estudo, é conhecida popularmente como maracujá-amarelo, maracujá-ácido, maracujá-azedo, maracujá-comum, maracujá-de-comer, maracujá-de-suco, maracujá-mirim e maracujá-peroba (SACCO, 1980; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001). Essa espécie constitui uma trepadeira vigorosa com gavinhas axilares, perene, de folhas simples e profundamente trilobadas. As flores são típicas das plantas deste gênero, apresentam uma corona fortemente roxa na base e frutos maiores (6-12 cm de comprimento) e de cor amarela (Figura 2) (SACCO, 1980; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).



Figura 2: Flor e frutos de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*.

Ainda, cabe citar a espécie *P. incarnata*, que embora não seja cultivada no Brasil, constitui a espécie de maior destaque a nível mundial. A espécie *P. incarnata* é descrita como oficial em algumas Farmacopéias, das quais podemos citar: Francesa (Pharmacopée Française, 1980), Alemã (Deutsches Arzneibuch,

1992) e Helvética (Pharmacopoeia Helvetica, 1987) e suas monografias constam na *British Herbal Pharmacopoeia*, *British Herbal Compendium*, *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* (ESCOP), Comissão E, *German Homeopathic Pharmacopoeia* e *Homeopathic Pharmacopoeia of the United States* (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000).

É importante destacar que um medicamento fitoterápico à base de *P. incarnata*, segundo a RDC N° 48 (2004), está inserido na *Lista de Registro Simplificado de Medicamentos*, para as quais não são necessários estudos complementares toxicológicos, pré-clínicos e clínicos para a obtenção de registro de medicamentos, em função do volume de estudos já realizados com a espécie. Desse modo, as indicações terapêuticas foram determinadas através da utilização popular do maracujá ao longo dos anos.

Segundo Alexandre (2004), os medicamentos fitoterápicos à base de maracujá, no Brasil, são elaborados a partir das espécies, *P. incarnata* e *P. alata* e estão entre os mais vendidos no Estado de Santa Catarina, segundo dados das distribuidoras de medicamentos Equipe, Santa Cruz e Fitofarma. No entanto, em um levantamento realizado por Ortega e colaboradores (1989) em nove volumes do Catálogo Brasileiro de Produtos Farmacêuticos, apontou que, naquela época, dos 147 medicamentos registrados, que contêm maracujá em sua formulação, 101 medicamentos não especificam qual a espécie é utilizada, 27 caracterizam a espécie *P. incarnata* em sua formulação e 19 caracterizam a *P. alata*. Portanto, segundo os resultados apontados no estudo, há a possibilidade da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*, amplamente cultivada no país, estar presente nas formulações que não especificam a espécie de *Passiflora* utilizada.

2. USO POPULAR

Várias espécies do gênero *Passiflora*, silvestres ou cultivadas, são tradicionalmente conhecidas no âmbito da medicina popular em quase todos os países ocidentais. A literatura etnofarmacológica registra o uso das folhas, das diversas espécies de *Passiflora*, na forma de chá, como um calmante e suave indutor do sono (PIO CORRÊA, 1978; LORENZI; MATOS, 2002). O uso das folhas também é indicado para combater febres intermitentes, inflamações cutâneas, sendo ainda consideradas diaforéticas (PIO CORRÊA, 1978). Especificamente para *P. edulis*, o suco dos seus frutos é referido por alguns autores como sedativo e o chá da folhas como calmante, sedativo e antiespasmódico (LORENZI; MATOS, 2002).

3. PRODUÇÃO

P. edulis var. *flavicarpa* é amplamente cultivada em todo o Brasil para fins industriais e representa 95 % dos pomares comerciais do Brasil, sendo considerado o maior produtor mundial e embora seja originária do Brasil, é amplamente cultivada em vários outros países (SATO et al., 1992; REIS et al., 2000). Vinte e seis estados brasileiros estão envolvidos no cultivo do maracujá, no entanto, dez desses respondem por mais de 40% do volume da produção, entre os quais se destacam os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco e Alagoas (OLIVEIRA et al., 2002; CÓRDOVA et al., 2005).

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 servir de matéria-prima para elaboração de doces e outras formulações, néctares, concentrados para sucos e refrigerantes, xaropes, sorvetes e geléias, dentre outros produtos (OLIVEIRA et al., 2002).

Os frutos do maracujá - amarelo (*P. edulis* var. *flavicarpa*) podem ser obtidos quase o ano inteiro, principalmente no norte e no nordeste do país, e é a variedade que apresenta maior produtividade. O maracujá-roxo (*P. edulis* var. *edulis*), embora nativo no Brasil, é o menos conhecido, produzido e consumido pelos brasileiros (BRASIL, 2004).

4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Sob o ponto de vista químico, para as espécies de *Passiflora* é relatada a presença de alcalóides (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975), saponinas (ORSINI; PELIZZONI; VEROTTA, 1985; YOSHIKAWA et al., 2000a,b; REGINATTO et al., 2001, 2004; BIRK et al., 2005; ZUCOLOTTO; PALERMO; SCHENKEL, 2006) e glicosídeos cianogênicos (SPENCER; SEIGLER, 1983; SEIGLER et al., 2002). Ainda, segundo a literatura, os constituintes químicos majoritários relatados são os flavonóides tipo C-glicosídeos (ULUBELEN et al., 1982ab; BRASSEUR; ANGENOT, 1984; CONGORA; PROLIAC; RAYNAUD, 1986; REHWALD et al., 1994; RAFFAELLI et al., 1997; DE-PARIS et al., 2002).

Abaixo, segue uma breve revisão sobre os componentes químicos relatados para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*, sendo incluídos também alguns constituintes químicos de grande ocorrência na variedade *edulis*.

4.1 Flavonóides

Os trabalhos que descrevem a presença de flavonóides em *P. edulis* var. *flavicarpa*, observam a presença desses compostos nas folhas e/ou partes aéreas e nos frutos. Zucolotto, Palermo e Schenkel (2006) relataram, em um estudo preliminar, por CCD, que não foi observado a presença de flavonóides C-glicosídeos nas raízes da variedade *flavicarpa*.

Em relação aos frutos foram relatados dois trabalhos, um realizado ainda na década de 70, com o suco, na qual o teor de flavonóides foi determinado através de densitometria, observando um teor em média de “1,00 mg %”, nas duas variedades (LUTOMSKI; MALEK, 1975). O segundo trabalho determina através de CLAE, a presença de flavonóides C-glicosídeos no suco dos frutos da variedade *flavicarpa* e no suco industrializado de maracujá. Foi relatado no suco dos frutos a presença de schaftosídeo e isoschaftosídeo, isoorientina, orientina, isovitexina, luteolina 6-C-fucosídeo e luteolina 6-C-quinovosídeo. No suco industrializado de maracujá foi relatada a presença de schaftosídeo, isoorientina, orientina e isovitexina (Tabela 1). A C-glicosilflavona isoorientina mostrou-se predominante tanto no suco *in natura*, como no suco industrializado (MARECK; GALENSA; HERRMANN, 1990).

Posteriormente, Mareck e colaboradores (1991) relataram através de CLAE a presença dos flavonóides C-glicosídeos luteolina-6-C-quinovosídeo e luteolina-6-C-fucosídeo nas folhas da variedade *flavicarpa*.

Petry (1999) demonstrou, através de análise por CLAE, a presença de vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina (Tabela 1), com a predominância de isoorientina nas folhas.

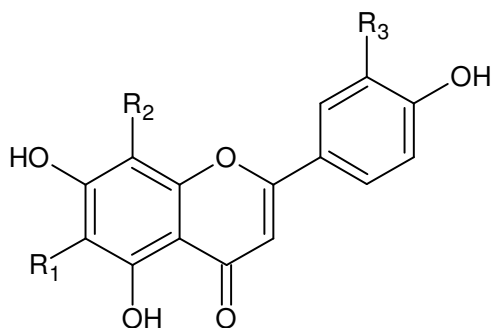


Tabela 1: Estrutura química dos flavonóides C-glicosídeos relatados para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*.

Flavonóide C-glicosídeo	Aglicona	R ₁	R ₂	R ₃
isovitexina	apigenina	gli	H	H
vitexina	apigenina	H	gli	H
isoorientina	luteolina	gli	H	OH
orientina	luteolina	H	gli	OH
isoschaftosídeo	apigenina	gli	ara	H
schaftosídeo	apigenina	ara	gli	H
luteolina-6-C-quinovosídeo	luteolina	qui	H	OH
luteolina-6-C-fucosídeo	luteolina	fuc	H	OH

ara=arabinose; fuc= fucose; gli= glicose; qui= quinose.

4.2 Alcalóides

Os alcalóides presentes em espécies de *Passiflora* são do tipo indólico. Especificamente para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* foi relatada a presença de harmana, harmina, harmalina e harmol (Figura 3) (LUTOMSKI; MALEK, 1975; LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975). Lutomski e Malek (1975) compararam o teor de alcalóides em diferentes partes da espécie *P. edulis* var. *edulis* e observaram maior teor nas folhas. Já na espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* foi observada a

presença de alcalóides (expressos em harmana) em todas as partes da planta, exceto nas folhas (LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975).

No entanto, estudos com metodologias mais apuradas, como o trabalho desenvolvido por Rehwald e colaboradores (1994), que consiste na extração, purificação, concentração e posterior análise por CLAE, foi sensível para a detecção de harmana, harmina, harmalol, harmalina e harmol, no entanto, a análise de quinze amostras comerciais de *P. incarnata* permitiu a detecção de traços de harmana somente em uma amostra. Além disso, Grice, Ferreira e Griffiths (2001) também desenvolveram um método por CLAE para a detecção simultânea de flavonóides e alcalóides em amostras de *P. incarnata* e detectaram os alcalóides apenas em traços e não nas concentrações descritas em estudos anteriores.

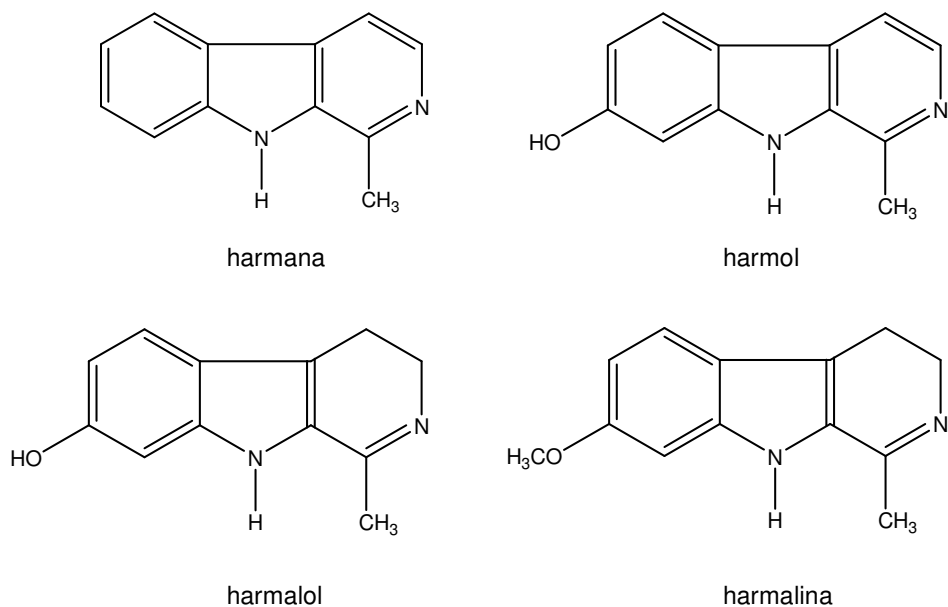


Figura 3: Alcalóides descritos para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*.

4.3 Triterpenos

Há poucas citações sobre a ocorrência de triterpenos nas espécies de *Passiflora*. Yoshikawa e colaboradores (2000a) relataram a presença de quatro triterpenos do tipo cicloartano nas partes aéreas da espécie *P. edulis* Sims (sugere tratar-se do maracujá-roxo, mas os autores não especificam a variedade), denominados ácidos ciclopassiflóicos A, B e C (Figura 4) e D (Figura 5). Em trabalho posterior, os mesmos autores identificaram três novos triterpenos, os ácidos ciclopassiflóicos E, F e G (Figura 4) (YOSHIKAWA et al., 2000b).

Em 2006, Zucolotto e colaboradores relataram a presença de um triterpeno, denominado 3 β , 16 β -diacetoxiurs-12-eno, nas raízes de *P. edulis* var. *flavicarpa* (Figura 6).

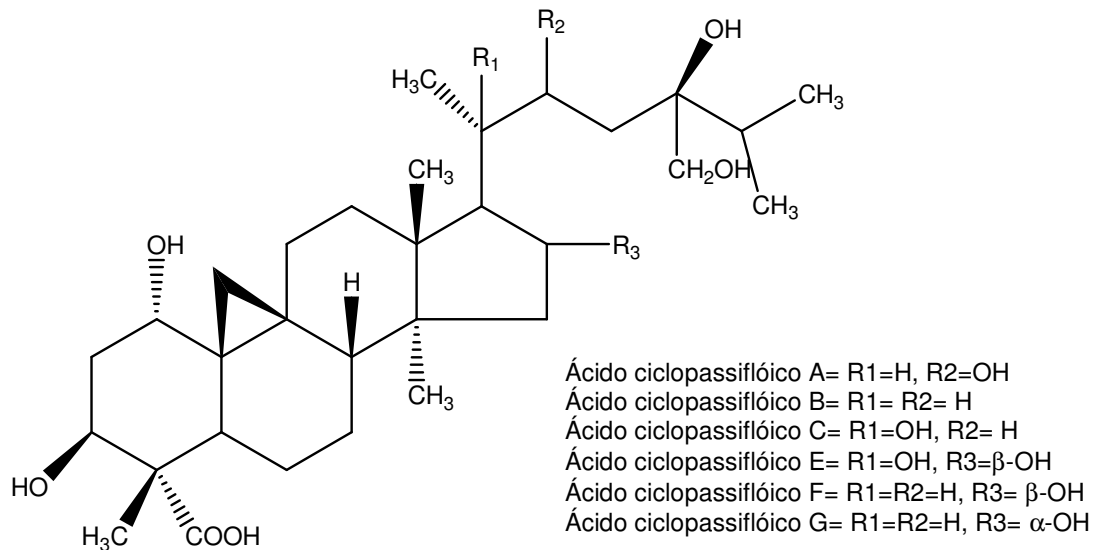


Figura 4: Ácidos ciclopassiflóicos A, B, C, E, F e G de *P. edulis* Sims.

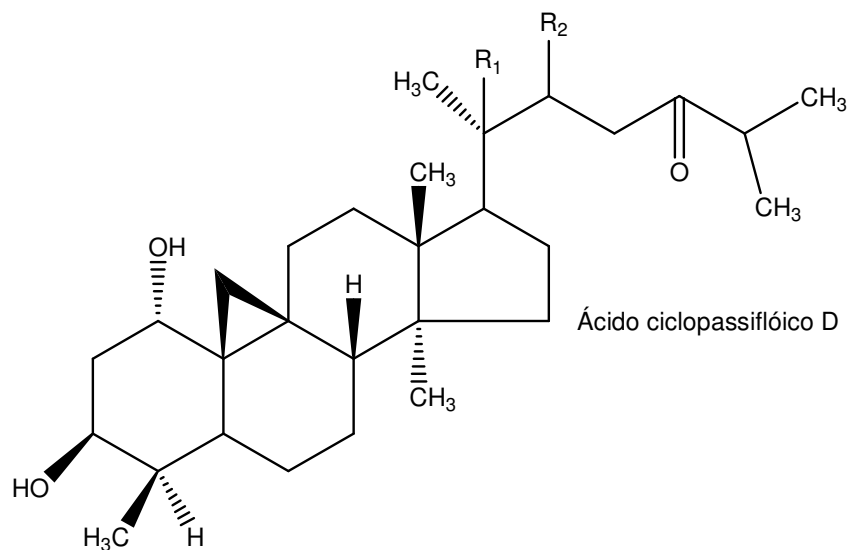


Figura 5: Ácidos ciclopassiflóicos D de *P. edulis* Sims.

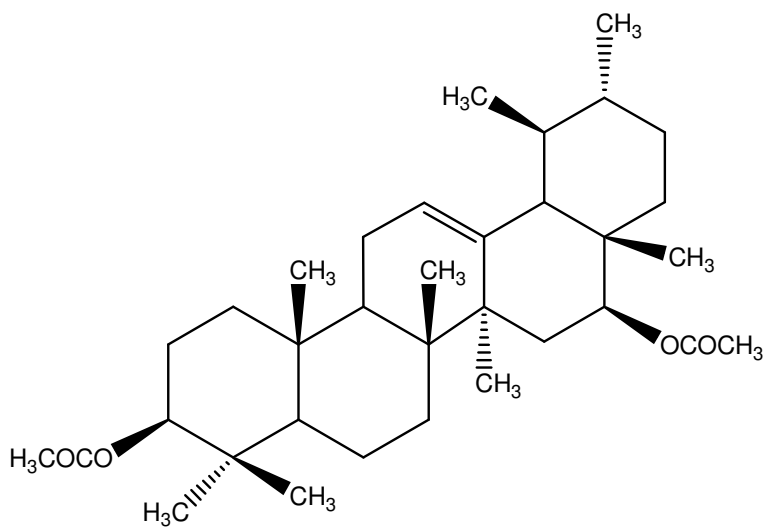


Figura 6: Estrutura química do triterpeno 3β, 16β - diacetoxiurs-12-eno.

4.4 Saponinas

Em 1975, Bombardelli e colaboradores descreveram a ocorrência da saponina passiflorina (Figura 7) identificada como (28-O-β-D-glicosilpiranosilester do ácido (22R), (24S)-22,31-epoxi-24-metil-1α, 3β, 24, 31-tetrahidroxi-9, 19-ciclo-9β-

lanostan-20-óico) nas folhas da espécie *P. edulis* Sims (o nome científico sugere que a espécie investigada foi o maracujá-roxo). Trata-se de uma saponina triterpênica do tipo cicloartano. A mesma saponina foi isolada também por Yoshikawa et al. (2000a).

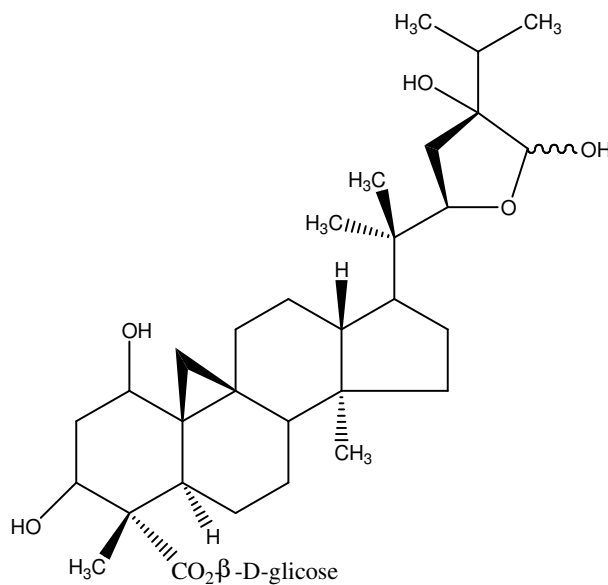
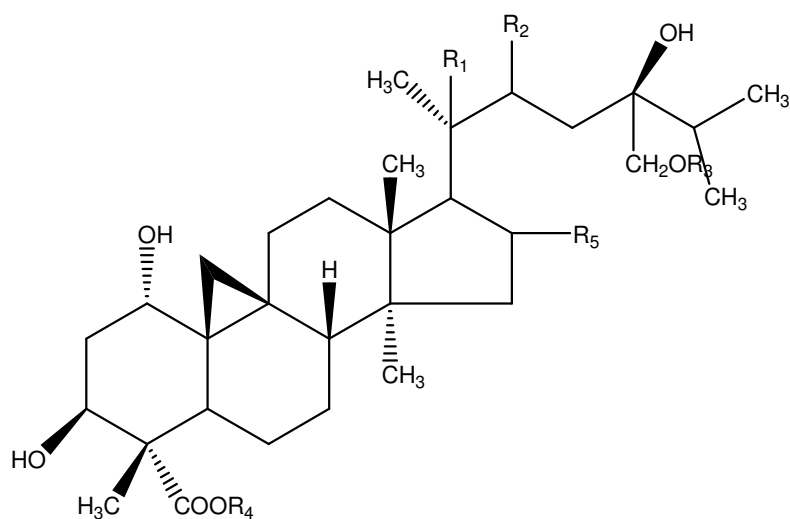


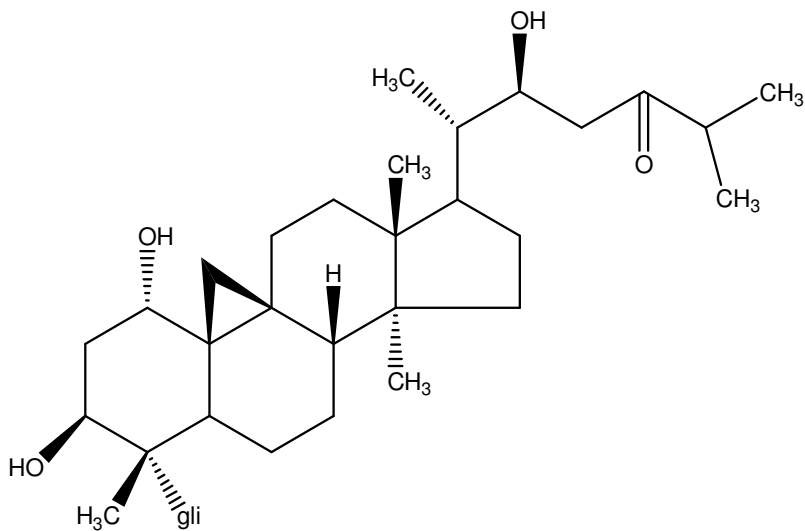
Figura 7: Saponina passiflorina.

Yoshikawa e colaboradores (2000a) identificaram nas partes aéreas da *P. edulis* Sims a presença de seis saponinas, denominadas ciclopasiflosídeos I, II, III, IV e V (Figura 8) e VI (Figura 9). Em trabalho posterior, os mesmos autores identificaram outras cinco ciclopasiflosídeos, codificadas VII, VIII, IX, X e XI (Figura 8). Todas as saponinas são triterpênicas, do tipo cicloartano e monodesmosídicas (YOSHIKAWA et al., 2000b).



Ciclopassiflosídeo I = R1= R3=H, R2=OH, R4=gli, R5=H
 Ciclopassiflosídeo II = R1= R2= R3=R5= H, R4= gli
 Ciclopassiflosídeo III= R1=R2=R5=H, R3=R4= gli
 Ciclopassiflosídeo IV = R1=OH, R2=R3=R5=H, R4=gli
 Ciclopassiflosídeo V = R1=OH, R2=R5=H, R3=R4=gli
 Ciclopassiflosídeo VII = R1=OH, R2=R3=H, R4=gli, R5=β-OH
 Ciclopassiflosídeo VIII= R1= R2=R3=H, R4=gli, R5=β-OH
 Ciclopassiflosídeo IX = R1=R2=H, R3=R4=gli, R5= α-OH
 Ciclopassiflosídeo X = R1=R2=R3=H, R4=gli, R5=α-OH,
 Ciclopassiflosídeo XI = R1=R2=H, R3=R4=gli, R5=α-OH

Figura 8: Ciclopassiflosídeos I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X e XI de *P. edulis* Sims. gli=glicose



Ciclopassiflosídeo VI

Figura 9: Ciclopassiflosídeos VI de *P. edulis* Sims. gli=glicose

4.5 Glicosídeos cianogênicos

Muitas espécies da família Passifloraceae são cianogênicas. Ao todo, já foram relatados dezenas de compostos contendo grupo CN⁻ em espécies de *Passiflora*. A presença de glicosídeos cianogênicos na espécie *P. edulis* foi relatada pela primeira vez por em 1919 por Rosenthaler (apud Spencer e Seigler, 1983). A maior parte dos relatos da ocorrência de glicosídeos cianogênicos em espécie *P. edulis* são para a variedade *edulis* (maracujá-roxo). Nessa variedade já foram identificados (2*R*)-prunasina e amigdalina e (2*S*)-sambunigrina (Figura 10) nos suco e cascas de frutos frescos (Chassagne et al., 1996). Também foi citada a presença do glicosídeo cianogênico mandelonitrilo β-rutinosídeo ((*R*)-mandelonitrilo-α-*L*-ramnopiranosil-β-*D*-glicopiranosídeo) (Figura 10) no suco dos frutos maduros do maracujá roxo, sem as sementes (Chassagne e Crouzet, 1998) e passiedulina (Figura 10), das folhas de *P. edulis*. Este glicosídeo cianogênico foi o primeiro a apresentar um açúcar diferente da *D*-glicose, ligado diretamente no centro da molécula de cianidrina (Christensen; Jaroszewski, 2001). Em trabalho mais recente, Seigler e colaboradores (2002) relataram a presença de dois novos glicosídeos cianogênicos, (2*R*)-β-*D*-allopiranosiloxi-2-fenilacetoneitrila e (2*S*)-β-*D*-allopiranosiloxi-2-fenilacetoneitrila (Figura 10), nas partes aéreas de *P. edulis* Sims.

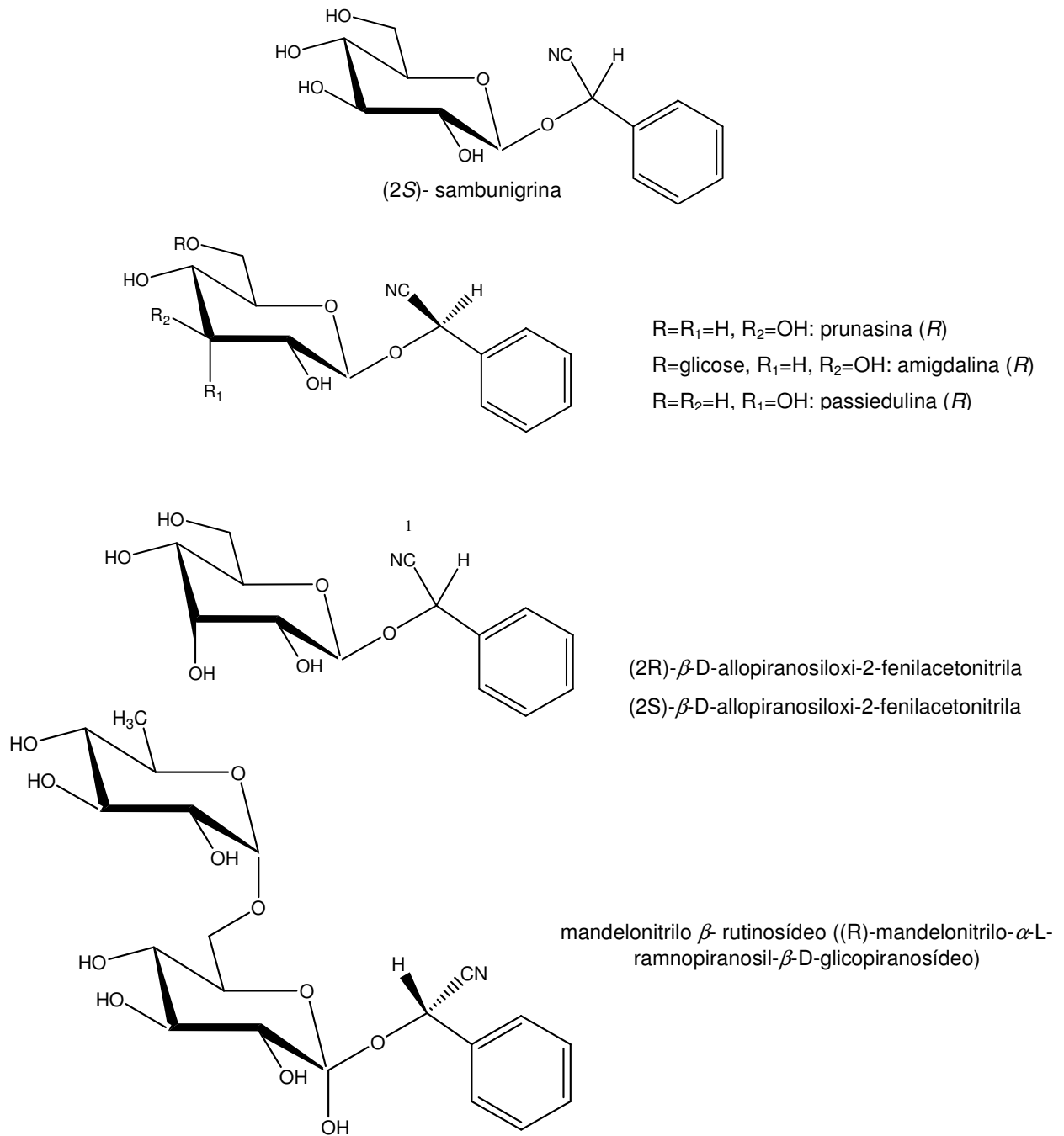


Figura 10: Glicosídeos cianogênicos descritos para a espécie *P. edulis* var. *edulis*.

Spencer e Seigler (1983) encontram níveis significativos de glicosídeos cianogênicos em todas as partes da espécie *P. edulis*, exceto nas sementes. Nesse estudo foram comparados os níveis de glicosídeos cianogênicos em todas as partes do maracujá-amarelo e do roxo. Também foi comparado o conteúdo de cianeto entre a parte comestível do fruto (arilo) e a parte não comestível (pericarpo), em vários

estágios de desenvolvimento do maracujá amarelo (imaturo, intermediário e maduro). Como pode ser observado na tabela 2 os maiores níveis de glicosídeos cianogênicos foram encontrados nos frutos imaturos do maracujá amarelo e não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de HCN entre as partes comestíveis e não-comestíveis dos frutos do maracujá amarelo. Desta forma, os autores concluem que todas as partes do fruto do maracujá são tóxicas quando ainda imaturo, com exceção das sementes, e também que o fruto contém significantes quantidades de glicosídeos cianogênicos, que diminuem com a maturação. Em geral, plantas que contêm 20 mg de HCN/100g de material vegetal fresco são consideradas tóxicas e a dose letal em humanos corresponde a 70 mg de HCN. Na tabela 2 observa-se que o conteúdo de cianeto nos frutos de *P. edulis* var. *flavicarpa* variou de 6,5 mg (frutos maduros) a 59,4 mg (frutos imaturos) de HCN/100 g de material vegetal fresco.

Tabela 2: Comparação da concentração de HCN em diferentes partes e fases de maturação do maracujá-amarelo e roxo.

Variedade de maracujá	Parte da planta	Fase de maturação	mg de HCN/100 g de material vegetal fresco (p/v)
Roxo (coletado na Califórnia)	Folhas	-	11,6
	Frutos	Imaturo	13,3
		Intermediário	10,5
		Maduro ¹	10,0
Amarelo (coletado na Flórida)	Frutos	Imaturo	59,4
		Intermediário	15,4
		Maduro	14,6
	Maduro ²	6,5	
Amarelo (coletado na Flórida)	Fruto	Intermediário	11,9
	Arila	Imaturo	59,4
	Pericarpo		58,3
	Arilo	Intermediário	17,8
	Pericarpo		22,3
	Arilo (incluindo suco)	Maduro	16,9
	Pericarpo		11,5

¹Fruto colhido do maracujazeiro e ² Fruto colhido no chão.

Fonte: Spencer; Seigler (1983)

5. INFORMAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Vários ensaios pré-clínicos e poucos ensaios clínicos foram desenvolvidos para avaliar as atividades farmacológicas de espécies de *Passiflora*. Na tabela 3 estão descritos, de forma sumarizada, os principais ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* conduzidos especificamente com a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*. A grande maioria dos trabalhos foi desenvolvida para avaliar atividades relacionadas ao sistema nervoso central. Com exceção dos trabalhos destacados, os demais estudos apresentaram resultados positivos para as atividades avaliadas.

Tabela 3: Estudos pré-clínicos e clínicos relatados para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*.

Parte da planta	Tipo de extrato	Dose e via de administração	Modelo	Referências
<i>Estudos in vivo</i>				
Atividade ansiolítica e sedativa				
suco	-	v.o.	Movimentação espontânea; observação da irritabilidade; busca por alimentos	Lutomski; Malek; Rybacka, 1975.
folhas	aquoso	20 e 40 mg/Kg, ip.	Movimentação espontânea; tempo de sono induzido por pentobarbital	Vale; Leite, 1983
folhas	aquoso	30 mg/Kg, i.p.	Movimentação espontânea; rota Road; tempo de sono induzido por pentobarbital	Maluf et al., 1991.
partes aéreas	metanólico	75, 100, 125, 200 e 300 mg/Kg, v. o.	Labirinto em cruz elevado	Dhawan; Kurma; Sharma, 2001*.
folhas	aquoso	50, 100 e 150 mg/Kg, i. p.	Labirinto em cruz elevado	De Paris et al., 2001

* Não apresentou atividade.

Continuação Tabela 3.

Parte da planta	Tipo de extrato	Dose e via de administração	Modelo	Referências
folhas	aquoso	400 e 800 mg/Kg, v.o.	Labirinto em cruz elevado	Reginatto et al., 2006.
folhas	hidroetanólico 40 %	50, 100 e 150 mg/Kg, i.p.	Labirinto em cruz elevado	Peiry et al., 2001.
Analgésica				
folhas	aquoso	20 e 40 mg/Kg, i.p.	Método da placa quente	Vale; Leite, 1983.
Anticonvulsivante				
folhas	aquoso	20 e 40 mg/Kg, i.p.	Convulsões induzidas por pentilenotetrazol	Vale; Leite, 1983 *.
folhas	aquoso	30 mg/Kg, i.p., v.o	Convulsões induzidas por pentilenotetrazol	Maluf et al., 1991*.
Anti-inflamatória				
folhas	hidroetanólico 40 %	100-1000 mg/Kg, i.p.	Pleurisia induzida por carragenina	Vargas et al., 2007

* Não apresentou atividade.

Continuação Tabela 3

Parte da planta	Tipo de extrato	Dose e via de administração	Modelo	Referências
folhas	aquoso	250 mg/Kg, i.p.	Pleurisia induzida por carragenina	Montanher et al., 2007.
folhas	aquoso	100 mg/Kg, i.p.	Bolsa de ar induzida por carragenina	Benincá et al., 2007.
Anti-hipertensiva				
suco e folhas	extrato etanólico	500 mg/Kg, v.o.	hipertensão arterial induzida por L-NAME	Rojas et al., 2006.
Marcação de constituintes sanguíneos com ^{99m} Tc, morfologia das células sanguíneas e biodistribuição pertecnato de sódio				
pericarpo	farinha	50 mg/Kg, v.o./7 dias	Radioatividade contada pelo Contador Gamma, morfologia: May Grunwald Giemsa; biodistribuição: células marcadas com ^{99m} Tc de sódio	Rebello et al., 2008.
Hipoglicemiante				
pericarpo	farinha	Suplementação com 50, 100 e 150% da ID*	Diabetes mellitos induzida por aloxano, i.p.	Junqueira-Guertzenstein, 2002.

* ingestão diária recomendada de fibra (25 a 35 g de fibras/70 Kg/dia)

Continuação Tabela 3.

Parte da planta	Tipo de extrato	Concentração	Modelo	Referências
Hipocolesterolemizante				
semente	farinha	Dieta contendo 5% da fibra insolúvel	hamsters alimentados com uma dieta hipocolesterolêmica	Chau; Huang, 2005.
<i>Estudo clínico</i>				
Hipocolesterolemizante				
pericarpo	farinha	30g/dia durante 60 dias	Estudo clínico piloto fase II – mulheres de 30 a 60 anos	Ramos et al., 2007.
<i>Estudos in vitro e ex vivo</i>				
Anti-Metaloproteinase de matriz (MMP)/MMP-2 e MMP-9				
Atividade antiviral				
raízes	aquoso	Concentrações de 2000 a 15,6 µg/mL	Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1), cepas KOS e 29R (resistente ao aciclovir) e vírus rábico, cepa PV	Muller et al., 2007.
frutos	aquoso	4,32; 7,2; 12; 20 mg/mL	zimografia de gelatina	Puricelli et al., 2003.

Continuação Tabela 3.

Parte da planta	Tipo de extrato	Concentração	Modelo	Referências
Antioxidante e antiglicação				
folhas	hidroetanólico 40%	1 e 10 µg/mL	TRAP (Potencial reativo antioxidante total) (<i>in vitro</i>)	Rudnicki et al., 2005.
		1 µg/mL	Estresse oxidativo induzido por FeSO ₄ (<i>ex vivo</i>), proteínas carboniladas (<i>ex vivo</i>); concentração de TBARS-substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>ex vivo</i>)	
		10 µg/mL	Glicação não enzimática de proteínas (<i>in vitro</i>)	

CAPÍTULO 2: Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* por meio de um fracionamento biomonitorado

1. INTRODUÇÃO

Previamente aos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, por meio de uma revisão na literatura, foi verificado apenas um trabalho de Borrelli e colaboradores (1996), que relataram a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico liofilizado das partes aéreas (60: 40, água: etanol) da espécie *Passiflora incarnata*, administrado via oral, em ratos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando-se os modelos de edema de pata induzido por carragenina, pleurisia induzida por dextrana e formação de granuloma por cróton. O extrato de *P. incarnata* demonstrou importante atividade anti-inflamatória nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg, através da inibição do edema, da migração de células e granuloma. Nesse trabalho foi utilizado o ácido acetil salicílico como controle positivo.

Na Pós-Graduação em Farmácia desta Universidade vem sendo avaliado a atividade anti-inflamatória de espécies de *Passiflora* desde 2003, em estudos desenvolvidos em cooperação entre o Laboratório de Química Farmacêutica, liderado pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e o Laboratório de Imunologia Clínica, liderado pela Profa. Dra. Tânia Sílvia Fröde. No primeiro estudo foi avaliado a atividade anti-inflamatória dos extratos aquosos das folhas de *P. alata* e *P. edulis*, obtido por refluxo em água e subsequentemente secagem por *Spray Dryer*, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, administrados sistemicamente. O extrato de *P. alata* (100-300 mg/Kg) e *P. edulis* (100-1000 mg/kg) inibiram o influxo de leucócitos e o grau de exsudação. Ambos extratos, nas doses de 100 mg/Kg e 250 mg/Kg inibiram, ainda, a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina deaminase (ADA), além das concentrações da Proteína C-reativa, respectivamente (VARGAS et al., 2007).

Posteriormente, foi avaliada a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso liofilizado das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, obtido por infusão, no modelo de pleurisia induzida pela carragenina. O extrato, na dose de 250 mg/Kg, por via intraperitoneal, inibiu o influxo de leucócitos e neutrófilos e a atividade de MPO e as concentrações de óxido nítrico, do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina 1 beta (IL-1 β) (MONTANHER et al., 2007). O mesmo extrato, assim como as frações *n*-butanólica (BuOH) e residual aquosa, também foram avaliados pelo modelo da bolsa de ar induzida por carragenina, em camundongos. O extrato aquoso (100 mg/Kg), fração BuOH (50 mg/Kg) e fração residual aquosa (100 mg/Kg) inibiram o influxo de leucócitos e neutrófilos, a atividade de MPO e os níveis de óxido nítrico, IL-1 β e proteína inflamatória de macrófago-2 (MIP-2) (BENINCÁ et al., 2007).

Dentro deste contexto, este capítulo apresenta a continuidade da avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*. O artigo em anexo descreve a avaliação da atividade anti-inflamatória, utilizando-se o modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos, por meio de um fracionamento biomonitorado, com o intuito de caracterizar quais os compostos estão envolvidos na resposta inflamatória apresentada pelo extrato aquoso das folhas de *P. edulis*.

Para melhor contextualizar a investigação realizada, será apresentada a seguir uma breve revisão sobre o processo inflamatório e sobre o modelo de inflamação utilizado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Processo inflamatório

A inflamação é caracterizada clinicamente por apresentar cinco sinais principais: eritema, edema, calor, dor e perda da função, porém a resposta inflamatória envolve mecanismos complexos de ativação celular e liberação de mediadores químicos, em resposta ao reconhecimento de um agente ou estímulo lesivo e tem como objetivo principal a reparação do tecido lesado (SUZUKI et al., 2003; NATHAN, 2006; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

O reconhecimento do agente ou estímulo lesivo desencadeia a ativação e a amplificação da resposta imunológica, resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória (NATHAN, 2006; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos (polimorfonucleares) são os leucócitos mais abundantes e as primeiras células a serem recrutadas para o local da inflamação. Os neutrófilos são capazes de fagocitar o agente estranho, devido ao conteúdo citoplasmático de suas células, do qual pode-se citar a presença da enzima MPO, que é sintetizada e secretada pelos neutrófilos e corresponde a 5 % do total de proteínas dessas células (SEGAL, 2005; NATHAN, 2006; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

A MPO é armazenada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos, mas durante a fase de diferenciação dos monócitos para macrófagos, essas células perdem a capacidade de sintetizar MPO. Essa enzima promove a liberação de espécies reativas de oxigênio a partir da conversão do oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido (O_2^-), promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Posteriormente, a enzima superóxido desmutase (SOD)

converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui ação microbicida. O peróxido de hidrogênio, juntamente com o ânion cloreto (Cl^-) formam o ácido hipocloroso ($HOCl$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROS), também responsáveis pela ação microbicida da MPO no interior dos fagossomas dos neutrófilos (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000; SEGAL, 2005; LAU; BALDUS, 2006; NATHAN, 2006). O aumento da atividade de MPO, tanto nos tecidos como no plasma, é utilizado como marcador de leucocitose neutrofílica, em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008).

Outras células envolvidas no processo inflamatório são os monócitos (mononucleares). Essas células migram para o sítio inflamatório algumas horas após o início do processo inflamatório e persistem em casos inflamatórios crônicos, quando os neutrófilos podem não estar mais presentes, como por exemplo, em casos de aterosclerose (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos durante a fase de maturação. Dessa maneira, os monócitos são células que migram para vários tecidos, podendo diferenciar-se em macrófagos, que são células residentes e apresentam variações morfológicas e funcionais conforme o tipo de tecido em que se encontram (TAKAHASHI, TAKEYA, SAKASHITA, 2002; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). As funções biológicas dos monócitos/macrófagos ativados estão relacionadas principalmente a captura, processamento e morte de antígenos não-específicos e ativação de linfócitos (HASKO et al., 2007).

Dentre os diversos mediadores envolvidos no processo inflamatório, as citocinas merecem destaque. As citocinas têm um papel importante na regulação do processo inflamatório, induzindo a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos, promovendo o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, na resposta inflamatória aguda (TAYAL; KALRA, 2008; BOZKURT;

MANN; DESWAL, 2009). Dentre as principais citocinas secretadas pelas células fagocíticas ativadas, pode-se citar a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), ambas citocinas pleiotrópicas, tanto a nível local como sistêmico (CONE, 2002; MANDERSCHIED et al., 2004; NATHAN, 2006; BOZKURT; MANN; DESWAL, 2009). Outras citocinas de relevada importância no processo inflamatório são as quemocinas, especialmente, da família CXC, como a interleucina 8 (IL-8), assim denominada em humanos e representada em camundongos pelo nome KC (LUSTER, 1998; WELLS; PROUDFOOT; POWER, 1999; MANDERSCHIED et al., 2004).

O TNF- α é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos, mas também por mastócitos e linfócitos (ALVES; RIBEIRO, 2004). O TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quemocinas, além de ser um dos principais reguladores da produção e liberação de IL-1 β (CONE, 2002). Os níveis elevados de TNF- α estão associados a algumas doenças inflamatórias, como por exemplo: artrite reumatóide (NATHAN, 2006), asma brônquica (WARK et al., 2007) e espondilite anquilosante (DE KEYSER et al., 2004).

A IL-1 β é secretada principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos, mas também por neutrófilos (BARKSBY et al., 2007). Essa citocina atua sobre a expressão de outras citocinas, como por exemplo, estimulando a liberação de TNF- α (TAKAHASHI; KOBAYASHI; OKABE, 1999; BUJAK; FRANGOGIANNIS, 2008), atua também no aumento da expressão de moléculas de adesão, como as moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1), nas células endoteliais e nos leucócitos, promovendo assim a diapedese leucocitária (CONE, 2002; BUJAK; FRANGOGIANNIS, 2008). A IL-1 β também atua sobre a expressão dos fatores de

crescimento e de seus receptores e, das enzimas ciclooxigenase 2 (COX 2) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (TAKAHASHI; KOBAYASHI; OKABE, 1999). Dependendo da origem celular, IL-1 β e TNF- α podem estimular a liberação de IL-6 (KORN et al., 2009). Dessa forma, TNF- α , IL-1 β , juntamente com IL-6, são importantes estímulos para a produção e liberação de IL-8, quemocina responsável pela quimiotaxia de neutrófilos (LUSTER et al., 1998; SAUNDERS; TARBY, 1999). Os níveis elevados de IL-1 β estão associados a muitas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide (TOUSSIROT; WENDLING, 2007), osteoartrite (PUJOL et al., 2008) e arterosclerose (JAWIEN, 2008).

2.2 Modelo de Inflamação

No presente trabalho, foi escolhido o modelo de inflamação de pleurisia, originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1989). Este modelo possibilita a avaliação do extravasamento de líquido bem como a migração de células (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; DALMARCO; FRODE; MEDEIROS, 2002, 2004) e ainda a participação de outros mediadores como: citocinas, enzimas e outros mediadores químicos pró-inflamatórios induzidos por diversos agentes flogísticos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; 1997; 1999; FRODE-SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999; DA CUNHA et al., 2001; FRODE; MEDEIROS, 2001; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2002).

A carragenina, agente flogístico utilizado para a indução da inflamação, produz uma resposta inflamatória aguda no modelo da pleurisia em camundongos. Após 4 h da administração da carragenina na cavidade pleural ocorre aumento da

exsudação bem como de leucócitos do tipo polimorfonucleares (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

O artigo a seguir descreve o fracionamento biomonitorado da fração butanólica das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, utilizando-se o modelo de pleurisia induzida por carragenina, em camundongos.

PUBLICAÇÃO:

**Biassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from
Passiflora edulis.**

Zucolotto, S. M., Goulart, S., Montanher, A. B., Reginatto, F. H., Schenkel, E.

P., Frode, T. S.

Planta Medica, v. 75, p. 1221-6, 2009.

Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory C-Glucosylflavones from *Passiflora edulis*

Authors

Silvana Maria Zucolotto¹, Stella Goulart², Ana B. Montanher², Flávio Henrique Reginatto¹, Eloir Paulo Schenkel¹, Tânia Sílvia Fröde²

Affiliations

¹ Department of Pharmaceutical Science, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

Key words

- *Passiflora edulis*
- Passifloraceae
- anti-inflammatory activity
- isoorientin
- vicenin-2
- spinosin

Abstract

Passiflora edulis, commonly known as “maracujá”, is widely cultivated in Brazil for the industrial production of juice. The species of *Passiflora* are popularly used as a sedative or tranquilizer, and also against intermittent fever and skin inflammation. In this study we evaluated the anti-inflammatory activity of four sub-fractions and three isolated compounds from the butanolic fraction of *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves, using the mouse model of pleurisy induced by carrageenan. The butanolic fraction obtained from an aqueous extract of *P. edulis* (50 and 100 mg/kg, *i.p.*) showed anti-inflammatory activity by inhibiting leukocytes and neutrophils ($p < 0.01$). Sub-fraction C showed itself to be more effective than the other sub-fractions ($p < 0.01$). Isoorientin (**1**), vicenin-2 (**2**) and spinosin (**3**) were isolated from the active sub-fraction C derived from the butanolic fraction. The sub-fraction C (50 mg/kg, *i.p.*), as well as its major isolated compounds (25 mg/

kg, *i.p.*), inhibited leukocytes and neutrophils ($p < 0.05$). Additionally, the butanolic fraction and isoorientin also inhibited myeloperoxidase activity ($p < 0.05$). The present study showed that the C-glucosylflavones isolated from *P. edulis* leaves can be responsible for the anti-inflammatory effect of *P. edulis* on the mouse model of pleurisy.

Abbreviations

- ▼
- COX-2: cyclooxygenase 2
- i.p.*: intraperitoneal route
- i.pl.*: intrapleural route
- IL-1 β : interleukin 1 β
- iNOS: inducible nitric oxide synthase
- LPS: lipopolysaccharide
- MPO: myeloperoxidase
- NF- κ B: nuclear factor kappa B
- PGE₂: prostaglandin E₂
- TNF- α : tumor necrosis factor- α

received Sept. 9, 2008
revised February 25, 2009
accepted March 3, 2009

Bibliography

DOI 10.1055/s-0029-1185536
Published online 2009

Planta Med © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Tânia Sílvia Fröde

Department of Clinical Analysis
Center of Health Sciences
Federal University of Santa
Catarina (UFSC)
Campus Universitário
Trindade, s/n
Florianópolis, CEP 88040-970
Santa Catarina
Brazil
Phone: + 55 48 3721 98 56
Fax: + 55 48 3244 09 36
saleh@ccs.ufsc.br

Introduction

▼
Species of the genus *Passiflora* (Passifloraceae) are widely distributed throughout America [1]. In Brazil these species are popularly known as “maracujá” and are widely cultivated, mainly due to their utilization in industrial juice production [2]. Two types of *P. edulis* are cultivated in Brazil, the purple form (*P. edulis* Sims) and a yellow form (*P. edulis* var. *flavicarpa*) [2]. In popular medicine, the tea of their leaves is used mainly as a sedative or tranquilizer, but also in the treatment of intermittent fever and skin inflammation [3]. While the sedative and anxiolytic activities of *Passiflora* genus have been studied [4–6], there are few reports concerning the investigation of the anti-inflammatory activity of *Passiflora* species. There is one report related to the investigation of this ac-

tivity with *P. incarnata* leaves [7], and our previous studies have been focused on the anti-inflammatory activity of *P. edulis* leaf extracts [8–10]. Considering that in our previous studies the lyophilized aqueous extract from *P. edulis* leaves showed important anti-inflammatory activity, we wondered which would be the active constituents contributing to this activity. Therefore, the purpose of the present study was to isolate and identify the active anti-inflammatory components from *P. edulis* leaves under bioassay-guided fractionation procedure.

Material and Methods



General experimental procedures

The NMR (^1H , ^{13}C and 2-D-NMR) experiments were performed on Bruker Avance 400 MHz and Bruker AM 500 MHz spectrometers. UV analysis was recorded on a Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25 Spectrometer. HPLC analysis was performed on a Shimadzu SCL-10A with an UV detector SPD-10AV. Myeloperoxidase activity was measured in an ELISA plate reader (Elisa plate reader, Organo Teknika).

Drugs and reagents

The following drugs and reagents were used: carrageenan (degree IV), human polymorphonuclear leukocyte myeloperoxidase, diphenylboryloxyethylamine (Sigma Chemical Co.), indomethacin, dexamethasone, May-Grünwald dye (Newprov) and Giemsa dye (Laborclin), orientin ($\geq 98.0\%$, Extrasynthèse), isoorientin ($\geq 98.0\%$, Extrasynthèse), vitexin ($\geq 96.0\%$, Fluka) and isovitexin ($\geq 98.0\%$, Fluka). The compound 6,8-di-C-glycosylchrysin ($\geq 96.0\%$) isolated from *Lichnophora ericoides* leaves was provided by Dr. Norberto Peporino Lopes. Spinisin ($> 98.0\%$) was obtained from *Wilbrandea ebracteata* roots [11]. Sephadex LH-20 (Pharmacia) and silica gel G 60 powder were used for CC and F_{254} plates for TLC (E. Merck). TLC plates was visualized by spraying with a methanol solution of diphenylboryloxyethylamine 1% (NP Reagent A) (Sigma). The solvents used for HPLC analyses were purchased from Tedia[®] (HPLC grade). All other reagents used were of analytical grade and were purchased from Nuclear[®]. The extract, fractions and isolated compounds from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener and dexamethasone were diluted in saline (0.9% NaCl). Indomethacin was diluted in NaOH (0.1 N, pH 8.0).

Plant material

The leaves of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener were collected in Antônio Carlos, Santa Catarina, Brazil and identified by the botanist Prof. Dr. Daniel Falkenberg (Department of Botany of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil). A voucher specimen was deposited in the Herbarium at the same university (FLOR 33886).

Extraction and isolation

The leaves of *P. edulis* (200 g) were air-dried at room temperature, powdered, and extracted using hot water (90 °C) by infusion (plant: solvent, 1: 10, w/v) for 10 min. Thereafter, the aqueous extract was filtered and partitioned with EtOAc (3 × 300 mL) and *n*-BuOH (3 × 300 mL), yielding 1.5 g of EtOAc fraction and 5.6 g of BuOH fraction. The EtOAc and BuOH fractions were analyzed by TLC using the following conditions: aluminum pre-coated sheets with silica gel F_{254} , as adsorbent, EtOAc: formic acid: H_2O (8: 1: 1/ v/v/v), as mobile phase and detected with a methanol solution of diphenylboryloxyethylamine (1%) (NP Reagent A). The spots were observed under short- and long-wave UV light. Both fractions showed similar chromatographic profiles concerning the flavonoid C-glycosides. Then, based on this TLC analysis, the BuOH fraction (5.6 g) was submitted to flash chromatography on silica gel 60 G. It was then eluted with EtOAc, followed by stepwise gradient mixtures of EtOAc: MeOH (EtOAc: 9: 1; 8: 2; 7: 3; 6: 4; 5: 5; 4: 6; 3: 7; 2: 8; 1: 9 and MeOH) yielding four major fractions (sub-fractions A – D). For each step a volume of 250 mL was collected. The sub-fraction C (600 mg) was chromatographed on a silica gel (60, 0.2–0.5 mm, 67 g) column (2.5 × 52 cm) and eluted with

EtOAc: acetone: acetic acid: H_2O (60: 20: 10: 10, v/v/v/v), flow rate = 2 mL/min and collected volume of 30 mL, yielding 14 fractions (1–14). The fraction 7 (55 mg) was purified on a Sephadex LH-20 column (2.5 × 45 cm, 35 g), using MeOH as eluent, flow rate = 1 mL/min to give the pure compound **1** (10 mg). Subsequently, the fraction 11 (110 mg) was fractionated by CC (1.5 × 26 cm) over silica gel (0.063–0.2 mm, 20 g) and eluted with CHCl_3 : MeOH: H_2O (61: 32: 7, v/v/v), flow rate = 1 mL/min yielding 6 main fractions (1–6). Finally, the fraction 4 (50 mg) was further purified on a Sephadex LH-20 column (2.5 × 45 cm, 35 g), using MeOH as mobile phase, flow rate of 1 mL/min, resulting in two pure compounds, compound **2** (28 mg) and compound **3** (7 mg). The same procedure was repeated in order to isolate these compounds in greater amounts, resulting in approximately 130 mg of compound **1**, 80 mg of compound **2**, and 25 mg of compound **3**.

HPLC analysis

The chromatographic profile of the BuOH fraction and sub-fractions A, B, C and D and the purity of the isolated compounds **1**, **2** and **3** were analyzed by HPLC. All samples were dissolved in MeOH: H_2O (1: 1), filtered using a 0.45 μm syringe filter (PVDF, Waters) and 20 μL aliquots were injected for HPLC analysis. The analyses were performed on a Luna RP C18 (5 μm) (150 mm × 4.6 mm) column (Phenomenex[®]). The mobile phase consisted of solvent A [THF: 2-propanol: ACN (10: 2: 3, v/v/v)] and solvent B (0.5% phosphoric acid). The separation was achieved at room temperature (22 ± 2 °C) using isocratic elution (60 min 12% A in B) with a flow rate of 1 mL/min and UV detection (340 nm). In all chromatographic analyses the C-glycosyl flavonoids orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, spinisin and 6,8-di-C-glycosylchrysin were used as authentic samples. The peaks were identified by comparison of their retention times (t_r) and by co-injection with authentic samples. Each sample was analyzed in triplicate.

Animals

Swiss mice (18–23 g) of both sexes were purchased from the Federal University of Santa Catarina. They were maintained with free access to food and water at 21 ± 2 °C and kept on a 12 h/12 h light/dark cycle. Animal and experimental procedures were carried out strictly in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (published by the Brazilian College of Animal Experimentation) and the related ethical regulations of our University (Committee for Ethics in Animal Research of the Federal University of Santa Catarina: Protocol: PP00035).

Carrageenan-induced mouse pleurisy

As previously described [12], pleurisy was induced by a single injection of 0.1 mL of carrageenan (1%) administered by the intrapleural route (*i.pl.*). After 4 h the animals were sacrificed by an overdose of pentobarbital. The thorax was opened and the pleural cavity was washed with 1.0 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6) containing heparin (20 IU/mL). Several samples of the pleural fluid were collected for further determination of total and differential leukocytes, as well as myeloperoxidase (MPO) activity. Total leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber and cytospin preparations of pleural wash were made using a cytocentrifuge (Cytopro, model 7620). The slides were stained with May-Grünwald Giemsa for the differential leukocyte count, which was performed under an oil immersion objective.

Based on previous results revealing that the aqueous extract from *P. edulis* leaves was effective in inhibiting inflammatory parameters [9,10], in another set of experiments we investigated sub-fractions and isolated compounds from the BuOH fraction of *P. edulis* leaves. In this protocol the doses and timing used were also based on previous studies in our laboratory [9,10]. In this protocol different groups of animals were pretreated 0.5 h prior to pleurisy induction with different doses of BuOH fraction (25, 50 and 100 mg/kg), sub-fractions A – D (50 mg/kg) and isolated compounds **1**, **2** and **3** (25 mg/kg). The total and differential leukocytes were analyzed 4 h after pleurisy induction. In parallel, different groups of animals received 0.1 mL of 0.9% NaCl (negative control group) or carrageenan (phlogistic agent-control group) by intrapleural (*i.pl.*) route or indomethacin (5 mg/kg) or dexamethasone (0.5 mg/kg) by intraperitoneal (*i.p.*) route. Indomethacin and dexamethasone were used as reference drugs. The inflammation was observed 4 h after pleurisy induction.

Myeloperoxidase assay

Standard samples with different concentrations of myeloperoxidase (from human neutrophils, Sigma: M6908) were prepared in order to obtain a standard curve in the range of 0.07–140 mU/mL. Pleural cavity fluid samples (40 μ L) and standards were transferred to cuvettes and the reaction was initiated with the addition of 360 μ L of assay buffer (0.167 mg/mL of *o*-dianisidine 2 HCl and 0.0005% H₂O₂). The reaction was stopped with 1% sodium azide. Afterwards, the samples were centrifuged at 50 \times g for 5 min, the supernatants were separated, and the rates of changes in absorbance at 520 nm were determined. MPO activity was estimated by interpolation from the standard curve by means of colourimetric measurements in an ELISA plate reader (Organon Teknika) [13,14]. Results were expressed as mU/mL.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical evaluation by Student's *t*-test was performed when only two value sets were compared, and one-way ANOVA followed by Dunnett's test was used when the data involved three or more groups. Data was considered significant if the *p* value was <0.05.

Results

In the present study, the BuOH fraction at doses of 50 and 100 mg/kg significantly reduced leukocytes by 31 \pm 4% and 57 \pm 5%, respectively ($p < 0.01$) (● Fig. 1 A). This reduction was due to neutrophil decreases by 38 \pm 5% and 67 \pm 6% ($p < 0.01$) (● Fig. 1 B). The mononuclears did not vary ($p > 0.05$) (● Fig. 1 C). The dose of 25 mg/kg did not inhibit these inflammatory parameters ($p > 0.05$) (● Fig. 1). As expected, indomethacin (5.0 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg) markedly inhibited leukocytes by 63 \pm 5% and 69 \pm 3% ($p < 0.01$), neutrophils by 64 \pm 5% and 81 \pm 4%, and mononuclears by 60 \pm 5% and 44 \pm 15% ($p < 0.05$) (● Fig. 1 A, B and C, Table 1). The time course profile also demonstrated that this activity was effective only at 0.5 h of the animal pretreatment (results not shown).

Following the bioassay-guided fractionation process, the BuOH fraction was submitted to flash column chromatography, resulting in four sub-fractions (A – D). Each sub-fraction was submitted to a screening in the same experimental model at the dose of 50 mg/kg (● Table 1). The sub-fraction A (50 mg/kg) did not in-

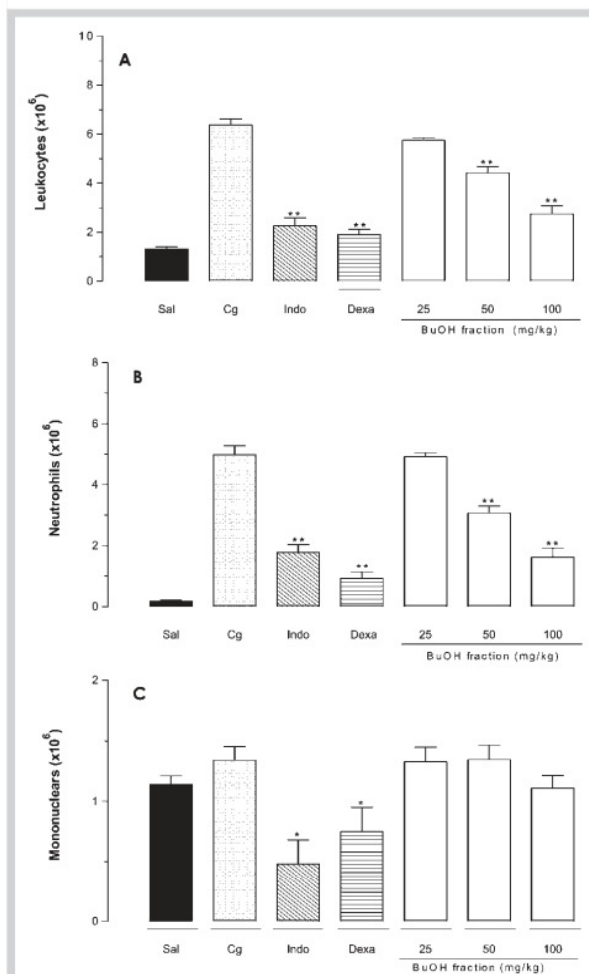


Fig. 1 Effect of the BuOH fraction of *P. edulis* leaves (50 and 100 mg/kg, *i.p.*) administered 0.5 h before pleurisy induction by carrageenan, in mice: **A** leukocytes, **B** neutrophils, **C** mononuclears. Sal = animals treated only with sterile saline (NaCl 0.9%, *i.pl.*), Cg = animals treated only with carrageenan (1%, *i.pl.*), Indo = animals pretreated with indomethacin (5 mg/kg, *i.p.*), Dexa = animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg, *i.p.*). Values of repeated experiments ($n = 6$) are indicated as the mean and S.E.M. The asterisks indicate the statistical differences, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test).

hibit the same studied inflammatory parameters ($p > 0.05$). On the other hand, the sub-fractions B, C and D (50 mg/kg) significantly reduced leukocytes by 24 \pm 2%, 50 \pm 14% and 38 \pm 8% ($p < 0.01$) (● Table 1). This effect was associated with the inhibition of neutrophils by 24 \pm 3%, 72 \pm 12%, and 56 \pm 13% ($p < 0.05$) (● Table 1). The sub-fraction B did not vary mononuclears ($p > 0.05$), but the sub-fractions C and D caused significant enhancement of these cells by 42 \pm 15% and 40 \pm 10% ($p < 0.05$) (● Table 1). A dose-response profile (25, 50 and 100 mg/kg) was done for the sub-fraction C that displayed a higher anti-inflammatory effect than the other sub-fractions. The sub-fraction C at a dose of 25 mg/kg did not have effect ($p > 0.05$), but at 100 mg/kg it inhibited the leukocytes influx by 41 \pm 9% ($p < 0.01$), neutrophils by 62 \pm 12% ($p < 0.01$) and showed an enhancement of mononuclears by 49 \pm 7% ($p < 0.01$) (results not shown). Therefore, the sub-fraction C was selected for further fractionation.

Groups/doses	Leukocytes ($\times 10^6$)	Neutrophils ($\times 10^6$)	Mononuclears ($\times 10^6$)
Sal ^a	0.72 \pm 0.04	0.010 \pm 0.01	0.71 \pm 0.04
Cg ^a	6.10 \pm 0.26	5.00 \pm 0.29	1.20 \pm 0.08
A (50 mg/kg) ^b	5.80 \pm 0.22	4.80 \pm 0.15	0.95 \pm 0.10
B (50 mg/kg) ^b	4.70 \pm 0.13**	3.80 \pm 0.10*	0.85 \pm 0.17
C (50 mg/kg) ^b	3.10 \pm 0.85**	1.40 \pm 0.60**	1.70 \pm 0.26*
D (50 mg/kg) ^b	3.80 \pm 0.52**	2.20 \pm 0.64**	1.60 \pm 0.12*
Indo (5 mg/kg) ^b	2.30 \pm 0.32**	1.80 \pm 0.25**	0.48 \pm 0.20*
Dexa (0.5 mg/kg) ^b	1.90 \pm 0.21**	0.93 \pm 0.20**	0.75 \pm 0.20*

Table 1 Effect of sub-fractions A, B, C and D from *P. edulis* leaves upon total and differential leukocytes on the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

Sub-fractions A, B, C and D (50 mg/kg) from *P. edulis* leaves administered to different groups of animals 0.5 h before pleurisy induction by carrageenan. Sal = responses in animals treated only with sterile saline (0.9% NaCl), Cg = responses in animals treated only with carrageenan (1%), Indo = responses in animals pretreated with indomethacin (5 mg/kg), Dexa = responses in animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Values of repeated experiments (n = 6) are indicated as the mean and S.E.M. The asterisks indicate the statistical differences * p < 0.05 and ** p < 0.01 (Student's t-test). N = 6 animals. ^a Administered by the intrapleural route. ^b Administered by the intraperitoneal route

* Figura 2 está apresentada de forma ampliada ao final do artigo.

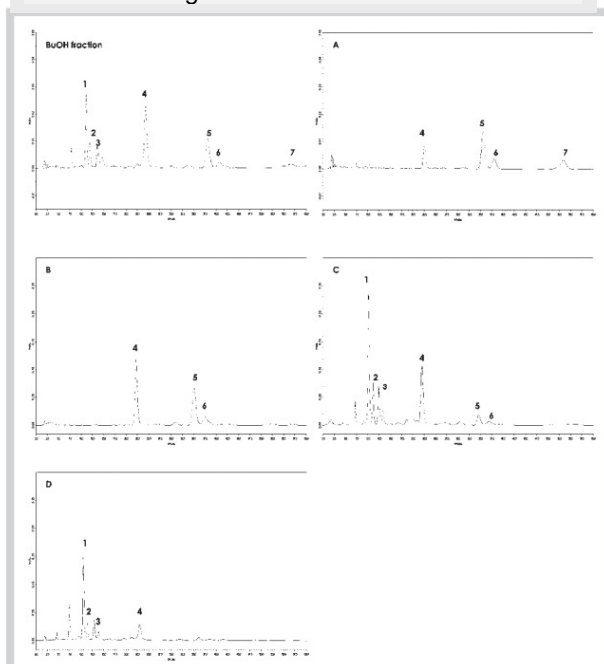


Fig. 2 HPLC chromatograms of BuOH fraction and sub-fractions A, B, C and D from *P. edulis* leaves. Peaks: 1 = vicenin-2, 2 = 6,8-di-C-glycosylchrysin, 3 = spinosin, 4 = isoorientin, 5 = isovitexin, 6 = orientin, 7 = vitexin. Chromatographic conditions: see experimental protocol.

Then the next step was to analyze this later fraction in comparison to the BuOH fraction by TLC and HPLC, aiming to identify the major compounds in both fractions which could be responsible to the anti-inflammatory actions. The chromatographic analysis by TLC and HPLC of sub-fraction C showed four main components (Fig. 2). Then, the sub-fraction C was submitted to successive chromatography procedures resulting in the isolation of four compounds (1–4) (Fig. 3). The structure of compound 1 was elucidated as isoorientin using UV and NMR spectral (in CD₃OD) data, compared with the literature [15] and confirmed by TLC and HPLC comparison with authentic sample. Compound 2 was identified as vicenin-2, by NMR spectral data (¹H- and ¹³C-NMR) as well as 2D-NMR techniques-COSY and HSQC/DMSO) and comparison with the literature [16] (Fig. 3). Compounds 3 and 4 were identified by UV spectral data and by comparison with authentic

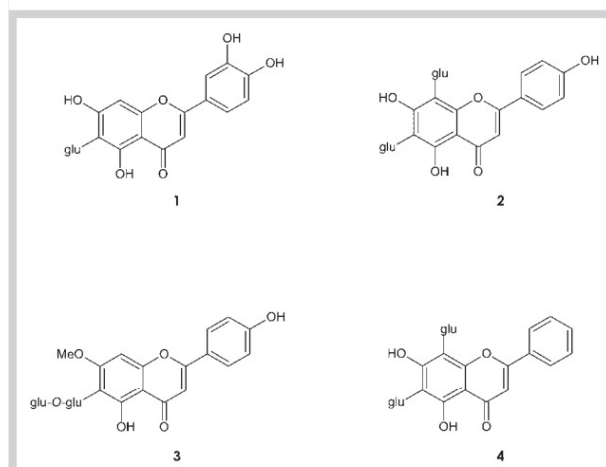


Fig. 3 Chemical structures of compounds 1, 2, 3 and 4. 1 = isoorientin, 2 = vicenin-2, 3 = spinosin, 4 = 6,8-di-C-glycosylchrysin; glu = glucose moiety.

samples through TLC and HPLC as spinosin and 6,8-di-C-glycosylchrysin (Fig. 3).

The analysis of sub-fraction C through HPLC showed vicenin-2 as the major peak ($r_t = 10.13$) and isoorientin ($r_t = 21.98$) as the second major peak, followed by 6,8-di-C-glycosylchrysin ($r_t = 11.10$) and spinosin ($r_t = 12.39$). On the other hand, in the BuOH fraction the major peaks observed were isoorientin and vicenin-2. TLC and HPLC in comparison with authentic samples permitted us to identify the other compounds present in the BuOH fraction as isovitexin ($r_t = 38.09$), orientin ($r_t = 40.73$) and vitexin ($r_t = 56.59$). The next step was to evaluate the effects of these isolated compounds [isoorientin (1), vicenin-2 (2) and spinosin (3)] on the mouse model of pleurisy induced by carrageenan with regard to leukocytes migration and myeloperoxidase activity. The pretreatment of animals with isoorientin (1) (25 mg/kg) significantly reduced leukocytes by 57 \pm 10% (p < 0.01) (Fig. 4A), neutrophils by 53 \pm 12% (p < 0.01) (Fig. 4B) and mononuclears by 71 \pm 5% (p < 0.05) (Fig. 4C). The compound vicenin-2 (2) (25 mg/kg) also significantly reduced leukocytes by 48 \pm 8% (p < 0.01) (Fig. 4A) and neutrophils by 41 \pm 9% (p < 0.05) (Fig. 4B) and mononuclears by 75 \pm 5% (p < 0.05) (Fig. 4C). The compound spinosin (3) (25 mg/kg) inhibited leukocytes by 39 \pm 8% (p < 0.05) (Fig. 4A) and neutrophils by 38 \pm 9% (p < 0.05) (Fig. 4B). Spi-

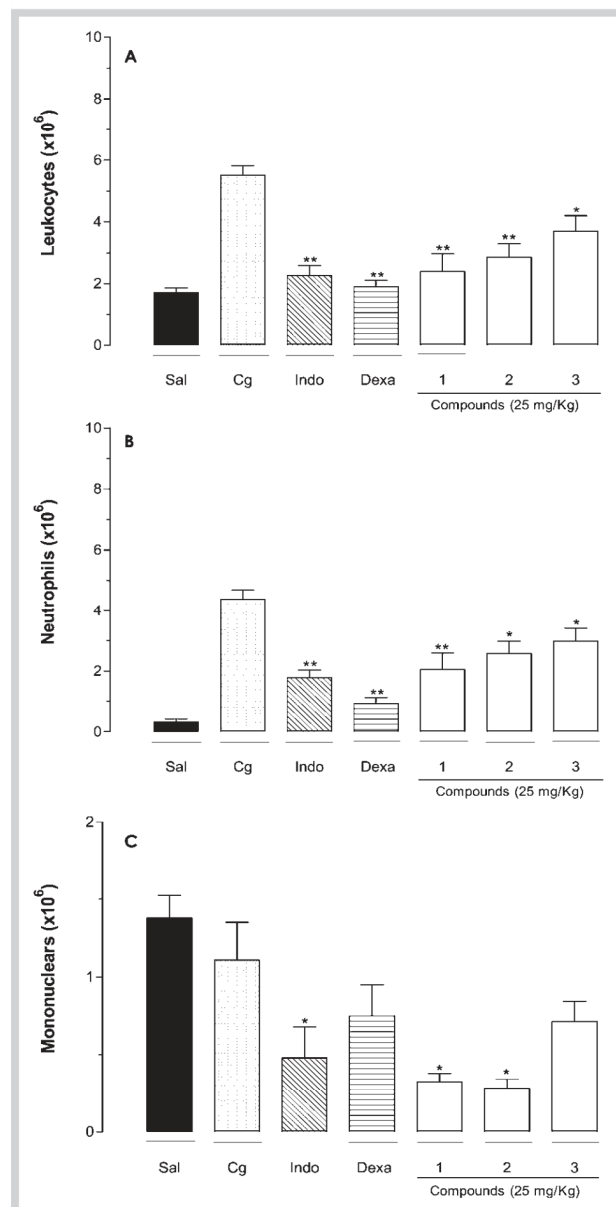


Fig. 4 Effects of compounds **1**, **2** and **3** isolated from *P. edulis* leaves (25 mg/kg, *i.p.*) administered 0.5 h before pleurisy induction by carrageenan, in mice: **A** leukocytes, **B** neutrophils, **C** mononuclears. **1** = isoorientin, **2** = vicenin-2, **3** = spinosin. Sal = animals treated only with sterile saline (0.9% NaCl, *i.pl.*), Cg = animals treated only with carrageenan (1%, *i.pl.*), Indo = animals pretreated with indomethacin (5 mg/kg, *i.p.*), Dexa = animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg, *i.p.*). The bars represent 6 animals and the asterisks the statistical differences. N = 6 animals, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

nosin did not change mononuclears ($p > 0.05$) (● Fig. 4C). All these compounds when evaluated at a dose of 10 mg/kg did not showed activity in the same inflammatory parameters ($p > 0.05$). Indomethacin and dexamethasone used as reference drugs, decreased leukocytes, neutrophils and mononuclears ($p < 0.05$) (● Table 1, Figs. 1 and 4).

Table 2 Effect of BuOH fraction, sub-fraction C and compounds **1**, **2** and **3** of leaves from *P. edulis* upon myeloperoxidase activity on the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

Groups/doses	MPO (mU/mL)
Sal ^a	52.30 ± 10.20
Cg ^a	354.00 ± 26.30
BuOH fraction (100 mg/kg) ^b	140.80 ± 25.72**
Sub-fraction C (50 mg/kg) ^b	147.20 ± 28.20**
Isoorientin (25 mg/kg) ^b	266.60 ± 27.26*
Vicenin-2 (25 mg/kg) ^b	379.20 ± 39.40
Spinosin (25 mg/kg) ^b	352.40 ± 42.75
Indo (5 mg/kg) ^b	120.10 ± 13.78**
Dexa (0.5 mg/kg) ^b	135.80 ± 12.63**

BuOH fraction (100 mg/kg, *i.p.*), sub-fraction C (50 mg/kg, *i.p.*) and isolated compounds: isoorientin (25 mg/kg), vicenin-2 (25 mg/kg) and spinosin (25 mg/kg) from *P. edulis* leaves administered to different groups of animals 0.5 h before pleurisy induced by carrageenan. Sal = responses in animals treated only with sterile saline (0.9% NaCl), Cg = responses in animals treated only with carrageenan (1%), Indo = responses in animals pretreated with indomethacin (5 mg/kg), Dexa = responses in animals pretreated with dexamethasone (0.5 mg/kg). Values of repeated experiments (n = 6) are indicated as the mean and S.E.M. The asterisks indicate the statistical differences * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Student's t-test). N = 6 animals. ^a Administered by the intrapleural route. ^b Administered by the intraperitoneal route

The dose-response profiles showed that the inhibitory effects upon leukocytes migration and neutrophils were higher, respectively, in the groups pretreated with BuOH fraction (100 mg/kg), C sub-fraction (50 mg/kg), or isolated compounds (25 mg/kg) administered 0.5 h before carrageenan.

Additionally, the effects of the fractions and compounds on the myeloperoxidase activity were evaluated using the same doses and times of pretreatment. The BuOH fraction was effective in inhibiting MPO activity by 51 ± 7%, sub-fraction C by 45 ± 8%, and isoorientin by 40 ± 8% ($p < 0.05$) (● Table 2). Indomethacin and dexamethasone also decreased this inflammatory parameter by 66 ± 0% and 62 ± 2%, respectively ($p < 0.01$) (● Table 2). In contrast, vicenin-2 and spinosin were ineffective in promoting any change in this inflammatory parameter ($p > 0.05$) (● Table 2).

Discussion

In previous work, we demonstrated that the crude aqueous lyophilized extract from *P. edulis* leaves administered intraperitoneally exhibited important anti-inflammatory activity in the inflammation model induced by carrageenan. This activity was effective when the animals were pretreated only at 0.5 h before carrageenan injection [9, 10]. Furthermore, this effect was characterized by a significant decrease of leukocytes due to neutrophils, as well as a decrease in myeloperoxidase activity and levels of TNF- α and IL-1 β [9]. This same extract and its derived BuOH and aqueous residual fractions also demonstrated an anti-inflammatory property in another experimental model (air pouch) induced by carrageenan, histamine and substance P [8]. Furthermore, the BuOH fraction showed significant anti-inflammatory effects at a lower dose than the residual aqueous fraction in this model of inflammation [8].

In the present study we also continue to analyze the BuOH fraction that demonstrated better anti-inflammatory action than the other fractions. In the first step different sub-fractions derived from the BuOH fraction were analyzed and sub-fraction C

demonstrated better anti-inflammatory properties than the other fractions. According to TLC and HPLC analyses the main compounds present in the BuOH fraction, isoorientin and vicenin-2, are also the major compounds observed in sub-fraction C. On the other hand, in sub-fraction A (that did not show anti-inflammatory activity) the compound vicenin-2 was not detected and isoorientin was present in traces. In the sub-fraction B, vicenin-2 was not detected either, but isoorientin was present as the major compound. In contrast, in sub-fraction D isoorientin was found in small quantities and vicenin-2 was the major compound. It is important to note that the compounds vicenin-2 and spinosin have already been identified in other species of *Passiflora* genus, but this is the first report for *P. edulis* leaves. Moreover, 6,8-di-C-glycosylchrysin was not previously reported in plants of this genus. Despite the existence of many reports concerning the anti-inflammatory activity of flavonoids in general, there are few reports related to this activity for C-glycosyl flavonoids. Anti-inflammatory activity in the mouse carrageenan-induced paw edema model has been described for isoorientin [17], the major constituent identified in the BuOH fraction. In an *in vitro* study, this compound has also been reported to inhibit thromboxane B₂ synthesis [18]. Studies published in the literature [19] have shown that isovitexin exhibits potent antioxidant activity in macrophage RAW264.7 stimulated with lipopolysaccharide (LPS). These studies also demonstrated that isovitexin suppress iNOS via inhibition of NF-kappa B. Huang et al. in 2005 [20] reported that isovitexin markedly reduced prostaglandin E₂ (PGE₂) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression using the same *in vitro* experiments. For vicenin-2 and spinosin, an important anti-inflammatory effect in the mouse paw edema induced by carrageenan has been reported [21]. Melo et al. [22] have also shown that vitexin causes an important decrease of lung neutrophils influx in mice exposed to LPS.

Another important result observed in this research is that the BuOH fraction, sub-fraction C and isoorientin also induced a significant decrease in myeloperoxidase activity. Myeloperoxidase (MPO), a heme protein that is abundantly expressed in neutrophils, is involved in the regulation of cellular homeostasis and may play a central role in the initiation and propagation of acute and chronic inflammatory disease [23]. In addition, myeloperoxidase is considered to be an important marker of activated neutrophils in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan [14]. In conclusion, the BuOH fraction, the sub-fraction C and the C-glycosylflavonoids (isoorientin, vicenin-2 and spinosin) displayed significant anti-inflammatory effects on the mouse model of pleurisy. The results of our studies demonstrate that C-glycosylflavonoids are, at least in part, the active compounds of *P. edulis* leaves extract.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESC (Grant: 16552/2008–2) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). The authors thank the agronomist Rosilda Helena Feltrin (EPAGRI) for technical support. We are grateful to Dr. Norberto Peoporino Lopes for providing the authentic sample of 6,8-di-C-glycosylchrysin. Thanks are also due to Dr. Jorge Palermo, University of Buenos Aires, Argentina, for NMR spectral measurements.

References

- Sacco JC. Passifloráceas. In: Flora ilustrada catarinense, fasc. PASS. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues; 1980: 132
- Carvalho-Okano RM, Vieira MF. Morfologia externa e taxonomia. In: Bruckner CH, Picanço MC, editors. Maracujá. Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes; 2001: 33–49
- Pio Corrêa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1978: 388–389
- De Paris F, Petry RD, Reginatto FH, Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro JB, Salgueiro JB, Kapczinsk G, Ortega GG, Schenkel EP. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *P. edulis* Sims. Acta Farm Bonaerense 2002; 21: 5–8
- Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrin MD, Lima TCM, Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *P. edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. Phytoter Res 2006; 20: 1067–1073
- Reginatto FH, De-Paris F, Petry RD, Quevedo J, Ortega GG, Gosmann G, Schenkel EP. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. Phytoter Res 2006; 20: 348–351
- Borrelli E, Pinto L, Izzo AA, Mascolo N, Capasso F, Mercati V, Toja E, Autore G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. Phytoter Res 1996; 10: 104–106
- Benincá JP, Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *P. edulis*. Food Chem 2007; 104: 1097–1105
- Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS. Evidence of anti-inflammatory effects of *P. edulis* in an inflammation model. J Ethnopharmacol 2006; 109: 281–288
- Vargas AJ, Geremias DS, Provensi G, Fornari PE, Reginatto FH, Gosmann G, Schenkel EP, Fröde TS. *Passiflora alata* and *P. edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in a mouse model of pleurisy. Fitoterapia 2007; 78: 112–119
- Santos RI, Marlise A, Schenkel EP. Analysis of the plant drug *Wibbrandia ebracteata*. Int J Pharmacognosy 1996; 34: 300–302
- Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. Br J Pharmacol 1996; 118: 811–819
- Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. Inflammation 1993; 17: 723–741
- Fröde TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. Mediators Inflamm 2001; 10: 223–227
- Kumazawa T, Minatogawa T, Matsuba S, Sato S, Onodera J. An effective synthesis of isoorientin: the regioselective synthesis of a 6-C-glycosylflavone. Carbohydr Res 2000; 329: 507–513
- Xie C, Veitch NC, Houghton PJ, Simmonds MSJ. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. Chem Pharm Bull 2003; 10: 1204–1207
- Kuepeli E, Aslan M, Guerbuez I, Yesilada E. Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. J Biosci 2004; 59: 787–790
- Odontuya G, Hoult JR, Houghton PJ. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. Phytoter Res 2005; 19: 782–786
- Lin CM, Huang ST, Liang YC, Lin MS, Shih CM, Chang YC, Chen CT. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. Planta Med 2005; 71: 748–753
- Huang ST, Chen CT, Chieng KT, Huang SH, Chiang BH, Wang LF, Wang LF, Kuo HS, Lin CM. Inhibitory effect of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2 and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. Annals New York Acad Sci 2005; 1042: 387–395
- Ríos JI, Giner RM, Jiménez MJ. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. Fitoterapia 1990; 3: 275–278
- Melo GO, Muzitano MF, Legora-Machado A, Almeida TA, Oliveira DBO, Kaiser CR, Koatz VL, Costa SS. C-glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. Planta Med 2005; 71: 362–363
- Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacol Ther 2006; 111: 16–26

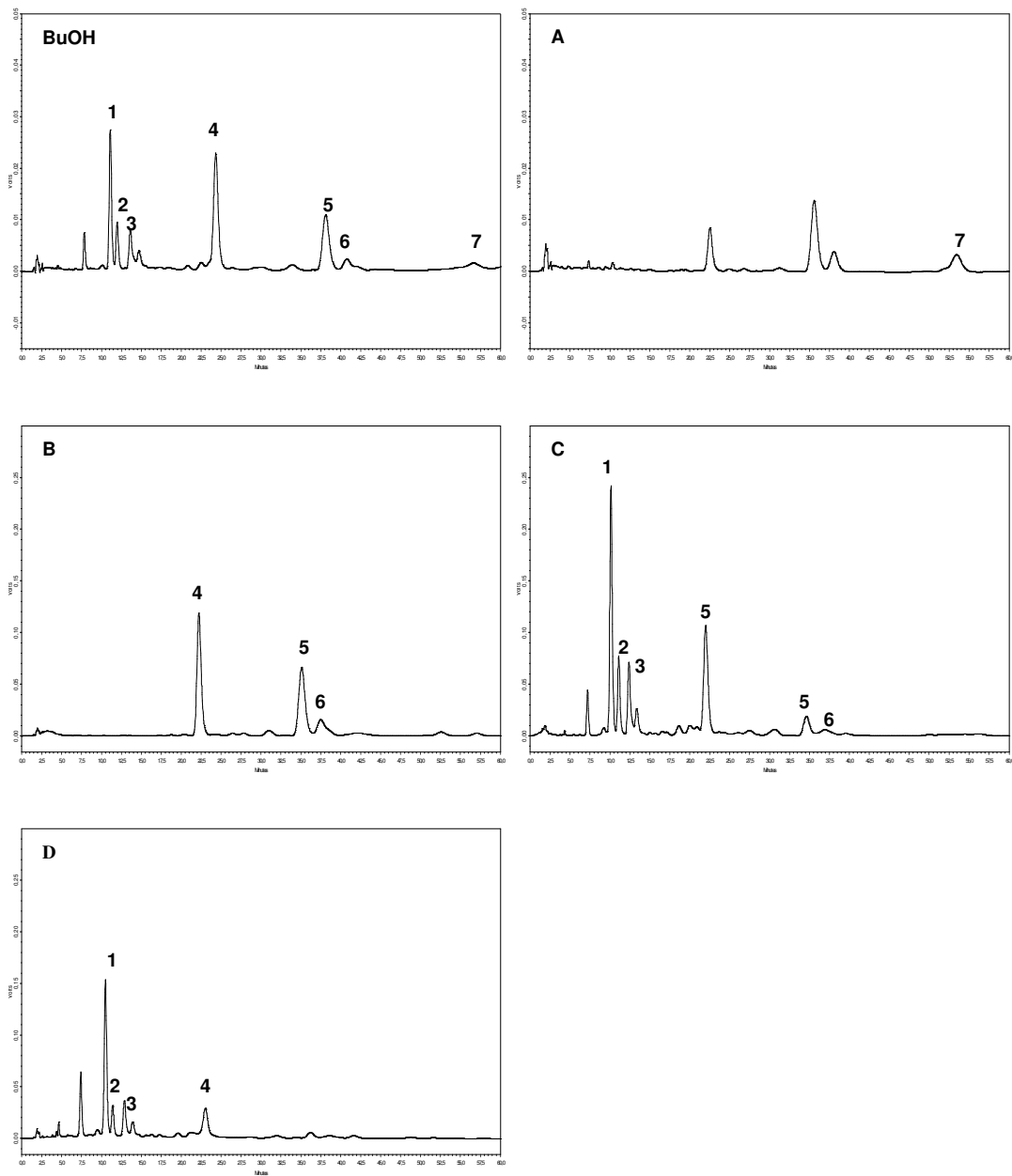


Fig. 2 HPLC chromatograms of BuOH fraction and sub-fraction A, B, C and D from *P. edulis* leaves. Peaks: 1 = vicenin-2, 2 = 6, 8-di-C-glycosylchrysin, 3 = spinosin, 4 = isoorientin, 5 = isovitexin, 6 = orientin, 7 = vitexin. Chromatographic conditions: see experimental protocol.

CAPÍTULO 3: Avaliação da composição química e atividades neurofarmacológicas do extrato aquoso do pericarpo de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais pertencentes ao gênero *Passiflora*, chamadas popularmente de maracujá, têm sido utilizadas na medicina popular principalmente como sedativo e no tratamento e prevenção da irritabilidade, insônia e nervosismo (PIO CORRÊA, 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* (VALE; LEITE, 1983; OGA et al., 1984; SPERONI; MINGUETTI, 1988; MALUF et al., 1991; COLETA et al., 2006; REGINATTO et al., 2006). No entanto, a atribuição da ação ansiolítica e sedativa do gênero *Passiflora* a um grupo de compostos químicos ainda é bastante controversa. Alguns trabalhos têm correlacionado as atividades do tipo-ansiolítica de espécies de *Passiflora* com a presença de flavonóides C-glicosídeos (DE PARIS, 2002; COLETA et al., 2006; SANTOS et al., 2006).

Tendo em vista a ampla utilização da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracujá amarelo) no Brasil, tanto para produção de suco, quanto na forma de chá, ou como componente ativo em preparações farmacêuticas, é importante aprofundar os estudos químicos e farmacológicos da espécie.

Dentro desse contexto, através da cooperação estabelecida entre o Laboratório de Química Farmacêutica, liderado pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e o Laboratório de Neurofarmacologia da Pós-Graduação em Farmacologia, liderado pela Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, deu-se início em 2005, aos estudos das atividades neurofarmacológicas da espécie *P. edulis*, como tema de doutorado da estudante Ligia Moreiras Sena, paralelamente ao estudo da composição química por mim realizado.

Primeiramente foi realizada uma triagem com o extrato aquoso liofilizado das folhas, raízes e do pericarpo dos frutos e com o suco liofilizado de *P. edulis*, utilizando o modelo de hipertermia induzida por estresse, em camundongos, por tratamento via oral. Através deste teste foi possível determinar a melhor faixa de doses e o tempo mais adequado de resposta e observou-se que, o extrato aquoso do pericarpo apresentou uma melhor atividade protetora contra a ocorrência de hipertermia induzida por estresse, quando comparado aos demais extratos. A hipertermia induzida por estresse (HIE) é parte integrante do repertório de respostas individuais dos animais a situações percebidas como estressantes. Em patologias humanas, representa um dos sintomas do distúrbio de ansiedade. O teste da HIE em camundongos é um paradigma desenvolvido há alguns anos para representar a expressão da hiperreatividade autonômica na ansiedade e, atualmente, é considerado um paradigma confiável e reprodutível, com grande sensibilidade tanto a compostos ansiolíticos atualmente disponíveis no mercado, quanto para a identificação de novos compostos com tal ação (BORSINI et al., 1989; VAND DER HEYDEN; ZETHOF; OLIVIER, 1997).

De acordo com os resultados preliminares, deu-se continuidade ao estudo, investigando as possíveis atividades neurofarmacológicas do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis*, por meio de um fracionamento biomonitorado para caracterizar os possíveis compostos envolvidos nessas atividades.

Na figura 11 está representada a estrutura dos frutos de *Passiflora*, exemplificado pelo fruto de *P. edulis* var. *flavicarpa*. O pericarpo, chamado popularmente de casca, é constituído por uma região externa denominada epicarpo, por uma região parenquimática média, o mesocarpo, e por uma região parenquimática interna denominada endocarpo (NACIF, 1991).

Cabe ressaltar que, o pericarpo dos frutos de maracujá representa cerca de 60-70% do peso do fruto e que o Brasil é o maior produtor mundial de suco de maracujá. Neste contexto, encontrar uso para um produto considerado resíduo apresenta importante impacto tanto econômico quanto ambiental (OLIVEIRA et al., 2002).

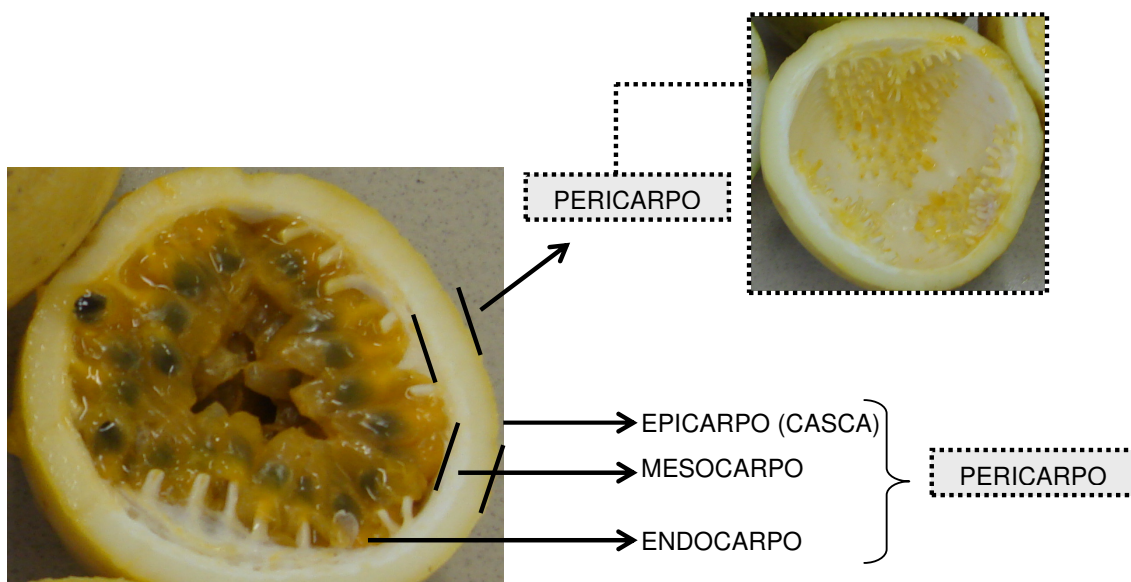


Figura 11: Estrutura do fruto de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*..

A seguir será apresentada uma revisão sobre as atividades farmacológicas e a composição química do pericarpo, com exceção dos trabalhos relacionados aos componentes voláteis, relacionados com o aroma das espécies de *Passiflora*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Atividades farmacológicas relatadas para o pericarpo

Através de uma revisão na literatura, não foi encontrado nenhum estudo sobre a atividade neurofarmacológica do pericarpo de espécies de *Passiflora*, somente relatos de outras propriedades farmacológicas. Abaixo são descritos os

estudos encontrados na literatura sobre atividades biológicas do pericarpo de espécies de *Passiflora*.

Especificamente com a variedade *flavicarpa*, foram encontrados apenas estudos com a farinha da casca e/ou sementes. Em um estudo pré-clínico utilizando farinha da casca de maracujá na alimentação de ratos normais e diabéticos evidenciou uma redução da glicemia após quatro semanas de estudo (JUNQUEIRA et al., 2002). Em outro trabalho pré-clínico, Chau e Huang (2005) observaram uma diminuição dos níveis de triglicerídios, colesterol sérico e hepático com o uso da farinha das sementes de *P. edulis*, em Hamsters. Posteriormente, foi avaliado através de um estudo clínico piloto, a redução dos níveis colesterolêmicos pelo tratamento diário com a farinha da casca (pericarpo) de *P. edulis* em pacientes, com idade entre 30 e 60 anos. Além da eficácia da farinha na redução dos níveis de colesterol total e LDL, um fato interessante observado é que, uma das reações adversas citadas pelos pacientes que utilizaram a farinha da casca foi sonolência (RAMOS et al., 2007).

Adicionalmente, na literatura consultada, foram encontradas dois estudos que avaliaram a atividade anti-hipertensiva do extrato do pericarpo de *P. edulis* var. *edulis* (maracujá-roxo) (ICHIMURA et al., 2006; ZIBALDI et al., 2007).

Ichimura e colaboradores (2006) avaliaram a atividade do extrato metanólico, administrado oralmente, na dose de 10 mg/Kg e 50 mg/Kg, em ratos hipertensos. Os resultados mostraram que a dose de 50 mg/Kg diminuiu significativamente a pressão sanguínea sistólica depois de 1 h e permaneceu por 7 h, com o efeito máximo observado após 1 h. O tratamento com a dose de 10 mg/Kg apresentou uma diminuição da pressão sanguínea após 1 h e somente uma tendência de diminuição da pressão no período de 3 a 7 horas. O composto luteolina, isolado desse extrato,

foi avaliado nas doses de 10 e 50 mg/Kg, por administração oral. Os resultados mostraram que a dose de 50 mg/kg, diminuiu a pressão sanguínea depois de 1 h, efeito que permaneceu por 7 h, mas o efeito máximo foi observado após 1 h. Na dose de 10 mg/kg foi observada somente uma tendência a diminuir a pressão sanguínea após 1 h e permaneceu por 3 h. Também foram identificados neste extrato os compostos isoorientina e ácido γ - amino butírico (GABA). Na discussão do trabalho é apontada como provável o envolvimento do GABA nessa atividade.

No segundo estudo, avaliou-se a atividade anti-hipertensiva do extrato aquoso de *P. edulis* em ensaios com animais e em humanos. O estudo pré-clínico foi conduzido com ratos hipertensos, que receberam além da dieta, uma suplementação com 10 ou 50 mg/Kg do extrato aquoso do pericarpo. Observou-se, que o tratamento com a dieta + extrato (50 mg/Kg), após 8 semanas, diminuiu a pressão sistólica e inibiu 65% dos níveis de óxido nítrico. O estudo clínico foi conduzido com pacientes hipertensos, em um ensaio randomizado, placebo controlado e duplo cego. Os pacientes receberam 400 mg/dia do extrato (cápsulas) e/ou placebo durante 4 semanas. Após o período de tratamento, observou-se uma diminuição da pressão sistólica e diastólica e diminuição dos níveis de óxido nítrico. Ambos resultados obtidos com animais e humanos sugerem um possível envolvimento do óxido nítrico na diminuição da pressão sanguínea. Os compostos majoritários identificados neste extrato foram cianidina 3-O-glicosídeo, quercetina 3-O-glicosídeo e um composto novo designado como ácido edulílico (ZIBALDI et al., 2007). Os autores não ilustram as estruturas do ácido edulílico.

O mesmo grupo de pesquisadores, posteriormente, através de outro ensaio clínico, randomizado e duplo cego, controlado por placebo, avaliaram a melhora dos sintomas clínicos de pacientes asmáticos tratados com extrato aquoso do pericarpo

de *P. edulis* var. *edulis*. O estudo foi conduzido com 43 pacientes asmáticos, durante 4 semanas de tratamento, recebendo 150 mg/dia do extrato (cápsula) ou placebo. Os resultados mostraram que o grupo tratado com o extrato do pericarpo de *P. edulis* melhorou os sintomas clínicos da asma, como, diminuição do chiado no peito e tosse e causou uma melhora em relação à falta de ar. Além disso, os pacientes tiveram um aumento da capacidade vital forçada, mas em relação ao volume expiratório forçado em 1 s não houve melhoras significativas (WATSON et al., 2008).

2.2 Composição química do pericarpo

Em relação à composição química do pericarpo da variedade *flavicarpa*, também não foram encontrados dados disponíveis na literatura. Mareck e colaboradores (1990) relataram a presença de flavonóides C-glicosídeos no suco dos frutos dessa espécie. Nesse trabalho, os autores observaram a predominância da C-glicosilflavona isoorientina em ambos os sucos analisados, *in natura* e industrializado.

Segundos os estudos já citados anteriormente, no pericarpo de *P. edulis* Sims var. *edulis* foi identificado a presença de luteolina, isoorientina, GABA (ICHIMURA et al., 2006), cianidina 3-O-glicosídeo, quercetina 3-O-glicosídeo e ácido edulílico e um novo ácido cíclico glicosilado, como compostos majoritários (ZIBALDI et al., 2007). Como já citato anteriormente, os autores não descrevem as estruturas do ácido edulílico e do ácido cíclico glicosilado. Nesse último trabalho, também foram identificados, em menor quantidade, os compostos catequina, epicatequina, canferol 3-O-glicosídeo, canferol, luteolina-8-C-neohesperosídeo, luteolina-8-C-digitoxosídeo, ácido protocateiquínico, quercetina e prunasina.

O artigo em anexo descreve a avaliação das atividades neurofarmacológicas e o estudo da composição química do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis*. Resultados adicionais são apresentados após o artigo.

PUBLICAÇÃO:

Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids

Ligia Moreiras Sena, Silvana Maria Zucolotto, Flávio Henrique Reginatto, Eloir

Paulo Schenkel, Thereza Christina Monteiro De Lima

Experimental Biology and Medicine , v. 234, p. 967-975, 2009.

Neuropharmacological Activity of the Pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative Involvement of C-Glycosylflavonoids

LIGIA MOREIRAS SENA,* SILVANA MARIA ZUCOLOTTO,† FLÁVIO HENRIQUE REGINATTO,†
ELOIR PAULO SCHENKEL,† AND THEREZA CHRISTINA MONTEIRO DE LIMA*¹

*Department of Pharmacology—Center of Biological Sciences—Federal University of Santa Catarina—Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil; and †Department of Pharmaceutical Sciences—Center of Health Sciences—Federal University of Santa Catarina—Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil

Passiflora edulis has been used in traditional medicine as a sedative and to treat or prevent central disorders such as anxiety and insomnia. In this study, the central effects of the aqueous extract (AE), the butanolic fraction (BF), and the aqueous residual fraction (ARF) obtained from the pericarp of *P. edulis flavicarpa* were investigated in mice and the possible compounds involved in these putative neuropharmacologic effects were determined. AE, BF, and ARF increased the total time spent in the light compartment of the light:dark box, an anxiolytic-like effect, and AE also potentiated the hypnotic effects of ethyl ether, a sedative effect. The thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography analysis indicated the predominance of C-glycosylflavonoids in these extracts and fractions, which were identified as isoorientin, vicianin-2, spinosin, and 6,8-di-C-glycosylchrysin. Exp Biol Med 234:967–975, 2009

Key words: medicinal plants; *Passiflora edulis*; pericarp; neuropharmacology; flavonoids

L.M.S. is recipient of a Ph.D. scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which also provided research grants to E.P.S. and T.C.M.D.L. S.M.Z. is recipient of a Ph.D. scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

¹ To whom correspondence should be addressed at Laboratory of Neuropharmacology, Department of Pharmacology – Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil. E-mail: thereza@farmaco.ufsc.br

Received February 24, 2009.
Accepted April 17, 2009.

DOI: 10.3181/0902-RM-84
1535-3702/09/2348-0967\$15.00
Copyright © 2009 by the Society for Experimental Biology and Medicine

Introduction

Passiflora spp have been used in traditional medicine of several countries as a sedative and to treat or prevent several central disorders such as anxiety, convulsions, and insomnia (1, 2). The genus is considered to be the largest of the Passifloraceae family in a number of described species and comprises about 400–500 plant species, mostly distributed in tropical and subtropical regions of the world (1). Among these, about 150 species are native in Brazil and 60 of them produce fruits that can be consumed as food or employed in juice production (3).

Although the Brazilian Pharmacopoeia (4) considers *Passiflora alata* Curtis as the official species of the *Passiflora* genus, *P. edulis flavicarpa* Degener (*P. edulis*) is the one most frequently employed in juice production by the Brazilian food industry as well as used as a remedy in folk medicine (1, 3, 5). Brazil is considered the top world producer of *P. edulis* fruits and this production is increasing annually (6). In 2003, the production of these fruits was estimated as 450 thousand tons, and some authors claim that 65% of this amount is represented by the pericarp and the seeds, which are discharged as residue or industrial trash (3, 7).

A large number of studies are described in the literature on the neuropharmacologic activities of *P. edulis* (8–11). However, those studies are related to extracts obtained from the leaves or aerial parts, and just a few of them investigated the effects of other parts of this plant. Thus, as far as we are aware, there are no reports on the neuropharmacologic properties of the pericarp of the fruits of *P. edulis*. Actually, there is just one preclinical study that investigated the pharmacologic effects of the yellow part of the pericarp, named rind, although this study did not investigate any neuropharmacologic effect (12).

In spite of the great number of compounds found, the active substances responsible for the anxiolytic activities of *P. edulis* have not been clearly identified. The main compounds reported for this species are flavonoids, mainly derivatives of luteolin and apigenin (13), triterpenes (14), saponins (15), and cyanogenic glycosides (5). It has been suggested that flavonoids may play an important role in the neuropharmacologic effects of *Passiflora* spp, as *P. incarnata* (16), *P. coerulea* (17), and *P. edulis* (10).

Thus, the aim of the present study was to investigate the neuropharmacologic activity of the aqueous extract and its related fractions (*n*-butanolic and aqueous residual) obtained from the pericarp of *P. edulis flavicarpa* in mice and to determine the active constituents possibly involved in its putative neuropharmacologic effect. Animals were evaluated in the light:dark transition (LDT) test for determining the anxiolytic-like activity (18) in the ethyl ether-induced hypnosis to investigate the hypnotic effect (19), and in the pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions to evaluate the putative anticonvulsant activity (20).

Materials and Methods

Plant Material. Mature fruits of *P. edulis* were collected in Antonio Carlos, State of Santa Catarina, Brazil, in January 2006. This material was identified by Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg (Department of Botany, UFSC) and the voucher specimen was deposited under the number FLOR 33886.

Extraction and Fractionation. Fruits of *P. edulis* were harvested at the stage of maturation. The pulp (edible part) was removed and the fresh pericarp was extracted by infusion (90°C; plant:solvent, 1:2, w/v) for 10 mins. Thereafter, the aqueous extract was filtered and separated into two parts. One part was freeze-dried, to obtain the aqueous lyophilized extract (AE). The second part was partitioned with *n*-BuOH (3 × 300 ml), yielding the butanolic fraction (BF) and aqueous residual fraction (ARF). These fractions were evaporated to dryness under reduced pressure or freeze-dried.

Analytical Procedures. The chemical composition of extracts and their derived fractions of pericarp from *P. edulis* were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography/diode array detection (HPLC/DAD). For TLC analysis, the following conditions were used: aluminum sheets coated with silica gel F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany), as adsorbent; EtOAc:CH₂O₂:H₂O (80:10:10, v/v/v) and EtOAc:acetic acid:H₂O (60:20:10:10, v/v/v/v) as the mobile phase, and the methanol solution of diphenylboryloxyethylamine (1%) (NP Reagent A) (Sigma, Brazil) was used as the color reagent. The spots were observed under short- and long-wave UV light. The HPLC analysis was performed on a PerkinElmer (Series 200 HPLC system with EP/DAD; Waltham, MA, USA). For HPLC analysis, the extract and its related fractions were analyzed on a Vertical RP C18

(250 mm × 4.6 mm) (5 μm) column. The mobile phase consisted of solvent A [THF:isopropanol:ACN (10:2:3, v/v/v)] and solvent B (0.5% phosphoric acid). The separation was achieved using isocratic elution (60 mins, 12% A in B) with a flow rate of 1.0 ml/min and UV detection (340 nm). The compounds were identified by comparing the retention time (*rt*) with reference standards, their UV spectra, and by co-injection of standards by adding them to the extracts. For the TLC and HPLC analyses, the following authentic samples were used: isoorientin (Extrasynthèse, France), orientin (Extrasynthèse), isovitexin (Fluka, Switzerland), vitexin (Fluka), vicenin-2, 6,8-di-*C*-glycosylchrysin, and spinosin. The compound vicenin-2 was isolated from *P. edulis flavicarpa* leaves and spinosin was obtained from *Wilbrandia ebracteata* roots and these were identified by spectral data (NMR and UV); 6,8-di-*C*-glycosylchrysin was isolated from *Lichnophora ericoides* leaves and was provided by Dr. Norberto Peoporine Lopes (Department of Pharmacy, University of São Paulo, Ribeirão Preto). The solvents used for HPLC analysis were purchased from Tedia (HPLC grade; Fairfield, OH, USA). All other reagents used were of analytical grade and were purchased from Nuclear (Diadema, Brazil).

Animals. Adult male Swiss mice (age 3 months; weight 35–50 g) were used. Animals were housed in groups of 20 per cage, under standard conditions (12-hr light:dark cycle; lights on 0700 hrs; constant room temperature of 22 ± 2°C) for at least 1 week prior to the behavioral experiments, with food and water *ad libitum*, except during the experiments. Each animal was used just once. All experiments were conducted in accordance with the international standards of animal welfare recommended by the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (Act 1992) and the experimental protocols were approved by the institutional Committee for Animal Care in Research (#23080.080072244/2006-70/CEUA/UFSC). The minimum number of animals and the duration of observation required to obtain consistent data were used.

Drugs. In the behavioral experiments, ethyl ether (F. Maia Ind. & Com. Ltda., Cotia, SP, Brazil) and pentylenetetrazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were used. For anxiolytic-like, hypno-sedative, and anticonvulsant activities, diazepam (DZP; Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) was used as reference drug (positive control). Drugs and preparations, including the aqueous extract (AE), the butanolic fraction (BF), and the aqueous residual fraction (ARF) were dissolved in saline (0.9% NaCl) immediately before the treatment by the oral (po) route (volume of 0.1 ml/10 g). The plant extracts and fractions were freshly dissolved before each pharmacologic test.

Treatments. Animals were treated by the po route through an intragastric cannula, with AE, BF, or ARF, in a constant volume of 0.1 ml/10 g. AE was tested at doses of 100 or 300 mg/kg in the LDT, the ethyl ether-induced hypnosis, and the PTZ-induced convulsions tests, whereas BF and ARF were tested at doses of 25, 50, and 100 mg/kg

only in the LDT test in order to bioguide their possible effects on experimental anxiety. Control animals were treated by the same route with equal volumes of vehicle. DZP, used as a positive control drug, was administered po at doses of 2.5 mg/kg in the LDT test, 1 mg/kg in the ethyl ether-induced hypnosis test, and 3 mg/kg in the PTZ-induced convulsions test, according to previous experiments of standardization. Mice were individually tested 1 hr after the treatment with AE, BF, or ARF, or 30 mins after the treatment with DZP.

Pharmacologic Tests. LDT and Open Field Tests. The LDT has been widely validated to measure anxiety in rodents (18). The apparatus consisted of a box made of Plexiglas with overall dimensions of 45 cm × 27 cm × 27 cm (length, width, height). The box was divided into two compartments by a barrier with a doorway (7 cm × 7 cm) through which mice could cross from one chamber (15 cm × 27 cm × 27 cm), black and not illuminated, to the other chamber, white and brightly illuminated with a 400-lux light source. Mice were individually placed in the middle of the white compartment facing the doorway. After the first transition to the dark compartment, the behavior of the animals was registered during a 5-min period for measuring two parameters: total time spent in the lighted compartment and total number of transitions between the two compartments. Drugs with anxiolytic activity usually increase the time spent in the light compartment of the box and/or the number of transitions between the compartments.

Immediately after being tested in the LDT, the animals were individually placed into the center of the open field for the evaluation of their motor activity in order to avoid false-positive results. The total number of squares crossed by the animal and the number of rearing behaviors were measured during a 5-min test.

Ethyl Ether-Induced Hypnosis. The ethyl ether-induced sleep was employed in order to evaluate the potentiation of hypnosis and the putative hypno-sedative activity of the extract (19). Animals were placed in an ethyl ether-saturated glass cage (5 ml, 5 mins of saturation, glass cage 30 cm × 20 cm) 1 hr after the treatments. Latency and duration of hypnosis were recorded (in seconds) using a stopwatch. Hypnosis time was measured by the loss of the righting reflex, with the recovery of this reflex considered as the hypnosis endpoint.

PTZ-Induced Convulsions. Mice were intraperitoneally (ip) treated with PTZ (80 mg/kg), 1 hr after the treatments with the extract or vehicle, to induce generalized clonic-tonic convulsions (20). Immediately after the PTZ treatment, animals were placed into individual plastic cages to register the following parameters for 30 mins: the latency (in seconds) of the first convulsive episode as well as its duration, and the severity of convulsions, using a predetermined scale (grade 0 = no response; grade 1 = myoclonic body jerks; grade 2 = generalized clonic convulsion; grade 3 = generalized clonic jerks with loss of righting reflex; grade

4 = generalized convulsion with tonic hind-limb extension without death; grade 5 = generalized convulsion with tonic extension followed by death).

Statistical Analysis. Results are expressed as mean ± SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, except for the severity of convulsions parameter, which is presented as median ± interquartile range and analyzed by the Kruskal-Wallis test. Data obtained for the positive control groups were analyzed by Student's *t* test or by Mann-Whitney *U* test (severity of convulsions). All statistical analysis was carried out using Statistica version 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Differences between treated and control groups were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

Results

Chromatographic Analysis and Chemical Characterization. The chromatographic analysis by TLC and HPLC of AE from *P. edulis* pericarp pointed to a complex mixture of compounds with a characteristic profile of flavonoid glycosides, considering the retention factor (RF) values and fluorescence under UV light (360 nm) before and after spraying the Natural Reagent A (NPA-reagent). The HPLC analysis using DAD confirmed the predominance of compounds within the flavone skeleton, based on the characteristic UV absorption spectra of all detected substances, and allowed the identification of four major compounds (Fig. 1A). The HPLC analysis showed peak 4 as the major compound, with retention time of 32.29 mins and typical UV absorption of luteolin derivatives. After comparison of their *rt*, UV spectra, and co-injection with authentic samples, peak 4 was identified as isoorientin. Peaks 1 and 3 showed the typical UV absorption of apigenin derivatives and were identified as di-C-glycosyl flavone, vicenin-2 (*rt* = 14.47), and spinosin (*rt* = 18.45), respectively. On the other hand, peak 2 displayed the UV absorption maxima similar to the chrysin derivatives, allowing the identification as 6,8-di-C-glycosylchrysin (*rt* = 15.52) by co-injection with an authentic sample. According to these results, the AE (Fig. 1A) and BF (Fig. 1C) showed similar chromatographic profiles and the same main compounds. On the other hand, in the chromatographic profile of ARF, only one main component (peak 4) was observed (Fig. 1B) that could be identified as isoorientin.

Pharmacologic Tests. LDT and Open Field Tests. Figure 2 shows that the treatment with AE and BF, obtained from the pericarp of *P. edulis*, significantly increased the total time spent in the light compartment of the light:dark box, in all tested doses [AE: $F(2,19) = 9.18$; BF: $F(3,27) = 8.24$, $P \leq 0.01$], when compared to the control group, similar to the effects observed with DZP treatment (2.5 mg/kg, po). On the other hand, ARF significantly increased the total time spent in the light compartment only at the dose of 25 mg/kg [$F(3,26) = 2.59$, $P \leq 0.05$], as

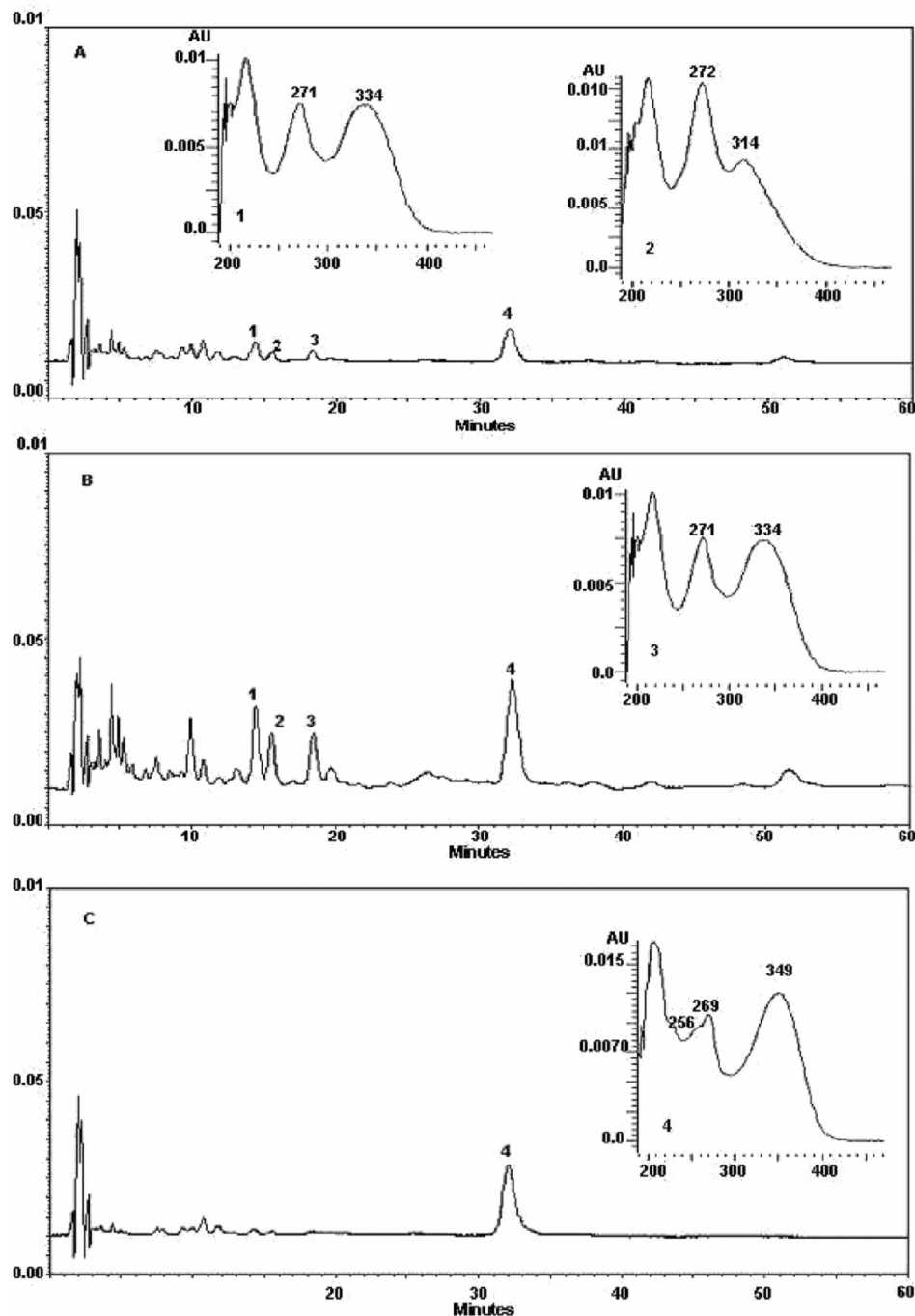


Figure 1. Chromatographic profile of A, B, and C from *P. edulis* pericarp. 1 = vicenin-2; 2 = 6,8-di-*C*-glycosylchrysin; 3 = spinosin; 4 = isoorientin. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

shown in Figure 2F. Only BF increased the number of transitions between the two compartments in all tested doses [$F(3,27) = 7.54$, $P \leq 0.01$], showing behavioral changes similar to those promoted by DZP.

The po treatment with different doses of AE (100 and 300 mg/kg), BF, and ARF (25, 50, and 100 mg/kg) did not promote any significant effects on the parameters evaluated at the open field, such as crossings and rearings (Table 1).

Ethyl Ether-Induced Hypnosis. As shown in Figure

3, the po treatment with AE significantly potentiated the hypnotic effects of ethyl ether at both tested doses (100 and 300 mg/kg), as reflected by the reduction of sleep latency [$F(2,17) = 9.54$, $P \leq 0.01$; $t(11) = 2.21$, $P \leq 0.05$] and by the increase of hypnosis duration [$F(2,17) = 4.65$; $P < 0.05$; $t(11) = -3.05$; $P < 0.05$], a sedative effect similar to that produced by DZP.

PTZ-Induced Convulsions. As shown in Table 2, the po treatment with AE (100 and 300 mg/kg) did not alter the

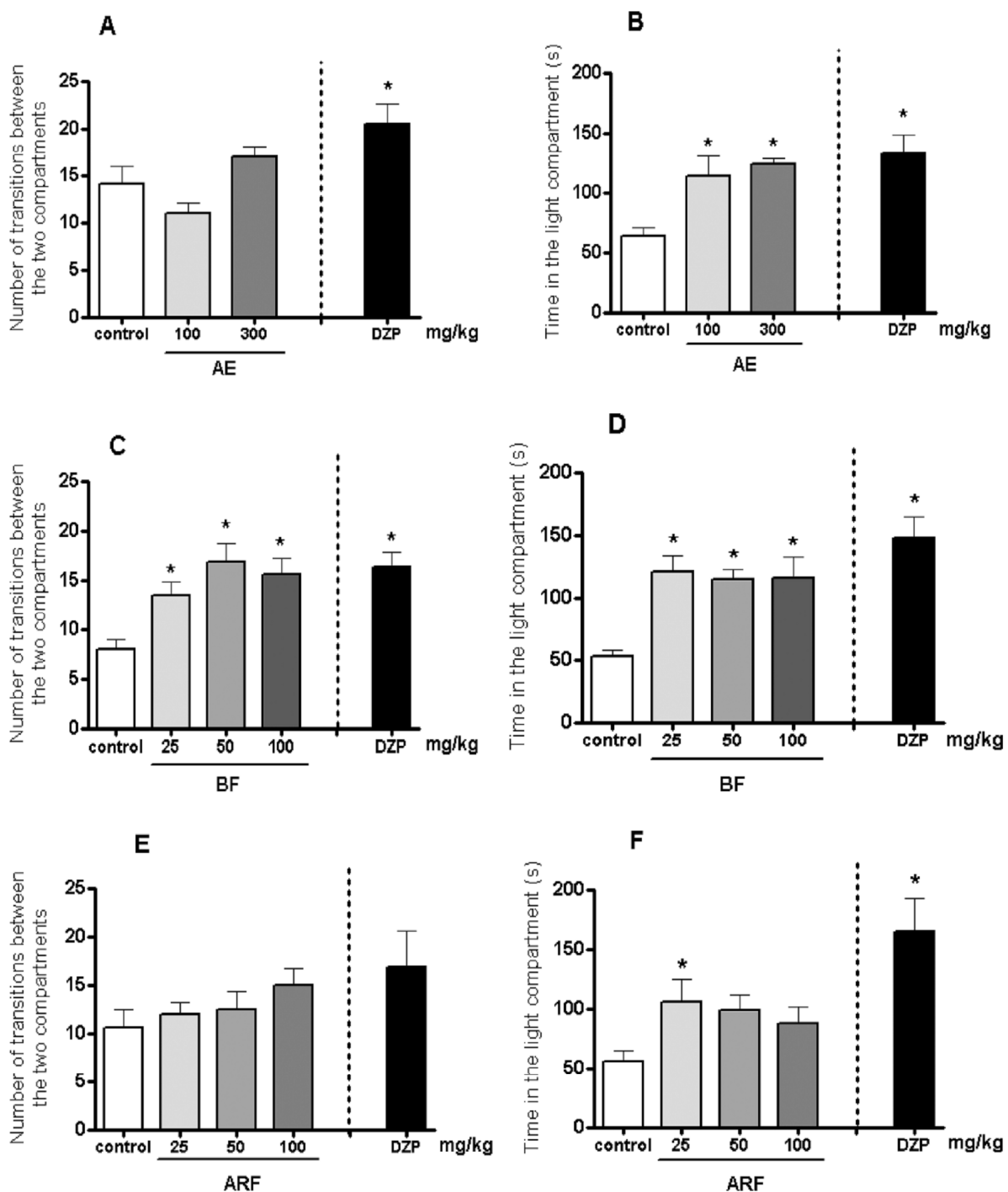


Figure 2. Effects of the AE, BF, or ARF obtained from the pericarp of *P. edulis flavicarpa* on the behavior of mice evaluated in the LDT test, recorded for 5 mins, 1 hr after oral treatment. DZP, 2.5 mg/kg po, was used as the standard anxiolytic drug. The number of transitions between the two compartments of the light:dark box (panels: A, C, and E) and total time spent in the light compartment (panels: B, D, and F) are presented. Results expressed as mean \pm SEM of 7–10 mice. Comparisons were made by one-way ANOVA followed by *post hoc* Dunnett's test or Student's *t* test (DZP group \times control). * $P \leq 0.05$ compared to control group.

latency, duration, or severity of the convulsive episodes induced by PTZ [latency: $F(2,20) = 1.12$; duration: $F(2,20) = 1.2$; severity: $H_{23}(2) = 4.1$, $P > 0.05$]. DZP, as expected, significantly increased the latency and reduced the severity of PTZ-induced convulsions.

Discussion

Plant species from the genus *Passiflora* have been traditionally used in popular medicine of several countries as anxiolytics and sedatives and in the treatment or

Table 1. Effects of the Oral Treatment with AE, BF, or ARF Obtained from the Pericarp of *P. edulis flavicarpa* on Behavioral Parameters Evaluated in the Open Field Test

Treatments (po)	Dose (mg/kg)	Open Field ^a		n
		Rearings	Crossings	
Control	—	38.1 ± 2.6	99.8 ± 7.3	8
AE	100	28.3 ± 4.0	78.3 ± 10.1	7
AE	300	30.6 ± 3.2	91.7 ± 10.3	7
DZP	2.5	24.7 ± 3.9	92.3 ± 12.6	7
Control	—	22.7 ± 2.3	86.1 ± 10.8	7
BF	25	28.9 ± 4.1	115.5 ± 11.4	8
BF	50	33.1 ± 1.8	139.5 ± 21.3	8
BF	100	28.9 ± 4.8	113.6 ± 13.6	7
DZP	2.5	16.9 ± 6.2	85.9 ± 25.9	7
Control	—	24.6 ± 4.6	104.6 ± 18.1	8
ARF	25	31.5 ± 4.9	124.9 ± 15.8	8
ARF	50	27.6 ± 4.5	114.7 ± 18.0	7
ARF	100	33.3 ± 3.9	125.6 ± 17.0	7
DZP	2.5	10.5 ± 6.3	83.7 ± 23.9	6

^a Each value represents the mean ± SEM for 6–8 animals (*n* = number of animals). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's or Student's *t* tests (control × DZP).

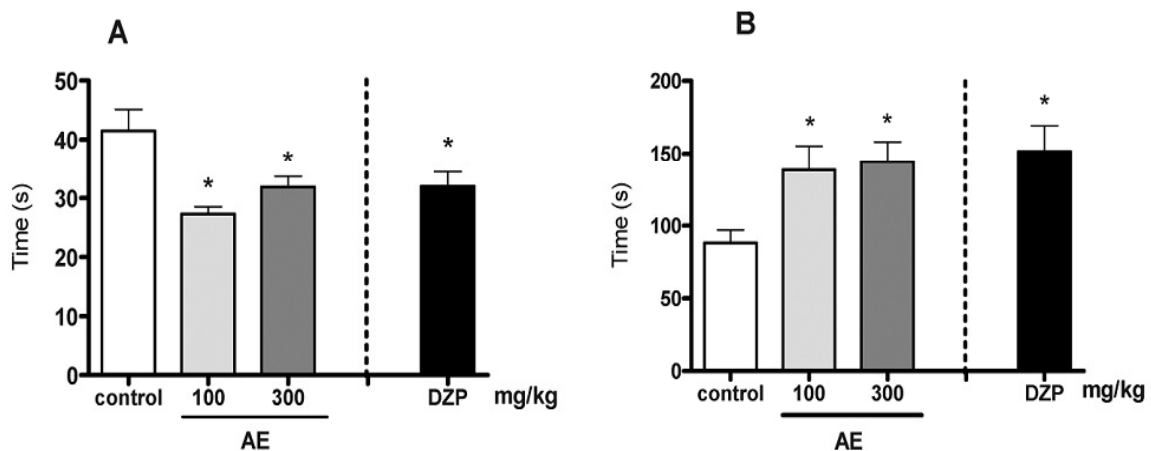


Figure 3. Effects of the AE obtained from the pericarp of *P. edulis flavicarpa* on sleeping time induced by ethyl ether 1 hr after the po treatment. DZP, 1 mg/kg po, was used as the standard drug. Latency (A) and duration (B) of hypnosis are presented. Results expressed as mean ± SEM of 6–7 mice. Comparisons were made by using a one-way ANOVA followed by *post hoc* Dunnett's test or by Student's *t* test (DZP group × control). * *P* ≤ 0.05 compared with control group.

Table 2. Effects of the Oral Treatment with the AE Obtained from the Pericarp of *P. edulis flavicarpa* on Convulsions Induced by PTZ (80 mg/kg ip)

Treatment (po)	Dose (mg/kg)	PTZ-Induced Convulsion ^a			n
		Latency (s)	Duration (s)	Severity	
Control	—	68.6 ± 6.8	17.3 ± 1.8	25.0 (20.0–62.0)	7
AE	100	138.9 ± 48.1	19.6 ± 1.7	28.5 (24.0–44.5)	8
AE	300	96.5 ± 25.7	20.9 ± 1.4	20.5 (13.0–39.0)	8
DZP	3.0	994.8 ± 305.3*	12.1 ± 4.8	14.0 (9.0–15.0)*	8

^a Values of latency and duration are presented as mean ± SEM; the values of severity are represented by the median ± interquartile range (*n* = number of animals). Data of latency and duration were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test or by Student's *t* test (control × DZP); data of severity were analyzed by Kruskal-Wallis test or by Mann-Whitney *U* test (control × DZP). * *P* < 0.05.

prevention of irritability, insomnia, and nervousness (1, 2). While most of the studies with *Passiflora* spp are related to *P. incarnata* (21), there have been few and insufficient pharmacologic studies performed with *P. edulis*, in spite of the widespread use of this plant in popular medicine. Among these studies, almost all investigated the neuropharmacologic effects of the leaves and/or aerial parts of this species, and its anxiolytic-like, sedative, and hypnotic activities in experimental animals have been widely reported (8, 10, 11). Otherwise, there are few studies investigating the pharmacologic activities or phytochemical profiles of other parts of the plant (fruits, roots, pulp, pericarp) (22). Only two studies on the pharmacologic effects of the pericarp of *P. edulis* are available in the literature. The first one reports antihypertensive activity after treatment with the extract of the *P. edulis* pericarp in spontaneously hypertensive rats (12). The second one investigated the effects of the flour obtained from the pericarp of *P. edulis* in hypercholesterolemic patients (23). In this latter study, the authors observed that, after repeated treatment, there was a significant reduction in cholesterol levels in these patients when compared to the control group. However, some adverse effects were reported, including the occurrence of somnolence. In light of this unexpected effect, the authors suggested that further studies should be performed in order to verify the presence of compounds with sedative activity in the pericarp of *P. edulis*, since compounds with this profile have been identified in other species of this genus (16, 17) and in other parts of this plant, such as leaves (10).

In the present study, we reported the neuropharmacologic effects of the pericarp of *P. edulis* (AE, BF, and ARF) in mice, employing different validated animal models. These actions were compared to the effects produced by DZP, a standard benzodiazepine commonly used as an anxiolytic in clinics.

The anxiolytic-like activity of AE, BF, and ARF was investigated using the LDT test, an experimental paradigm based on the innate aversion of rodents to highly illuminated places and on the spontaneous exploratory behavior of the animals (18). AE, BF, and ARF increased the total time spent in the light compartment of the box, but only BF changed the number of transitions between the compartments in a way similar to that of DZP. Although some authors suggest that the increase in the number of transitions between the compartments can be related to a stimulatory activity (24), the extract and the fractions did not alter the parameters observed in the open field test (crossing and rearing), suggesting that the effects promoted by BF might be more related to an anxiolytic-like effect than to a stimulant activity. In fact, some authors have reported that anxiolytic drugs may increase the number of transitions between the areas in different models, such as the elevated plus-maze (25) or the LDT (18). Thus, the effects promoted by treatment with AE, BF, and ARF indicate a relatively selective profile of action (anxiolytic-like effect), since increases of activity in the light compartment of the LDT

box have been suggested as an index of anxiolytic action (18).

Our data also show that the po treatment with AE potentiated the hypnotic effects of ethyl ether, reflected by a reduction of sleep latency and an increase of hypnosis duration, a sedative effect similar to that produced by DZP. Usually, the test most widely employed to evaluate the putative hypno-sedative properties of compounds with unknown central effects is the barbiturate-induced sleep, using agents such as sodium pentobarbital. However, these compounds can promote pharmacokinetic changes due to interaction with the cytochrome P450 complex, an activity that can promote an enhancement of the central depressant effect of the barbiturates and, consequently, produce false-positive results to compounds devoid of this profile (19). Thus, ethyl ether-induced sleep was used in order to detect the hypno-sedative activity of AE and to bio-guide the additional behavioral tests, since ethyl ether is not metabolized in the liver. The sedative and hypnotic effects observed in this study are consistent with those demonstrated in previous studies, indicating a hypno-sedative activity of the extracts obtained from the leaves of *P. edulis* (8, 9).

The PTZ-induced convulsions test is considered the main experimental acute test for preliminary assessment of drugs with potential anticonvulsant properties (20). Compounds that increase the latency, decrease the duration and lethality, or prevent the occurrence of PTZ-induced seizures are positively correlated to drugs therapeutically used in the treatment of *absence crisis* in humans. Some authors proposed that this test is also effective for assessing the anxiolytic-like activity of benzodiazepine compounds, since PTZ is believed to exert its action by antagonizing the aminobutyric acid (GABA)_A-receptor complex (26). In the present study, treatment with AE was not effective in preventing the occurrence of PTZ-induced seizures, since it did not alter the parameters registered. This result suggests that the neuropharmacologic activity of the pericarp of *P. edulis* might not be specifically related to the interaction with benzodiazepine binding site, since this test is considered efficient in the assessment of compounds with this profile of action (26). A lack of anticonvulsant activity was also observed with the extracts obtained from leaves of *P. edulis* (8, 9).

So far, no data are available in the literature about the phytochemical composition of the pericarp of *P. edulis*. Mareck and coworkers (13) reported the presence of C-glycosylflavonoids in fresh juice obtained from the fruits of this species, as well as in industrialized juice. These authors also reported the prevalence of isoorientin as the major compound in both juices analyzed in their study.

In the present study, the phytochemical investigation of the AE, BF, and ARF of *P. edulis* pericarp, by TLC and HPLC analysis, showed the predominance of C-glycosylflavonoids in the extracts and fractions. The four major compounds observed in AE—(1) vicenin-2; (2) 6,8-di-C-

glycosylchrysin; (3) spinosin; and (4) isoorientin—were also observed in higher quantities in BF. It is noteworthy that in ARF only one major C-glycosylflavonoid (isoorientin) was observed. Although there is no consensus on the compounds that are putatively involved in the neuropharmacologic activity of *P. edulis*, some authors suggest that C-glycosylflavonoids may be involved in this profile of action. De-Paris and coworkers (27) showed a positive correlation between the level of flavonoids (determined as vitexin, isovitexin, orientin, and isoorientin) and the psychopharmacologic activity of the leaves of *P. edulis*. Furthermore, some authors suggest that orientin and isoorientin might be responsible for the anxiolytic-like effect of the BF of *Cecropia glazioui* (28).

Wang and coworkers (29) showed that spinosin, the major constituent of semen *Ziziphi spinosae*, significantly and dose-dependently increased the duration of hypnosis and reduced the sleep latency in mice. The authors proposed that these effects were mediated via the serotonergic system, since pretreatment with p-chlorophenylalanine, an inhibitor of tryptophan hydroxylase, significantly decreased the pentobarbital-induced sleep time and spinosin significantly reversed this effect.

Our pharmacologic results suggest that the neuropharmacologic activity of the pericarp of *P. edulis* might not be specifically, or entirely, related to the interaction with the benzodiazepine binding site, since treatment with AE was not effective in preventing the occurrence of PTZ-induced seizures. In addition, the phytochemical investigation showed the presence of C-glycosylflavonoids in the extracts and fractions obtained from the pericarp of *P. edulis*, including spinosin. Thus, the putative involvement of the serotonergic system in the neuropharmacologic effects observed in the present study can be considered and our research group is developing additional studies in order to investigate this hypothesis, as well as the GABAergic modulation of such effects.

The presence of C-glycosylflavonoids was previously reported in leaves as well as in aerial parts of *Passiflora* spp, but this is the first report, to the best of our knowledge, on the occurrence of these compounds in the pericarp of *P. edulis flavicarpa*. Ichimura and coworkers (12) described the presence of luteolin, isoorientin, and GABA in the pericarp of *P. edulis*; however, they did not specify which variety of *P. edulis* was employed in the analysis. The fact that these authors obtained a purple powder from the extract suggests that the species under investigation was *P. edulis* Sims, named purple passion fruit, and not *P. edulis flavicarpa*. Some authors also reported the presence of C-glycosylflavonoids in the juice obtained from the fruits of *P. edulis* (13). These authors identified isoorientin as the major compound, followed by orientin, isovitexin, luteolin-6-C-chinovoside, luteolin-6-C-fucoside, and a mixture of schaftoside and isoschaftoside.

To the best of our knowledge, this is also the first scientific report on the neuropharmacologic activity of the

pericarp of *P. edulis*. Taken together, our results indicate that this neurobiologic activity is mainly an anxiolytic-like and a hypno-sedative effect. Since BF showed a more pronounced anxiolytic-like activity in lower doses than the activity of AE, it is feasible to assert that the fractioning process was efficient in concentrating the putative compounds involved in the neurobiological activity of *P. edulis flavicarpa*. In the same direction, the chromatographic analysis of both preparations showed that BF has higher isoorientin, vicenin-2, spinosin, and 6,8-di-C-glycosylchrysin contents than AE and ARF.

In conclusion, the results of the present study provide strong evidence that the extracts from pericarp fruits of *P. edulis* possess anxiolytic-like and sedative properties, but not anticonvulsant activity, in mice—effects that are not accompanied by motor impairment. Considering the need for additional studies to confirm these results, the neuropharmacologic effects of the C-glycosyl flavonoids identified and isolated from the pericarp of *P. edulis* are under investigation, as well as the putative mechanisms of action involved in these neurobiologic activities.

We are grateful to Dr. Filipe Silveira Duarte for the helpful comments during the development of this work and to the agronomist Rosilda Helena Feltrin (EPAGRI) for technical support.

1. Pio Correa M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978.
2. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2008.
3. Córdova KRV, Gama TMMTB, Winter CMG, Kaskantzis-Neto G, De Freitas RJS. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. *B CEPPA* 23(2):221–230, 2005.
4. Brazilian Pharmacopoeia. (3rd ed.). São Paulo: Andrei, pp839–840, 1977.
5. Spencer KC, Seigler DS. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *J Agric Food Chem* 31:794–796, 1983.
6. Cavichioli JC, Ruggiero C, Volpe CA, Paulo EM, Fagundes JL, Kasai FS. Florescimento e frutificação do maracujazeiro-amarelo submetido à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira Fruticultura* 28:92–96, 2006.
7. Reis J, Paiva PCA, Von Tiesenhausen IMEV, Rezende CAP. Composição química, consumo voluntário e digestibilidade de silagens de resíduos do fruto de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) e de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) CV. Cameroon e suas combinações. *Cienc Agrotec* 24:213–224, 2000.
8. Vale NB, Leite JR. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciencia e Cultura* 35:11–24, 1983.
9. Maluf E, Barros HMT, Frochtengarten ML, Benti R, Leite JR. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytother Res* 5:262–266, 1981.
10. Coleta M, Batista MT, Campos MG, Carvalho R, Cotrim MD, De Lima TCM, Cunha AP. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytother Res* 20:1067–1073, 2006.
11. Reginatto FH, De-Paris F, Petry RD, Quevedo J, Ortega GO, Gosmann G, Schenkel EP. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried

- powders of two species of two South Brazilian *Passiflora* species. *Phytother Res* 20:348–351, 2006.
12. 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. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:718–721, 2006.
 13. Mareck U, Galensa R, Herrmann K. Identification of passionfruit juice in fruit products by HPLC. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 191:269–274, 1990.
 14. Zucolotto SM, Palermo JA, Schenkel EP. Estudo fitoquímico das raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 25:5–9, 2006.
 15. Yoshikawa K, Katsuta S, Mizumori J, Arihara S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *J Nat Prod* 63:1229–1234, 2000.
 16. Zanolli P, Avallone R, Baraldi M. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* 71:S117–S123, 2000.
 17. Wolfman C, Viola H, Paladini A, Dajas F, Medina JH. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacol Biochem Behav* 47:1–4, 1994.
 18. Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13:167–170, 1980.
 19. Duarte FS, Duzzioni M, Mendes BG, Pizzolatti MG, De Lima TCM. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. *Pharmacol Biochem Behav* 86:150–161, 2007.
 20. Swinyard EA, Brown WC, Goodman LS. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 106:319–330, 1952.
 21. Soulimani R, Younos C, Jamouni S, Bousta D, Misslin R, Mortier F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J Ethnopharm* 57: 11–20, 1997.
 22. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis*. *Fitoterapia* 72:698–702, 2001.
 23. Ramos AT, Cunha MAL, Sabaa-Srur AUO, Pires VCF, Cardoso MAA, Diniz MFM, Medeiros CCM. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. *Revista Brasileira Farmacognosia* 17:592–597, 2007.
 24. Sena LM, Bueno C, Pobbe RLH, Andrade TGCS, Zangrossi H Jr, Viana MB. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res* 142:125–133, 2003.
 25. Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106:102–110, 1992.
 26. Tallman JF, Gallager DW, Mallorga P, Thomas JW, Stritmatter W, Hirata F, Axelrod J. Studies on benzodiazepine receptors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 198:277–283, 1980.
 27. De-Paris F, Petry RD, Reginatto F, Gosmann G, Quevedo J, Salgueiro JB, Kapczinski F, González Ortega G, Schenkel EP. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 21:5–8, 2002.
 28. Rocha FF, Lapa AJ, De Lima TCM. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 71:183–190, 2002.
 29. Wang L, Bai Y, Shi X, Cui X, Cui S, Zhang F, Zangh Q, Zhao Y, Zhang Y. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen *Ziziphi spinosae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 90:399–403, 2008.

3. CONTINUIDADE DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO

Em continuidade ao estudo anterior (artigo anexado), optou-se por investigar a atividade ansiolítica e sedativa da C-glicosilflavona isoorientina, composto majoritário identificado no extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* var. *flavicarpa* e de uma sub-fração do pericarpo sem a presença de isoorientina. Os estudos de avaliação da atividade ansiolítica e sedativa do composto isoorientina na forma isolada e da sub-fração do pericarpo sem isoorientina já foram realizados. O processo de isolamento desses componentes é descrito a seguir.

3.1 Processo de fracionamento

3.1.1 Processo de fracionamento para obtenção de isoorientina

A C-glicosilflavona isoorientina foi obtida das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, conforme consta em materiais e métodos do artigo anexado no capítulo 1 (ZUCOLOTTO et al., 2009).

3.1.2 Processo de fracionamento para obtenção da sub-fração do pericarpo sem isoorientina

A fração butanólica (800 mg) do pericarpo de *P. edulis* (ver modo de preparação em artigo anexado neste capítulo) foi submetida à coluna tipo *flash*, utilizando como fase móvel um gradiente de AcOEt, AcOEt: MeOH (90:10), AcOEt: MeOH (80:20), AcOEt: MeOH (70:30), AcOEt: MeOH (60:40), AcOEt: MeOH (50:50), AcOEt: MeOH (40:60), AcOEt: MeOH (30:70), AcOEt: MeOH (20:80), AcOEt: MeOH (10:90) até MeOH. Para cada gradiente foi utilizado um volume de 250 mL de solvente. As sub-frações foram secas sob pressão reduzida em evaporador rotatório e através de análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram reunidas,

resultando em 4 frações principais (A-D). A sub-fração denominada C (510 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica (sílica, 0,063–0,2mm), utilizando AcOEt: acetona: CH₃COOH: H₂O (6:2:1:1, v/v/v/v), como fase móvel e fluxo 2,5 mL. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme semelhança. A fração 45-70 (43 mg) foi submetida a nova purificação por coluna em Sephadex LH-20, utilizando MeOH, como solvente e fluxo de 1 mL/min, resultando em uma sub-fração sem a presença de isoorientina. Nesta sub-fração foi identificada a presença de vicenina-2, crisina 6,8-di-*C*-glicopiranosídeo e em menor quantidade o composto spinosina.

3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A *C*-glicosilflavona isoorientina e da sub-fração sem isoorientina foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O cromatógrafo utilizado para a análise qualitativa apresenta as seguintes características: PerkinElmer (Series 200 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), equipado com detector de arranjo de diodos, bomba quaternária, degaseificador e injetor automático. As condições analíticas utilizadas foram: coluna Luna RP C18, 5 µm (150 mm × 4,6 mm de diâmetro) (Phenomenex[®]), com fase móvel composta pelo solvente A [tetrahydrofurano: isopropanol: acetonitrila (10:2:3)] e solvente B (ácido fosfórico 0,5 %). A separação foi realizada através de uma eluição isocrática (0-60 min 12 % A em B). O fluxo utilizado foi 1 mL/min e detecção por UV em 340 nm.

Foram utilizadas para identificação padrões de isoorientina, vicenina-2 e 6,8-di-*C*-glicosilcrisina, isolados e identificados em laboratório através de dados espectroscópicos de UV e RMN. Os picos observados nos cromatogramas obtidos por CLAE, foram identificados pelo tempo de retenção, co-injeção com amostra autêntica e por comparação dos espectros de UV.

3.3 Resultados obtidos

A figura 12 mostra o cromatograma da fração butanólica do pericarpo (**A**), do composto isoorientina (**B**) e da sub-fração do pericarpo sem isoorientina (**C**), com os respectivos espectros de UV de cada composto.

Como se pode observar, o fracionamento realizado permitiu a separação da isoorientina e a obtenção de uma fração com os demais componentes, que foram utilizados para investigar a ação de isoorientina em relação aos demais componentes na ação tipo-ansiolítica e sedativa do pericarpo. Um manuscrito com os resultados obtidos está em preparação.

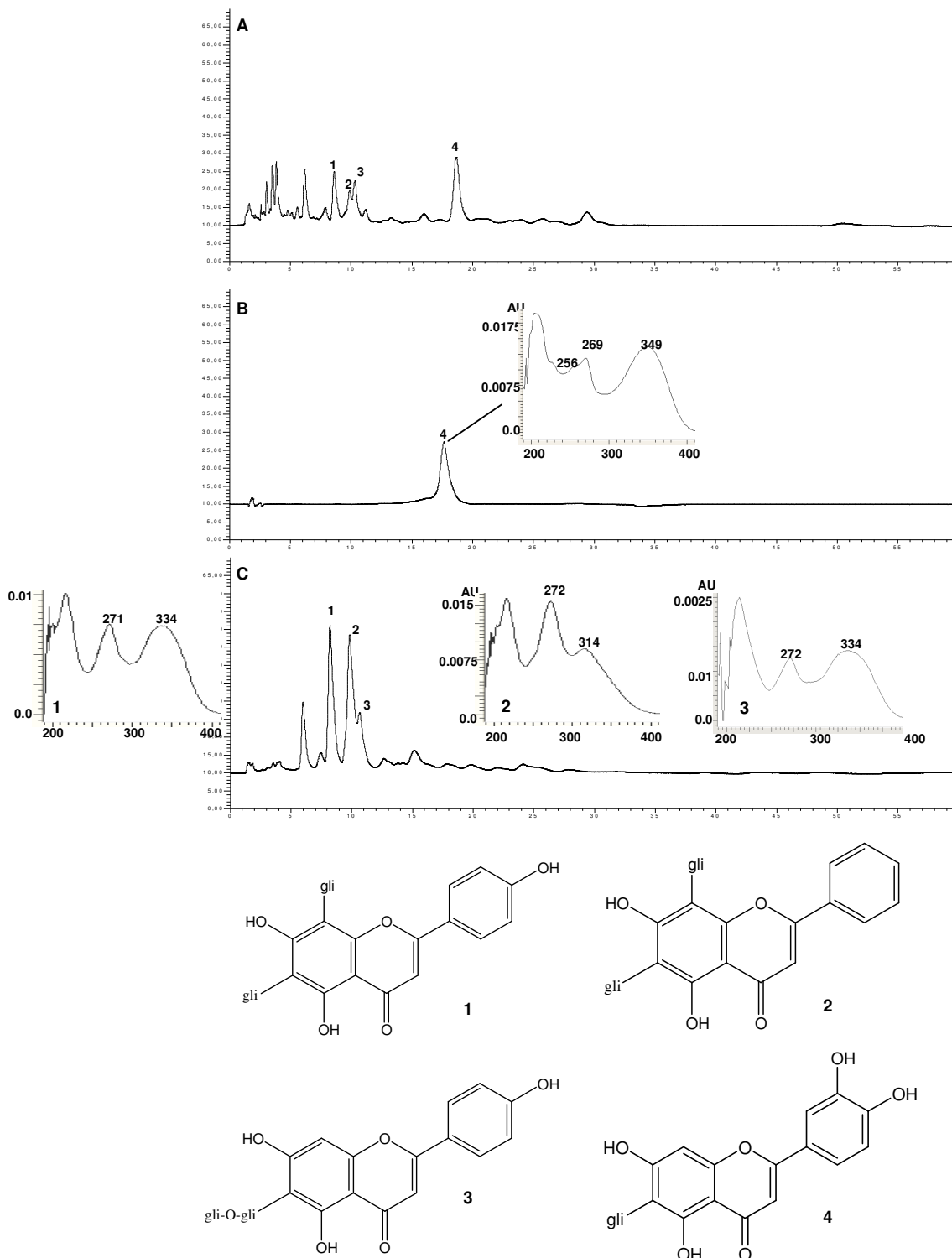


Figura 12: Cromatograma da fração butanólica do pericarpo de *P. edulis* var. *flavicarpa* (A), do composto isorientina (B) e da sub-fração sem isorientina (C). 1= vicenina-2. 2= crisina 6,8-di-C-glicopiranosídeo. 3= spinosina. 4= isorientina. Detecção: UV 340 nm. Ver condições cromatográficas no item 3.1.

CAPÍTULO 4: Análise qualitativa entre espécies de
Passiflora da América do Sul por Cromatografia Líquida de
Alta Eficiência

1.0 APRESENTAÇÃO

A realização deste estágio doutoral no exterior foi possível através da cooperação estabelecida com o Departamento de Química, da Universidad Nacional de Colombia, especificamente com a Profa. Dra. Carmenza Duque, líder do Grupo “Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”. A cooperação deu-se início em 2006, a partir da aprovação de um projeto pelo CNPq, no início do Programa Sul-Americano de Apoio às Atividades de Cooperação em Ciência e Tecnologia (PROSUL) - Processo aprovado 490496/2007-5, coordenado pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel. Inicialmente essa cooperação esteve centrada na investigação de produtos marinhos. No entanto, a diversidade de espécies de *Passiflora* da Colômbia, bem como a ausência de estudos químicos e farmacológicos, fez surgir o interesse de investigar essas espécies, por isso a inclusão no presente estudo.

A seguir será apresentada uma revisão sobre as espécies colombianas de *Passiflora* e uma proposta de publicação, que apresenta o perfil cromatográfico referente a flavonóides C-glicosídeos das folhas e do pericarpo dos frutos das cinco espécies de *Passiflora* coletadas na Colômbia e das duas espécies coletadas no Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As espécies colombianas de *Passiflora*

Na Colômbia há registro de 141 espécies da família Passifloraceae, distribuídas entre três gêneros, *Passiflora*, representando 97% do total de espécies e *Dilkea* e *Ancistrothysrus*, representando os 3% restantes. Na Região Andina está presente o maior número de espécies, cerca de 72%, em cultivos geralmente em

altitudes superiores a 1500 metros de altitude. Dessa forma, essa região representa o centro de origem de muitas espécies de *Passiflora*, das quais algumas são de grande importância econômica, devido à comercialização de seus frutos comestíveis. Dentre elas destacam-se as espécies: *Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *Passiflora ligularis*, *Passiflora edulis* var. *edulis* e *Passiflora quadrangularis* (HERNÁNDEZ ; BERNAL, 2000).

Passiflora tripartita* var. *mollissima

P. tripartita var. *mollissima* Holm-Nielsen & Møller Jørgensen, anteriormente conhecida como *P. mollissima* (Kunth) Bailey (PRIMOT et al., 2005), é chamada popularmente de *curuba de castilla*, na Colômbia, taxo, no Equador, e é cultivada da Venezuela e leste da Colômbia até Bolívia e Peru, geralmente em altitudes entre 2000-3630 m. As flores são do tipo tubulosas, com pétalas de coloração rosas (Figura 13) e frutos oblongos e ovóides (até 12 cm) (Figura 14) (ESCOBAR, 1988; RAMÍREZ; GONZÁLEZ, 1997; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; ASTURIZAGA et al., 2006; VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008), com um formato similar a banana, por isso em alguns países como na Austrália e Nova Zelândia, são conhecidos como “*banana passion fruit*” (WILLIAMS; BUXTON, 1995).



Figura 13: Flor de *P. tripartita* var. *mollissima*.

Fotos: Silvana Zucolotto Langassner.

Os frutos são amplamente utilizados na Colômbia, principalmente para a preparação de sucos, que podem ser feitos com água ou leite (PRIMOT et al., 2005, ASTURIZAGA; OLLGAARD; BALSLEV, 2006). Cabe destacar que, recentemente, um produto contendo extrato das folhas de *P. tripartita* foi aprovado para uso como sedativo e hipnótico pelo Instituto Nacional responsável pela Vigilância de Medicamentos e Alimentos da Colômbia (INVIMA, 2005).



Figura 14: Fruto de *P. tripartita* var. *mollissima*.

Fotos: Silvana Zucolotto Langassner.

Passiflora ligularis

P. ligularis Juss, conhecida popularmente como *granadilla*, é nativa e cultivada desde a Venezuela até o Peru e Bolívia, em altitudes superiores a 1000 metros (ASTURIZAGA; OLLGAARD; BALSLEV, 2006). As flores possuem pétalas brancas ou transversais e alternadas de coloração



Figura 15: Flor de *P. ligularis*.

Fotos: Silvana Zucolotto Langassner.

azul e branca (Figura 15). Os frutos são de coloração amarela, de formato oval (6-8 cm de comprimento e 4-5 cm de diâmetro), com casca rígida (Figura 16)

e apresentam sabor doce, o que favorece o consumo da fruta na forma fresca (PIO CORRÊA, 1978; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001; ARBELAEZ, 1996; ASTURIZAGA; OLLGAARD; BALSLEV, 2006).



Figura 16: Frutos de *P. ligularis*.

Fotos: Silvana Zucolotto Langassner.

Passiflora edulis* Sims var. *edulis

P. edulis Sims var. *edulis*, é conhecida popularmente como gulupa, na região andina da Colômbia e maracujá-roxo, no Brasil. A espécie é originária do Brasil, da região amazônica e ocorre nas encostas das Cordilheira dos Andes, na Colômbia, Equador e Venezuela (BERNAL; DÍAZ, 2005).



Figura 17: Flor e frutos de *P. edulis* var. *edulis*.

Foto da Flor: www.wikimedia.org

A espécie apresenta flores com pétalas brancas e filamentos roxos na metade inferior e brancos na metade superior (Figura 17) e frutos roxos-amarronzados, com comprimento de 6-7 cm (Figura 18) (CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001).



Figura 18: Frutos de *P. edulis* var. *edulis*.

Foto dos frutos: Silvana Zucolotto Langassner.

Passiflora quadrangularis

P. quadrangularis Linneaus é conhecida popularmente como badea na Colômbia e em outros países da América do Sul apresenta diferentes nomes (HERNÁNDEZ; BERNAL, 2000). No Brasil, a espécie é conhecida popularmente como maracujá-açú e maracujá-mamão (CERVI, 1997). *P. quadrangularis* é cultivada principalmente na América tropical em climas quentes e úmidos da América do Sul (entre 400 e 1500 metros de altitude). No Brasil é descrita a ocorrência da espécie nos estados do Amazonas e Maranhão (CERVI, 1997) e na Colômbia, ocorre principalente nas regiões de Chocó, Meta, Huila e Santander.

As flores apresentam pétalas brancas com manchas rosas, com uma série de elementos filamentosos, de coloração roxa-avermelhada e branca na parte inferior azul no meio e azul-rosada na parte superior (Figura 19) (ARBELAEZ, 1996; FRUITS FROM AMERICA, 2004).



Figura 19: Flor de *P. quadrangularis*.

Foto da Flor: Galeria de Fotos da Biblioteca "Luiz Ángel Arango" (Colômbia)/www.lablaa.org.

Os frutos são extremamente grandes quando comparados aos demais frutos de espécies de *Passiflora* (aproximadamente 20-30 cm de comprimento e 12-15 cm de largura), pesando de 1,5-3 Kg (Figura 20) (BERNAL; DÍAZ, 2005). Martin e Nakasone (1970) assemelham o fruto de *P. quadrangularis* ao melão, no entanto, apresentam coloração verde-amarelada, quando maduros e uma polpa doce, de sabor ácido utilizada para a produção de sucos e outras bebidas. Na medicina popular, folhas dessa espécie são utilizadas como calmante e descongestionante (PIO CORREA, 1978; CARVALHO-OKANO; VIEIRA, 2001) e no tratamento de hipertensão (LANS et al., 2006) e diabetes (SEAFORTH, 2005).



Figura 20: Frutos de *P. quadrangularis*.

Foto dos frutos: Silvana Zucolotto Laneassner.

Passiflora manicata

Além das espécies citadas, foi incluída neste trabalho, a espécie *P. manicata*, que constitui a única espécie do subgênero *Manicata*. Esta espécie ocorre em altitudes elevadas, de 1500 a 2600 m (BERNAL; DÍAZ, 2005), possui flores de coloração vermelha e não apresenta frutos comestíveis (Figura 21). Os frutos são pequenos, com 3 a 3,6 cm de largura), de coloração verde, com escassez de polpa (ESCOBAR, 1988). *P. manicata* é conhecida popularmente como *curuba de monte*, *tauso* e “*diablito*”. Há relatos de que a espécie apresenta toxicidade (BERNAL; DÍAZ, 2005),

por isso, aliado ao fato, dos frutos serem pouco suculentos, não é utilizada comercialmente.



Figura 21: Flor e fruto de *P. manicata*

Fotos: Galeria de Fotos da Biblioteca "Luiz Ángel Arango"
(Colômbia)/www.lablaa.org

Neste trabalho, também foram incluídas as espécies de maior destaque no mercado brasileiro: *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. alata*, já comentadas previamente no capítulo 1. A seguir segue uma proposta de publicação sobre a análise cromatográfica comparativa dos flavonóides C-glicosídeos das folhas e do pericarpo das espécies de *Passiflora* da América do Sul por CLAE-DAD.

PUBLICAÇÃO:

**Fingerprinting of C-glycosyl flavonoids of South American *Passiflora*
species by HPLC-DAD**

Zucolotto, S. M, Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F.H., Castellanos, L.,
Duque, C., Schenkel, E. P.

-Manuscrito em preparação-

**Fingerprinting of C-glycosyl flavonoids of South American *Passiflora* species
by HPLC-DAD**

Zucolotto, S. M.¹; Reginatto, F. H.¹; Ramos, F. A.²; Castellanos, L.²; Duque, C.²,
Schenkel, E. P.¹

¹*Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Universitário, Trindade, CEP 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.*

²*Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 número
45-03, Bogotá, Colombia.*

Corresponding author:

Prof. Dr. Eloir P. Schenkel
Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Farmácia,
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brasil.
Phone: 55 (48) 3721-5076
E-mail: schenkel@ccs.ufsc.br

Abstract

A fingerprint analysis by HPLC-DAD for *C*-glycosyl flavonoids of seven South American *Passiflora* species was performed. In this study it was evaluated the chemical composition of extracts from the leaves and pericarp of *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. quadrangularis*, *P. manicata* and *P. ligularis* concerning to the presence of *C*-glycosyl flavonoids. Vicenin-2, spinosin, 6,8-di-*C*-glycosylchrysin, isoorientin, orientin, vitexin, isovitexin, swertisin and vitexin-2''-*O*-ramnoside were used as authentic samples. The *Passiflora* species showed different chromatographic profiles and different major constituents. The compounds isoorientin, orientin, vitexin and isovitexin were the *C*-glycosyl flavonoids more commonly identified in these species. Additionally, *P. tripartita* var. *mollissima* extracts (leaves and pericarp) showed the most complex chromatographic profile. These results allow the characterization of pharmaceutical preparations containing these *Passiflora* extracts as active components and may form part of future drug authentication protocols.

Keywords *Passiflora*, *C*-glycosyl flavonoids; HPLC-DAD; fingerprinting.

1. Introduction

The genus *Passiflora*, comprising about 500 species and is the most important genus of the Passifloraceae family (Sacco, 1980). In North America and Europe these species are popularly known as passionfruit or passionflower (Blumenthal, Goldberg, Brinckmann, 2000) and in South America they have different local names (Table 1). Many of these species are very popular for their uses as edible fruits, or in the preparation of juices. Additionally, the leaves of several species of this genus are used traditionally in many countries as sedative or tranquilizer, against inflammatory problems and as diuretic (Pio Corrêa, 1978, Carvalho-Okano, Vieira, 2001, Lans, 2006).

The leaf extracts of *P. incarnata*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. edulis* var. *flavicarpa* and *P. alata*, have been the most extensively investigated regarding their chemical composition and biological activities, pointing to the presence of *C*-glycosyl flavonoids (Raffaelli et al., 1997, Mareck et al., 1991, Muller et al., 2005), saponins (Reginatto et al., 2001, Reginatto et al., 2004) and alkaloids (Lutomski, Maleck, 1975). However, there is no consensus on which of these compounds are responsible for the biological activities of *Passiflora* species, despite some recent studies have associated the pharmacological effects of *Passiflora* species with the presence of *C*-glycosyl flavonoids (De-Paris et al, 2002; Coleta et al., 2006, Santos et al., 2006, Zucolotto et al., 2009, Sena et al., 2009).

In Brazil, *P. alata* (F. Bras, 1976) and *P. edulis* var. *flavicarpa* (F. Bras, 2009) are present at the Brazilian Pharmacopoeia, but *P. edulis* var. *flavicarpa* is the most used specie for juice preparation. Both species are used as active component of many Brazilian registered pharmaceutical preparations. In Colombia, excluding *P. manicata* that does not have edible fruits, all others species included in our research,

P. tripartita var. *mollissima*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. quadrangularis* and *P. ligularis* are widely used for juice preparation. In addition, the leaves of *P. tripartita* var. *mollissima* have been recently accepted for its use in phytopharmaceutical preparations by the Colombian Agency for the Control of Foods and Drugs (Invima) as sedative and hypnotic (INVIMA, 2005).

Considering the large number of identified *Passiflora* species and also the wide pharmaceutical and ethnopharmacological utilization of some of these species, it is necessary to develop methodologies to ensure the quality of these extracts. In this sense, the development of chromatographic identification methods based on the chemical constituents may, hence, contribute significantly to the standardization of the crude drug. Therefore, we investigated the C-glycosyl flavonoids fingerprint of aqueous extracts from the leaves and pericarp of two species widely used in Brasil and five species from the Andean region of Colombia using HPLC-DAD.

2. Material and Methods

Reagents and Standards

Acetonitrile, tetrahydrofuran and isopropanol HPLC grade were purchased from Tedia[®]. Other reagents were of analytical grade and were purchased from Nuclear[®]. TLC plates (Merck[®]) were visualized by spraying with a methanol solution of diphenylboryloxyethylamine 1% (NP Reagent A) (Sigma). The reference standards orientin ($\geq 98\%$) and isoorientin ($\geq 98\%$) were purchased from Extrasynthèse[®] and vitexin ($\geq 96\%$) and isovitexin ($\geq 98\%$) from Fluka[®]. The compound 6,8-di-C-glycosylchrysin isolated from *Lychnophora ericoides* leaves was provided by Dr. Norberto Peoporine Lopes. Spinosin and swertisin were obtained from *Wilbrandea ebracteata* roots (Santos et al., 1996). Vicenin-2 was isolated from *P. edulis* var.

flavicarpa leaves and identified by NMR spectral data (^1H and 2D-NMR techniques-COSY, HSQC and HMBC and the purity was confirmed by HPLC/DAD (Zucolotto et al., 2009).

Plant Material

Leaves and fruits from *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener and *P. alata* Curtis species were collected in the State of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, respectively (Table 1) and leaves from *P. tripartita* var. *mollissima* (Kunth) Bailey, *P. edulis* Sims var. *edulis*, *P. quadrangularis* Linnaeus, *P. manicata* (Juss.) and *P. ligularis* Juss were collected in different Andean regions from Colombia (Table 1). The fruits from Colombian *Passiflora* species were purchased in the same places and also in the local market. For *P. edulis* var. *flavicarpa*, the plant materials were identified by Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg and voucher specimens are deposited at the Herbarium of Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 33886) and *P. alata* were identified by Dr. Branca Severo and voucher specimens have been deposited at Universidade de Passo Fundo (RSPF 7232). For the Colombian species, the plant materials were identified by Prof. Luis Carlos Jimenez and voucher specimens have been deposited at the collection of the Instituto Nacional de Ciencias, of the Universidad Nacional de Colombia: *P. tripartita* var. *mollissima* (COL 530663), *P. edulis* Sims var. *edulis* (COL 530661), *P. ligularis* (COL 530660), *P. manicata* (530663) and *P. quadrangularis*.

Table 1: *Passiflora* species selected for this study.

Specie	Local name	Part of plant	Location
<i>P. edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	maracujá-amarelo (Brazil) maracuyá (Colombia)	leaves and pericarp	Antonio Carlos/Santa Catarina, Brasil
<i>P. edulis</i> Sims var. <i>edulis</i>	maracujá-roxo (Brazil) gulupa (Colombia)	leaves and pericarp	Santa Sofia/Boyacá, Colombia
<i>P. alata</i>	maracujá-doce	leaves and pericarp	Nova Santa Rita/Rio Grande do Sul, Brasil
<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	curuba de castilla	leaves and pericarp	Santa Sofia/Boyacá, Colombia
<i>P. quadrangularis</i>	badea	leaves and pericarp	Neiva/Huila, Colombia
<i>P. ligularis</i>	granadilla	leaves and pericarp	Bogota/Cundinamarca, Colombia
<i>P. manicata</i>	curuba de monte, diablito	leaves	Villa de Leywa, Boyacá, Colombia

Extract preparation

The leaves of all species were air-dried at 40°C, powdered and extracted using hot water (90°C) by infusion (plant: solvent, 1:10,w/v) for 10 min. Thereafter, the aqueous extracts were filtered, concentrated under reduced pressure to 500 mL and partitioned with EtOAc (3 × 300 mL) and *n*-BuOH (3 × 300 mL), yielding the EtOAc and BuOH leaves` fractions.

The fruits were purchased at mature stage. The pulp (edible part) was removed and the pericarp was cut into small parts and extracted by infusion (90°C - plant: solvent, 1:3, w/v) for 10 min. Thereafter, the extract was filtered, concentrated under reduced pressure to 500 mL and partitioned with *n*-BuOH (3 × 300 mL), yielding the BuOH pericarp fractions.

BuOH fractions (BF) of leaves and pericarps were dried under reduced pressure and their profiles of C-glycosyl flavonoids were previously characterized by thin-layer chromatography (TLC). For TLC analysis the following conditions were used: aluminum sheets coated with silica gel F₂₅₄, as adsorbent, EtAOc: formic acid: H₂O (80:10:10, v/v/v), as the mobile phase, and methanol solutions of diphenylboryloxyethylamine (1%) (NP Reagent A) as the colour reagent. The spots were observed under short- and long-wave UV light.

HPLC analysis

The HPLC analyses were carried out in a PerkinElmer (Series 200 High-Performance Liquid Chromatography-HPLC) system, equipped with EP Diode Array Detection (DAD), quaternary pump, on-line degasser and autosampler. The chromatographic analysis was performed using a Luna C18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of solvent A [tetrahydrofuran: isopropanol: acetonitrile (10:2:3, v/v/v) and solvent B [0.5% H₃PO₄] (12 % A in B) with a flow rate of 1.0 mL/min. Each sample was filtered through a 0.45 μm filter and a 10 μL aliquot of the filtrate was injected for HPLC analysis. In all chromatographic analysis the following authentic samples were used: vicenin-2, spinosin, 6,8-di-C-glycosylchrysin, swertisin, orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin and vitexin-2"-O-ramnoside (Table 2). The analyses were performed in triplicate.

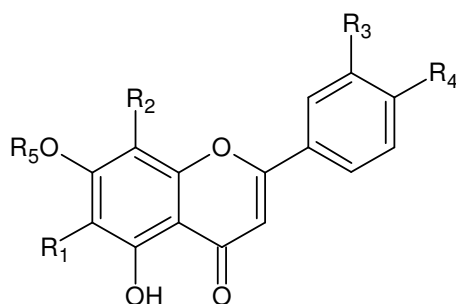


Table 2: Chemical structure of C-glycosyl flavonoids used as chemical markers.

C-glycosyl flavonoid	rt (min)	aglicone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
vicenin-2 (1)	8.9	apigenin	glu	glu	H	OH	H
6,8-di-C-glycosylchrysin (2)	10.0	chrysin	glu	glu	H	H	H
spinosin (3)	10.5	apigenin	glu-O-glu	H	H	OH	CH ₃
isoorientin (4)	17.5	luteolin	glu	H	OH	OH	H
swertisin (5)	20.5	apigenin	glu	H	H	OH	CH ₃
isovitexin (6)	26.5	apigenin	glu	H	H	OH	H
vitexin-2''-O-rhamnoside (7)	27.0	apigenin	H	glu-O-rham	H	OH	H
orientin (8)	27.0	luteolin	H	glu	OH	OH	H
vitexin (9)	38.0	apigenin	H	glu	H	OH	H

glu=glucose, rham= rhamnose

3. Results and discussion

Qualitative TLC and HPLC analysis of the extracts from the leaves of *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. alata*, *P. tripartita* var. *molissima*, *P. quadrangularis*, *P. manicata* and *P. liguralis* showed the presence of flavonoids as major compounds in all analysed extracts. The peaks were characterized by comparison of the retention time and the respective UV spectra compared with the reference standards, and by co-injection of the sample with standards. The different co-injections of the extract and standards, allowed us to observe an increase in the peak area of C-glycosyl flavonoids present in each analysed extract. Additionally, the presence of each compound was also confirmed by TLC analysis using authentic samples.

To select a proper HPLC system for the analysis of all studied samples, we revised the literature finding several systems for qualitative and quantitative analysis of *C*-glycosyl flavonoids from the leaves or aerial parts of *Passiflora* species (Qimin et al., 1991, Rehwald, Meier, Sticher, 1994, Raffaelli et al., 1997, Abourashed et al., 2002, Pereira; Yariwake, McCullagh, 2005, Muller et al., 2005, Pongpan et al., 2007). Otherwise, specifically related to the juice fruit composition analysis, there is only one work focused in this sense (Mareck, Galensa, Herrmann, 1990). In our work we tested most of these systems described in the literature. The most promising results were achieved using a Phenomenex Luna C (18) column (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) and acetonitrile, tetrahydrofuran and isopropanol (solvent A) and an acidified solution of phosphoric acid (solvent B) as the mobile phase. These chromatographic conditions resulted in sharp and symmetrical peaks, with good baseline resolution and minimal tailing. The analytical conditions used in this work were similar to the proposed by Rehwald and co-workers (1994), with minor modifications. Nine *C*-glycosyl flavonoids (**1-9**) were used as authentic samples and their retention time are showed in table 2. The run time was 60 min.

The chromatographic profile concerning *C*-glycosyl flavonoids of all samples ranged from a simple composition, as in the extracts from the leaves of *P. quadrangularis* and *P. ligularis*, to a complex composition, like the extracts from the leaves of *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. tripartita* var. *molissima* and *P. manicata*.

The *C*-glycosyl flavonoids identified in the BuOH fraction from all investigated *Passiflora* species (leaves and pericarp) are shown in Table 3. In *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves (figure 1A), the UV spectra of the major compounds (peaks **1** and **4**), showed the typical UV absorption of apigenin and luteolin derivatives, respectively. These major compounds were identified as vicenin-2 (peak **1**) and

isoorientin (peak **4**), followed by isovitexin, orientin, vitexin, spinosin and 6,8-di-C-glycosylchrysin. This extract was the only one that showed a compound with UV spectra similar to chrysin derivatives (figure 1A, peak **2**). Moreover, the BuOH fraction from the pericarp of this specie showed a similar chromatographic profile to the leaves, and also isoorientin as the major compound (figure 1B, peak **4**). These compounds have been previously described by our group research on *P. edulis* leaves and pericarp extracts (Zucolotto et al., 2009, Sena et al., 2009). In order to compare Brazilian and Colombian *P. edulis* var. *flavicarpa* pericarp extracts, samples were obtained from the local market in Colombia, and both extracts showed isoorientin as major compound (figure 1C).

Otherwise, the HPLC C-glycosyl flavonoid profile of *P. edulis* var. *edulis* and *P. edulis* var. *flavicarpa* extract were markedly different (figure 2A). From the authentic samples utilized, only the presence of orientin could be confirmed in leaves and pericarp of *P. edulis* var. *edulis*. The main compound from leaves could not be identified (figure 2A, $rt= 21.5$ min), but it showed similar UV absorption to luteolin derivatives.

These results suggest that *P. edulis* varieties (yellow and purple fruits) have different chemical composition, justifying the importance of developing studies concerning for the chemical characterization of the extracts of these two varieties. In the literature there are some chemical and pharmacological studies conducted with leaves extracts reporting the investigated specie as *P. edulis*, without clear identification of the varieties employed (for example: Maluf et al., 1981; Dhawan, Kurma, Sharma, 2001; Ichimura et al., 2006).

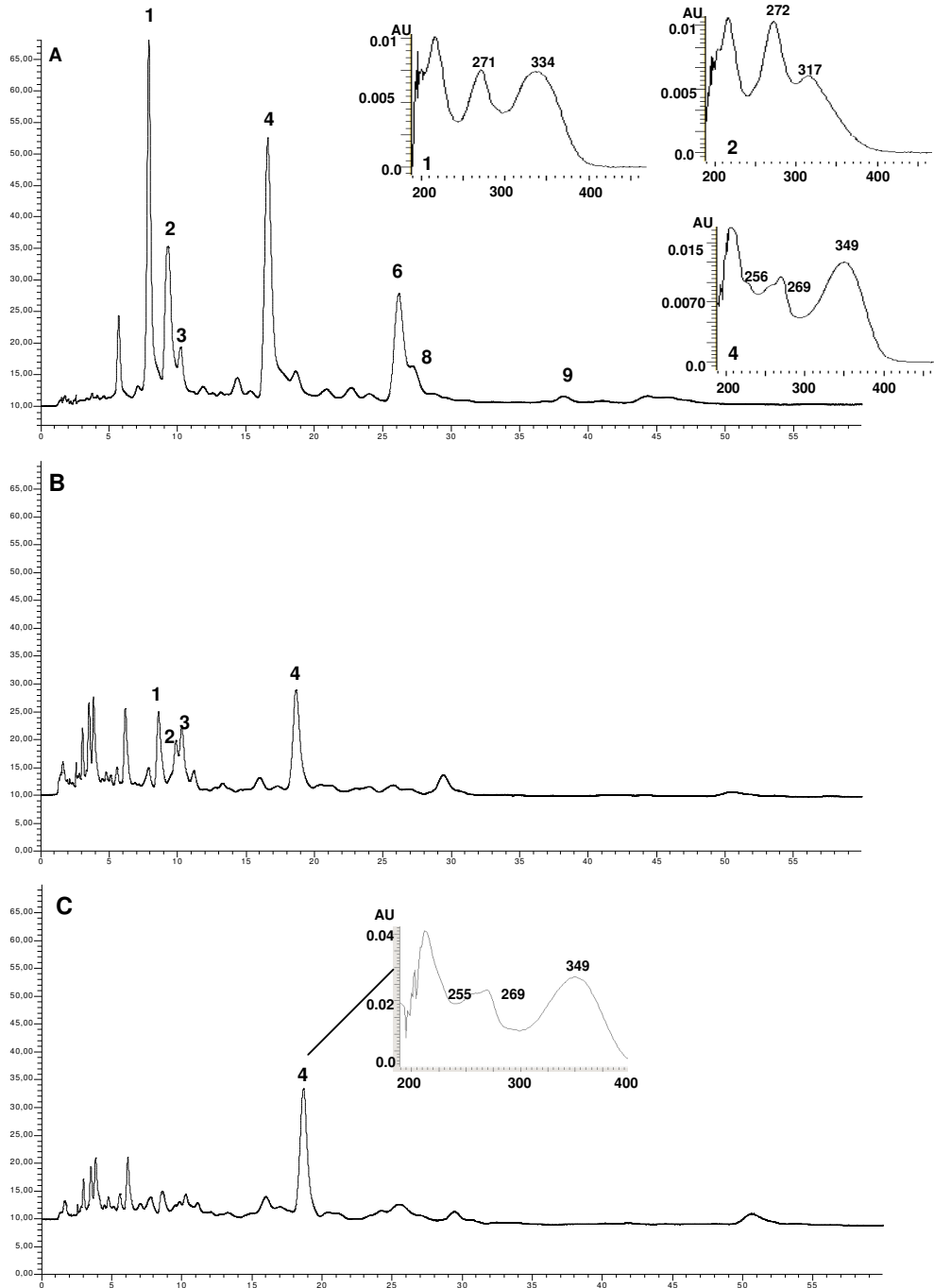


Figure 1: Chromatograms of BuOH fractions from *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves (A), pericarp (sample from Brazil) (B) and pericarp (sample from Colombia) (C) with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

Table 3: C-glycosyl flavonoids identified in South American *Passiflora* species.

Species	Part of plant	vicenin-2	6,8-di-C glycosylchrysin	spinosin	swertisin	vitexina-2''-O-ramnoside	isoorientin	orientin	isovitexin	vitexin
<i>P. edulis</i> var.	leaves	++	+	+	-	-	++	+	+	+
<i>flavicarpa</i>	pericarp	+	+	+	-	-	++	-	-	-
<i>P. edulis</i> var. <i>edulis</i>	leaves	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	pericarp	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. alata</i>	leaves	-	-	-	-	++	+	+	+	-
	pericarp	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	leaves	+	-	-	+	-	+	+	-	+
	pericarp	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>P. quadrangularis</i>	leaves	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	pericarp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. ligularis</i>	leaves	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pericarp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. manicata</i> *	leaves	-	-	-	-	+	+	+	++	+

* This specie does not have edible fruits, + compound identified, ++ major compound, - compound could not be identified.

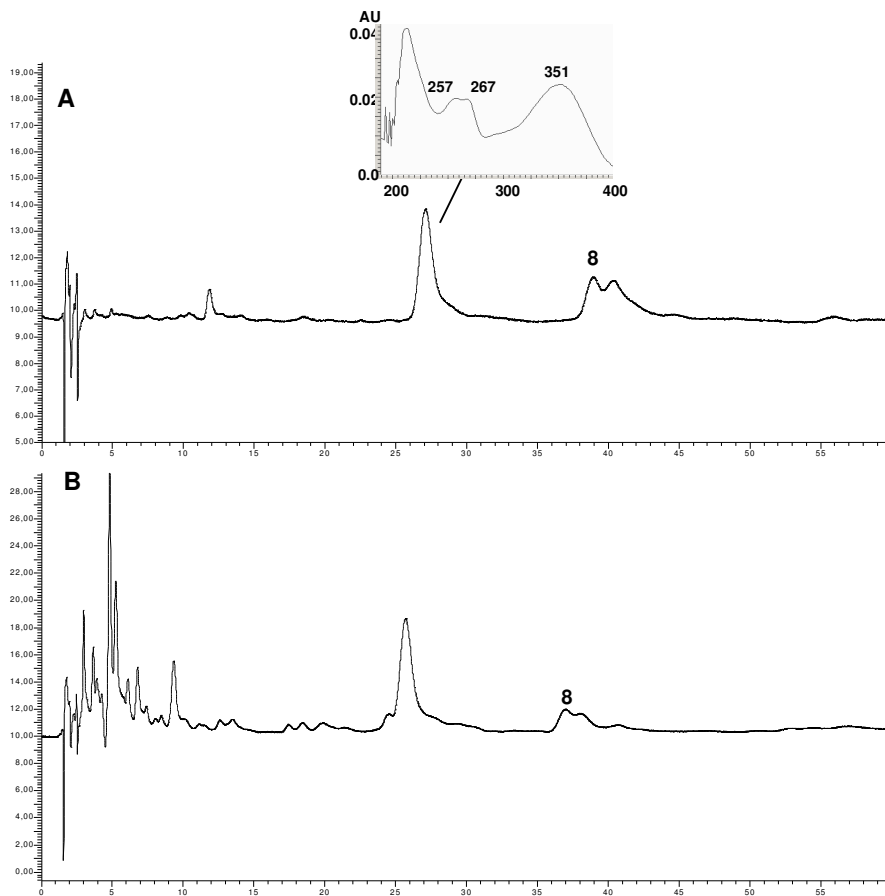


Figure 2: Chromatograms of BuOH fractions from *P. edulis* var. *edulis* leaves (A) and pericarp (B) with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

The analysis of *P. tripartita* leaves extract (figure 3A) displayed the greatest diversity of flavonoids among all of the analyzed samples. In the literature, there is one report concerning to the chromatographic profile of *C*-glycosyl flavonoids for this specie (Abourashed et al., 2002), being orientin the only identified compound, in addition the 4'-methoxy-6''-acetylorientin derivative was isolated for the same specie and recently reported for us (Ramos et al., 2009). In our investigations, in addition to these two compounds, isoorientin, vitexin, isovitexin, swertisin and vicenin-2, were also identified. However the two major compounds in the extracts (peaks with $rt=19.0$ and 29.0 min) (figure 3A) could not be identified. As far as we are aware, this is the

first report of the presence of isoorientin, orientin and swertisin in the pericarp from *P. tripartita* extract. It is important to emphasize that in this extract the accumulation of di and/or tri-glycosyl flavonoids (compounds with $rt = 6.0$ to 13.0 min) (figure 3A) must be characterized. Only the di-glycosyl flavonoid vicenin-2 was identified. Moreover in *P. tripartita* pericarp extract (figure 3B), a complex mixture of C-glycosyl flavonoids can be observed.

In *P. alata* leaves, only one major peak was observed (figure 4A, peak 7). This peak could be identified as vitexin-2''-O-ramnoside by analysis of UV spectra (similar to apigenin derivatives) and co-injection with authentic sample. In addition, isoorientin, isovitexin and orientin could be identified, as minor constituents. All these C-glycosyl flavonoids were previously reported from *P. alata* extracts (Ulubelen et al., 1982, Oga et al., 1984, Doyama et al., 2005). Specifically to *P. alata* pericarp (figure 4B) there was no previous report concerning the flavonoid composition. The TLC analysis showed the presence of three compounds, but only vitexin-2''-O-ramnoside could be identified.

In *P. quadrangularis* leaf extract, the presence of vitexin-2''-O-ramnoside as minor constituent could be identified (figure 5A, peak 7). On the other hand, the two main components with rt 19.5 and 30.5 min, respectively (figure 5A) could not be identified. These compounds show UV maxima at 336 and 269 nm, respectively, with characteristic of apigenin nucleus. For the extract of the *P. quadrangularis* pericarp, at least two flavonoids that were not identified by comparison with authentic samples were observed by TLC (figure 5B). However, these compounds did not show similar chromatographic behavior to the authentic samples used.

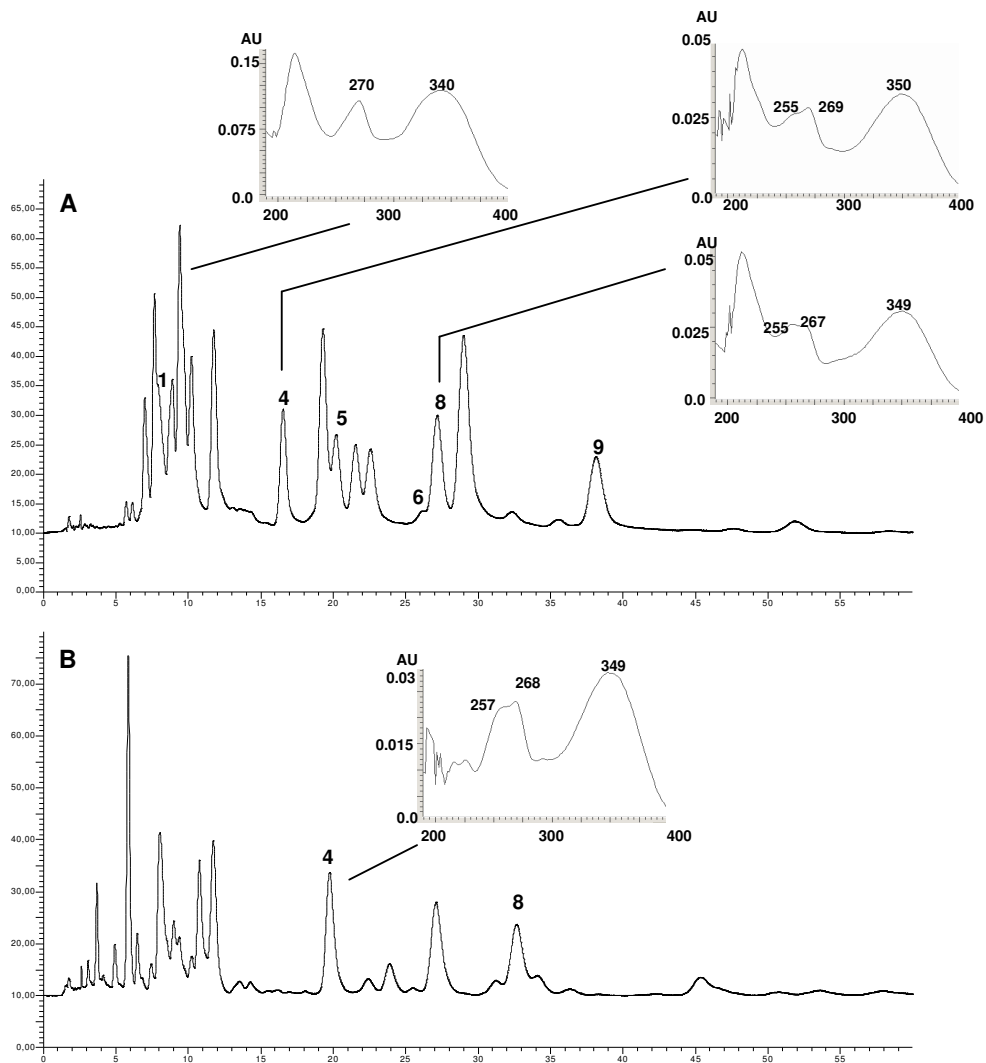


Figure 3: Chromatograms of BuOH fractions from *P. tripartita* var. *mollissima* leaves (A) and pericarp (B) with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

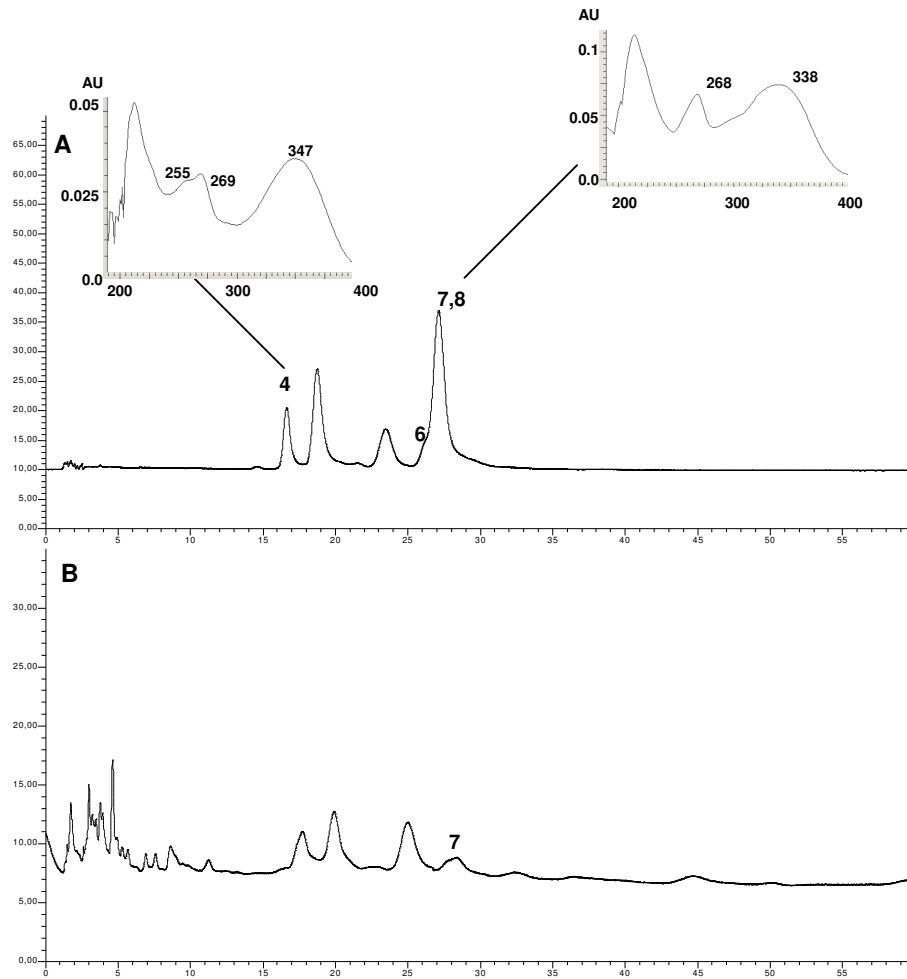


Figure 4: Chromatograms of BuOH fractions from *P. alata* leaves (A) and pericarp (B) with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

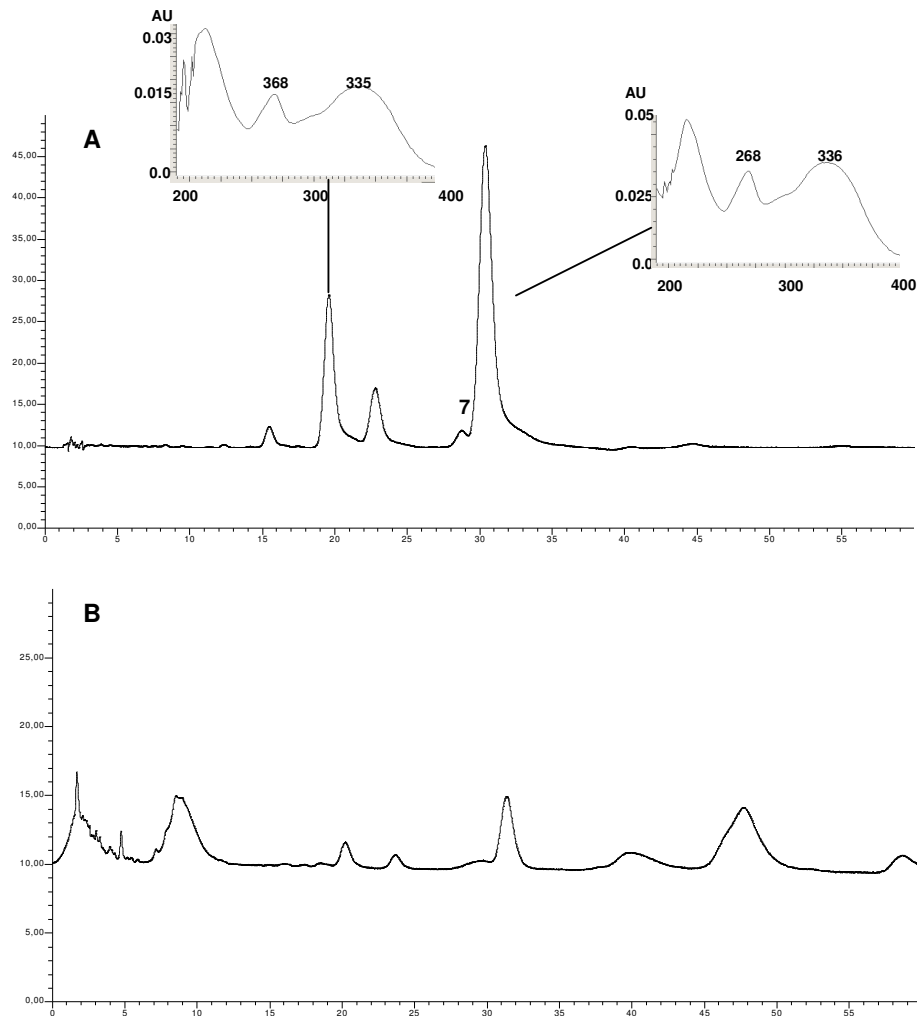


Figure 5: Chromatograms of BuOH fractions from *P. quadrangularis* leaves (**A**) and pericarp (**B**) with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

A high accumulation of *C*-glycosyl flavonoids could be observed in the extract of *P. manicata* leaves and orientin, isorientin, vitexin, isovitexin and vitexin-2''-*O*-ramnoside could be identified, together with isovitexin as the main constituent (figure 6C). Previous report of the flavonoid composition of *P. manicata* leaves pointed to the presence of isovitexin, vitexin, orientin and isorientin (Abourashed et al., 2002). Herein we report additionally the presence of vitexin-2''-*O*-ramnoside. The

composition of the pericarp was not investigated, because the specie does not produce edible fruits.

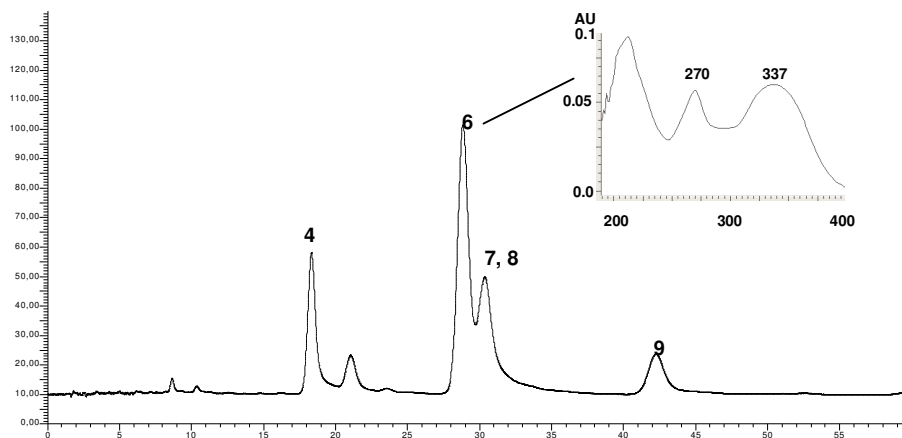


Figure 6: Chromatograms of BuOH fractions from *P. manicata* leaves with diode array detection at 340 nm. For chromatographic conditions, see Material and Methods.

For *P. ligularis* leaf and pericarp extracts, the TLC analysis showed spots with characteristics of flavonoids. However our HPLC analysis conditions could not detect any compound with similar chromatographic or spectral behavior related to the authentic samples used.

Considering the sum of our results, the presence of *C*-glycosyl flavonoids could be detected in all extracts from the leaves and pericarps of South American *Passiflora* species, all of them showing different HPLC chromatographic profiles. Therefore, the prevalence of these *C*-glycosyl flavonoids and their relative chemical stability can be used, for example, as chemical markers for authentication of samples, detection of adulterations, and differentiation between closely related species.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants- I. Application to *Passiflora* Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, v. 40 (2), p. 81-91, 2002.

BLUMENTHAL, M.; GOLDEBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs**. Austin: American Botanical Council, 2000, p.293-296.

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

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; DE LIMA, T.C.M. 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. 1067-1073, 2006.

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

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3a. ed. Andrei, São Paulo, pp. 839-840, 1976.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5a. ed. 2009 *in press*.

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

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

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 45, 2006.

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

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.

MULLER, 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.

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.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH, M. Distinction of the flavone C-glycoside pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochemical Analysis*, v.16, n. 5, p. 295 – 301, 2005.

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

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, n. 3, p. 378-382, 2007.

QIMIN, L.; VAN DEN HEUVEL, H.; ZO, O.; CORTHOOT, J.; PIETERS, 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.

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

RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; LÓPEZ, C.; PALACIOS, L.; DUQUE, C.; PACHECO, R.; GUZMÁN, A. An orientin derivative from *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. *in press*.

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

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.

SACCO, J.C. Passifloráceas. In: REITZ, R. (Ed) **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, 132 p., 1980.

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

SANTOS, R. I.; MARLISE, A.; SCHENKEL, E. P. Analysis of the plant drug *Wibrandia ebracteata*. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 34, p. 300-30, 1996.

SENA, L.M.; ZUCOLOTTO, S.M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E.P.; DE LIMA, T. C. M. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* variety *flavicarpa* Degener in mice: putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, p. 976-975, 2009.

ZUCOLOTTO, S.M.; GOULART, S.M.; MONTANHER, A.; REGINATTO, F. H., SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. Biossay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica*, v.75, p. 1221-6, 2009.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C- Glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manji*. *Journal of Natural Products*, v. 45, n.6, p. 83, 1982.

CAPÍTULO 5: Uso de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade para o isolamento de flavonóides glicosilados das folhas de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*.

1. INTRODUÇÃO

No presente capítulo será apresentada uma revisão sobre o emprego de Cromatografia em Contracorrente para o isolamento de produtos naturais.

A Cromatografia em Contracorrente (CCC) foi desenvolvida na década de 70, especialmente por Ito e Bowman e tornou-se uma ferramenta com muitas vantagens para o isolamento de produtos naturais. A CCC é uma técnica de separação líquido-líquido, sem o uso de adsorvente e consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, na qual uma das fases atua como fase estacionária e a outra como fase móvel. A eficiência na separação dependerá da distribuição do soluto em cada uma das fases e essa distribuição é determinada pelos coeficientes de partição do (s) analito (s) em relação às fases estacionária e móvel. A técnica de CCC elimina muitos problemas causados em métodos tradicionais de separação sólido-líquido (MARSTON, 2007; STICHER, 2008).

Entre as principais vantagens da técnica, pode-se destacar:

- Recuperação total da amostra injetada;
- Evita problemas relacionados à decomposição da amostra;
- Baixo consumo de solventes;
- Favorável economicamente (após o investimento inicial com o equipamento, são utilizadas as mesmas colunas e os solventes grau analítico) (MARSTON, 2007; STICHER, 2008).

Seleção do sistema de solventes

A escolha de um sistema de solventes adequado é o requisito de maior importância no desenvolvimento do método para análise por CCC e representa a parte crucial para o desenvolvimento do método (STICHER, 2008).

Uma sistemática utilizada para a escolha do sistema de solventes consiste em preparar a mistura de solventes em um funil de separação e, depois de atingido o equilíbrio, separar as fases. Então, cerca de 2 mg da amostra é pesada em um tubo de ensaio e é adicionado 4 mL de cada fase ao tubo. Após agitar vigorosamente o tubo de ensaio durante 2 min, para que ocorra a distribuição do(s) analito(s) entre as fases, as mesmas são separadas, secas sob pressão reduzida e, analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) ou por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (PENG et al., 2005; ZHOU et al., 2005).

Por CCD, pode ser utilizado um sistema já conhecido para analisar o (s) analito(s) presentes na amostra. Se o (s) analito (s) em interesse, apresentar $R_f > 0,5$, a fase móvel será a fase menos polar e, se o (s) analito (s) apresentar $R_f < 0,5$, a fase móvel será a fase mais polar. No entanto, se o R_f for $< 0,3$ e $> 0,7$, deve-se evitar o uso do sistema, porque o (s) analito (s) serão retidos de maneira não adequada em uma das fases e, além disso, a separação pode não ser eficiente ou o tempo de análise muito longo (HOSTETTMANN; HOSTETTMANN; NAKANISHI, 1979).

Por CLAE, compara-se a área do (s) analito (s) na fase superior e na fase inferior. O coeficiente de partição (K) é expresso como a área do pico (s) de interesse na fase superior dividido pela fase inferior. Então, o fator de separação pode ser expresso como $\alpha = K_2/K_1$. Para a fase superior atuar como fase móvel, K_2 tem que apresentar uma área maior que K_1 (PENG et al., 2005).

Na escolha do sistema de solventes, pode-se utilizar como fase móvel tanto a fase inferior como a fase superior e, o mesmo ocorre com a fase estacionária. Quando for selecionada a fase inferior como fase móvel, a análise será denominada em fase reversa e, ao contrário, a fase inferior atuando como fase estacionária, a análise será denominada em fase normal (LI; CHEN, 2008).

Na escolha dos solventes, alguns requisitos são importantes:

- O (s) analito (s) deve ser estável e solúvel em uma das fases;
- O sistema de solventes deve formar duas fases com um volume equivalente para evitar desperdícios;
- Como ocorre partição do (s) analito (s) entre as duas fases líquidas imiscíveis, o sistema de solventes deve fornecer um valor de coeficiente de partição (K) adequado para o (s) analito (s) [o valor de K é adequado para a análise por CCC se $0,5 \leq K \leq 1,0$];
- A separação do (s) analito (s) entre as fases deve ocorrer em tempo inferior a 30 s, para evitar a formação de emulsão;
- O sistema de solventes deve fornecer um rendimento satisfatório para os componentes retidos na fase móvel na coluna (OKA; OKA; ITO, 1991; PAN; LU, 2008; STICHER, 2008);

Modalidades de CCC

Dentre as várias modalidades de CCC, como CCC de gotas (“*DCCC: droplet counter-current chromatography*”), CCC locular rotacional (“*RLCC: rotation locular counter-current chromatography*”), a técnica mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a CCC de alta velocidade (“*HSCCC: high-speed counter-current chromatography*”) (ITO; BOWMAN, 1970; DUBANT et al., 2008).

Especificamente o equipamento de HSCCC (figura 22) consiste em um reservatório com a fase móvel e outro com a fase estacionária; uma bomba; uma válvula de injeção; uma coluna; um detector (opcional) e um coletor de frações. A coluna é preenchida com a fase estacionária em uma bobina de tubo de teflon enrolado de forma espiral, que realiza um movimento planetário em torno de um eixo central. Nessa técnica, a fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga, enquanto a fase móvel imiscível é bombeada em alta velocidade. O equipamento inteiro de HSCCC pode ser considerado como uma coluna de um sistema de CLAE. Em relação as demais técnicas de CCC citadas anteriormente, a HSCCC apresenta vantagens, como, a diminuição do tempo de análise sem perda de resolução e a utilização de quantidades menores de solventes (McALPINE, MORRIS, 2006).

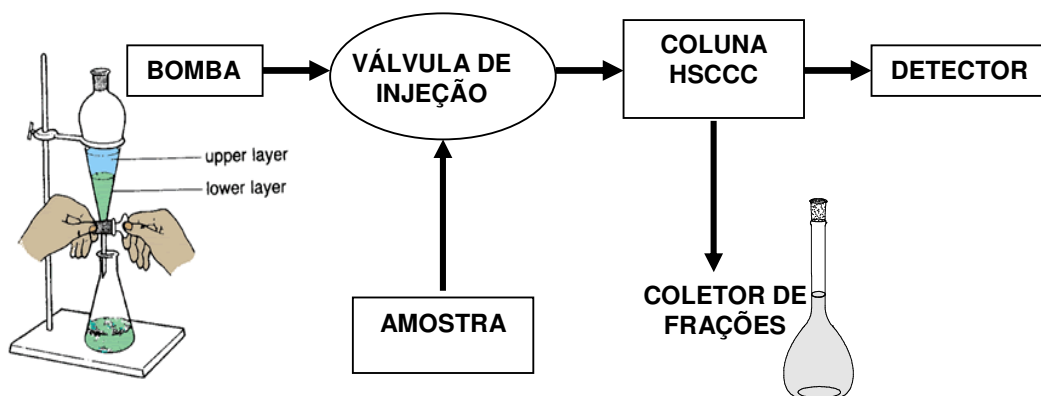


Figura 22: Esquema representativo do sistema da Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade.

A figura 23 apresenta o equipamento de Cromatografia de Contracorrente de Alta Velocidade do Departamento de Química, da Universidad Nacional de Colombia. O equipamento não possuía detector, dessa forma, a análise das frações coletadas foi realizada primeiramente por CCD e, após reunidas conforme semelhança, as frações resultantes foram analisadas por CLAE.

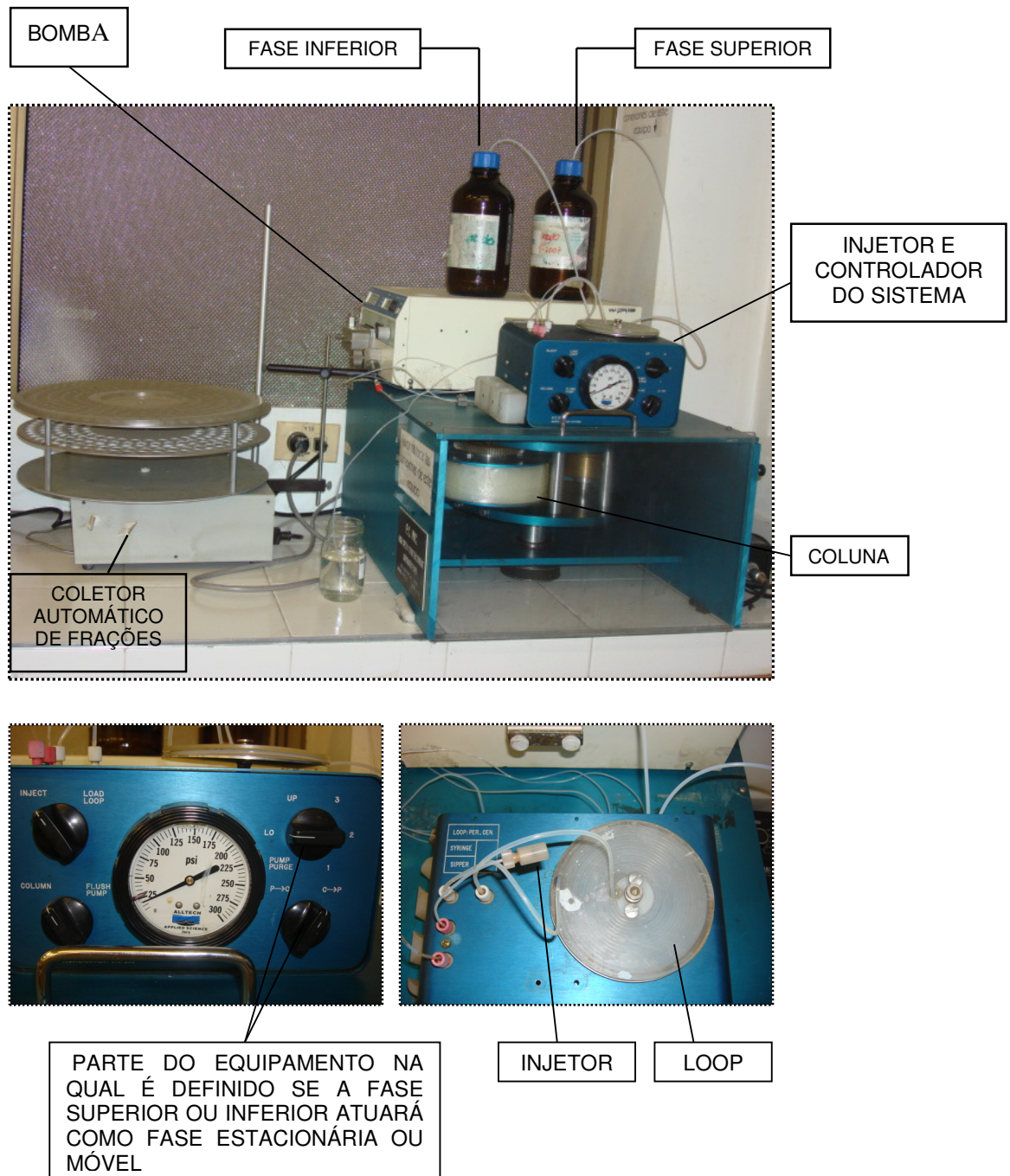


Figura 23: Equipamento de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (SER 521, Merk- Hitachi), bomba L-6000A e coletor automático de fração (Eldex U-200. Model UFC Serial No 3532).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura, não foi encontrado nenhum trabalho sobre o isolamento de flavonóides C-glicosídeos, por CCC, em espécies de *Passiflora*. Foi

encontrado apenas um relato sobre o uso da técnica de CCC de gotas, para o isolamento de triterpenos glicosilados das folhas de *P. quadrangularis*. A partir de uma sub-fração do extrato metanólico das folhas (566 mg) submetida a CCC de gotas, foi obtido 157 mg de quadrangulosídeo. E a partir de outra sub-fração (400 mg), foram isolados 35 mg de 22-hidroxi-isoquadrangulosídeo e 150 mg do ácido 3-*O*- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo oleanóico (ORSINI; VEROTTA, 1985).

Dessa forma, a presente revisão foi conduzida em busca de trabalhos que utilizaram a técnica de CCC para o fracionamento e purificação de extratos de espécies vegetais contendo flavonóides do tipo *C* glicosilados. A tabela 1 apresenta as condições cromatográficas utilizadas na análise por CCC para isolamento de flavonóides *C*-glicosídeos, em trabalhos encontrados na literatura.

Krenn e colaboradores (2003) obtiveram 18 mg de isoschaftosídeo do extrato metanólico das partes aéreas de *Achillea nobilis*. Diferente dos demais trabalhos, foi utilizado a modalidade de CCC de gotas e também, não foi o único procedimento para a purificação de isoschaftosídeo, sendo utilizados sucessivos procedimentos cromatográficos.

Peng e colaboradores (2005), a partir de 250 mg do extrato bruto de *Patrinia villosa*, obtiveram 42,9 mg de isovitexina e 20,1 mg de isoorientina, utilizando a técnica de CCC de Alta Velocidade, como único procedimento para a obtenção dos compostos, em uma análise com tempo inferior a 7 horas.

O fracionamento por CCC de Alta Velocidade de 500 mg do extrato bruto de *Trollius ledebouri* possibilitou a obtenção de três compostos puros, orientina (95,8 mg), vitexina (11,6 mg) e um composto desconhecido (9,3 mg), em menos de 8 h de análise. Também, foi obtida uma fração contendo quercetina-3-*O*-

neohesperidosídeo, como composto majoritário (80,6 mg- 85,1 % de pureza), posteriormente purificada por CLAE. Nesse trabalho o fluxo de trabalho foi alterado de 1,5 mL/min para 2,5 mL/min depois de 190 min de análise (ZHOU et al., 2005).

Outros trabalhos mostram que, após a obtenção de uma fração enriquecida em flavonóides (2,3 g) de *Cecropia lyratiloba*, foi necessário realizar dois processos de separação por CCC de Alta Velocidade, utilizando sistemas de solventes diferentes (tabela 4), para a obtenção de 20 mg de apigenina 6-C-galactosil-6"-O-β-galactopiranosídeo, 54 mg de isoorientina e 74 mg de uma mistura de orientina e isovitexina (OLIVEIRA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006).

Com base nos trabalhos descritos na tabela 4, foram realizados vários testes para a escolha do melhor sistema de solventes para realizar o processo de purificação por CCC das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* e optou-se pelo sistema utilizado por Peng e colaboradores (2005). No entanto, foram invertidas as condições cromatográficas, utilizando-se a fase superior como fase móvel.

Tabela 4: Condições cromatográficas utilizadas para o isolamento de flavonóides C-glicosídeos por CCC.

Espécie	Compostos	Solvente	Ref
<i>Achillea nobilis</i>	isoschaftosideo	CHCl ₃ : MeOH: IsPr: H ₂ O (9:12:1:8) Fase móvel: fase superior/ 2,0 mL/min	1
<i>Patrinia villosa</i>	isorientina e isovitexina	AcOEt: BuOH: H ₂ O (2:1:3) Fase móvel: fase inferior/ 2,4 mL/min	2
<i>Trollius ledebouri</i>	orientina, vitexina, quercetin-3-O-neohesperidosídeo e um composto desconhecido	AcOEt: BuOH: H ₂ O (2:1:3) Fase móvel: fase inferior/ 1,5 mL/min até 190 min, após 190 min= 2,5 mL/min	3
<i>Cecropia lyratiloba</i>	apigenina 6-C-galactosil-6"-O-β-galactopiranosídeo, isorientina, orientina e isovitexina	Foram utilizados dois sistemas: 1º) CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (46:25:29) Fase móvel: fase inferior/ 2 mL/min 2º) AcOEt: BuOH: MeOH: H ₂ O (35:10:11:44) Fase móvel: fase inferior	4, 5

1: Krenn et al., 2003. 2: Peng et al., 2005. 3: Zhou et al., 2005. 4: Oliveira et al., 2003. 5: Almeida et al., 2006.

O trabalho em anexo é uma proposta de publicação sobre o uso da técnica de HSCCC para o isolamento de flavonóides glicosilados das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*. O trabalho descreve as condições cromatográficas utilizadas na análise, o processo de fracionamento e os resultados obtidos. A parte de elucidação estrutural ainda não está concluída.

PUBLICAÇÃO:

High-speed counter-current chromatography as a tool to isolate glycosyl flavonoids from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* leaves

Zucolotto, S. M, Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F.H., Castellanos, L.,

Duque, C., Schenkel, E. P.

-Manuscrito em preparação-

**High-speed counter-current chromatography as a tool to isolate glycosyl
flavonoids from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* leaves**

Zucolotto, S. M¹; Fagundes, C.¹; Reginatto, F. H¹.; Ramos, F.H.²; Castellanos, L.²;
Duque, C.², Schenkel, E. P.¹

¹ *Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Universitário, Trindade, CEP 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.*

² *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 número
45-03, Campus Universitario, Bogotá, Colombia.*

Corresponding author:

Dr. Eloir Schenkel
Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Farmácia,
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC, 88049-900, Brasil.
Phone: 55 (48) 3721-5076
E-mail: schenkel@ccs.ufsc.br

Abstract

High-speed counter current chromatography (HSCCC) was used to isolate and separate glycosyl flavonoids from the leaves of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* extract using a two-phase solvent system composed of ethyl acetate: *n*-butanol: water (2:1:3, v/v/v). Consequently, 46 mg of an unknown compound and 30 mg of isoorientin using the lower phase as stationary phase were obtained. In addition, this solvent system allowed the retention of di-*C*-glycosyl flavonoids in the stationary phase, facilitating the purification of these compounds.

Keywords

High-speed countercurrent chromatography, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, glycosyl flavonoids.

Introduction

The genus *Passiflora*, comprising about 500 species, is the most important genus of the family Passifloraceae. Many of these species are found mainly in South America (Sacco, 1980). These species are popularly known as “maracujás” in Brazil and are very popular not only because of the utilization of their fruits for the preparation of juices, but also because the infusion of their leaves has been largely used traditionally in many countries as sedative or tranquilizer, against inflammatory problems and as diuretic (Pio Corrêa, 1978, Carvalho-Okano, Vieira, 2001, Lans, 2006).

P. alata (F. Bras., 1977) and *P. edulis* var. *flavicarpa* (F. Bras., 2009) are described at the Brazilian Pharmacopoea. *P. edulis* var. *flavicarpa* is extensively cultivated in Brazil for the production of juice and their extracts are used as active component in pharmaceutical preparations.

Previous reports associate the C-glycosyl flavonoids with neuropharmacological (De-Paris et al, 2002; Coleta et al., 2006, Santos et al., 2006, Sena et al., 2009) and anti-inflammatory activities of *Passiflora* species (Zucolotto et al., 2009). For this species the presence of isoorientin, orientin, vitexin and isovitexin has been reported in the leaves (De-Paris et al., 2001, Zucolotto et al., 2009) and vicenin-2, 6,8-di-C-glycosylchrysin and spinosin. Isoorientin and vicenin-2 were identified as the main compounds (Zucolotto et al., 2009).

In view of these studies, an efficient method for the separation and purification of these compounds from *Passiflora* species could be warranted. High-speed countercurrent chromatography (HSCCC) is a separation technique that uses a liquid stationary phase without solid support matrix, in conjunction with the use of centrifugal force. This technique eliminates the irreversible loss of sample onto the

solid support matrix used in the conventional adsorption chromatographic column. In addition, the method allows the direct introduction of crude samples into the columns without previous preparation (Ito, Bowman, 1970, Pan, Lu, 2007; Pauli et al., 2008). HSCCC has recently been employed as a rapid and efficient method to isolate *G*-glycosyl flavonoids from different medicinal plants, as described for *Cecropia lyratiloba* (Oliveira et al., 2003, Almeida et al., 2006), *Achillea nobilis* (Krenn et al. 2003), *Patrinia villosa* (Peng et al., 2005) and *Trollius ledebouri* (Zhou et al., 2005). Specifically for *Passiflora* species, there was found only one report concerning the isolation of saponins by *Droplet Counter-Current Chromatography* (DCCC) (Orsini, Verotta, 1985).

Therefore, the aim of this work, was the development of an efficient method for the isolation and purification of glycosyl flavonoids from *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves by HSCCC.

Material and Materials

Apparatus

Preparative HSCCC was carried out with a high-speed counter-current chromatography (SER 521, Merk- Hitachi) coupled with L-6000Ap pump and an automatic fraction collector (Eldex U-200. Model UFC Serial No 3532).

The qualitative high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out in a PerkinElmer (Series 200 High-Performance Liquid Chromatography-HPLC) system, equipped with EP Diode Array Detection (DAD), quaternary pump, on-line degasser and autosampler.

The preparative HPLC analysis was performed in a Hitachi-Merck D-600 equipment, with L4250 UV-VIS detector and L6000A pump.

NMR (mono and bidimensional) was acquired using TMS as internal standard. Spectra were obtained on a Bruker AVANCE 400 spectrometer (Karlsruhe, Germany).

Reagents

The solvents used for HSCC analyses were of analytical grade and were purchased from Merck[®]. For HPLC analysis the solvents were purchased from Tedia[®] (HPLC grade). TLC plates were visualized by spraying with methanol solution of diphenylboryloxyethylamine (1%) (NP Reagent A) (Sigma, Brazil).

Plant material

The leaves of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener were collected in Antônio Carlos, Santa Catarina, Brazil in June 2006 and identified by Dr. Daniel Falkenberg (Department of Botany of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil). A voucher specimen was deposited in the Herbarium at the same university (FLOR 33886).

Extraction and isolation

The leaves of *P. edulis* (200 g) were air-dried at room temperature, powdered, and extracted using hot water (90°C) by infusion (plant : solvent, 1:10,w/v) for 10 min. Thereafter, the aqueous extract was filtered and partitioned with EtOAc (3 × 300mL) and n-BuOH (3 × 300mL), yielding EtOAc and BuOH fractions. The EtOAc and BuOH fractions were analyzed by TLC using the following conditions: aluminum pre-coated sheets with silica gel F₂₅₄, as adsorbent, EtOAc: formic acid: H₂O (8:1:1/v/v/v), as mobile phase and detection with a methanol solution of diphenylboryloxyethylamine

(1%) (NP Reagent A). The spots were observed under short- and long-wave UV light. The BuOH fraction was selected for further fractionation by HSCCC.

Preparation of two-phase solvent system and sample solution

The two-phase solvent system used in the present study was prepared by mixing ethyl acetate–*n*-butanol–water (2:1:3, v/v/v). The solvent mixture was thoroughly equilibrated in a separatory funnel at room temperature and the two phases were separated shortly after and degassed before use. The sample solution was prepared dissolving the sample in 5.0 mL of the lower phase.

Selection of suitable two-phase solvent

Approximately 2 mg of the butanolic fraction was weighted in a test tube and diluted with 4.0 mL of each phase (upper and lower phases) of the equilibrated two-phase solvent system. The tube was shaken vigorously for 2 min to equilibrate the sample thoroughly within of the two phases. Then, the phases were separated and evaporated to dryness under reduced pressure. The residues were diluted in MeOH and analysed by TLC, as described in Extraction and Isolation.

Qualitative HPLC analysis

The butanolic fraction from *P. edulis* leaves, the main fractions obtained by HSCCC and the isolated compounds were analyzed by HPLC. All samples were dissolved in MeOH:H₂O (1:1, v/v), filtered using a 0.45 µm syringe filter (PVDF, Waters, Milford, USA) and 20 µL aliquots were injected. The analyses were performed on a Luna RP C18 (5 µm) (150 mm × 4.6 mm) column (Phenomenex®). The mobile phase consisted of solvent A [THF: 2-propanol: ACN (10:2:3, v/v/v)] and

solvent B (0.5% phosphoric acid). The separation was achieved at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) using isocratic elution (60 min 12% A in B) with a flow rate of 1 mL/min and UV detection (340 nm).

HSCCC separation procedure and purification of the main fractions

To isolate and separate the components from the butanolic fraction of *P. edulis* leaves, the coil column was first entirely filled with the lower phase of the solvent system, selected as stationary phase. Then, the apparatus was rotated approximately at 750 rpm, while the upper phase (mobile phase) was pumped into the column at a flow rate of 1.5 mL/min. After the hydrodynamic equilibrium between both phases was established in the column, 5 mL of the sample solution containing 1.5 g of the butanolic fraction was injected in the loop and 50 fractions (7 mL) were collected.

In this analysis a partially purified fraction (fraction **I**, 62 mg) was obtained, containing only a major compound (peak **8**, figure 1). Peaks were numbered according to the elution order observed for the butanolic fraction of *P. edulis* leaves (figure 1). The chromatogram of fraction **I** is shown in figure 2a. This fraction was further purified using a chromatographic column (silica gel-0.2-0.063, 15 g), as adsorbent, IsPr: ACOEt: MeOH: H₂O: CH₃COOH (2:8:1:2:0.2, v/v/v/v), as mobile phase and flow rate of 1 mL/min, resulting in 46 mg of compound **8** (figure 2b)

Other partially purified fraction obtained by HSCCC analysis was the fraction **II** (67 mg) that showed the C-glycosylflavone isoorientin (peak **4**, figure 1), as the major compound. The chromatogram of fraction **II** is shown in figure 3a. In order to purify isoorientin, the fraction **II** was submitted to chromatographic column of Sephadex LH-

20, using MeOH as mobile phase and flow rate of 1 mL/min, yielding 30 mg of isoorientin.

The retained compounds in the stationary phase (lower phase) were designated as fraction **III**. One unknown compound (peak **1**) and the compounds vicenin-2 (peak **2**), 6,8-di-*C*-glycosylchrysin (peak **3**), spinosin (peak **4**) (figure 1) were retained in this stationary phase. The chromatogram of fraction **III** is shown in figure 4. In order to purify the compound **1**, part of fraction **III** (60 mg) was submitted to preparative HPLC, using H₂O: ACN: CH₃COOH (82:18:1, v/v/v), as mobile phase, a Lichrosorb RP18 column (250 × 25, 7 μm), a flow rate of 3 mL/min and detection at UV 340 nm. Then, 2 mg of compound **1** was obtained.

In another procedure to obtain compound **1**, the HSCCC was repeated with 1 g of the butanolic fraction and the same conditions of the previous experiment were used, but after 7 hours of analysis, the chromatographic conditions were inverted in the system. In this case, the lower phase was used as mobile phase (reverse phase analysis). As results, two main fractions enriched in compound **1** were obtained. The chromatogram of one these purified fractions codified as fraction **IV** is shown in Figure 5a. These fractions were further purified using Sephadex LH-20, as adsorbent, and eluting with MeOH, flow rate of 1 mL/min, yielding 10 mg of compound **1**. The chromatogram of compound **1** is shown in figure 5b.

Results and discussion

The HPLC chromatogram of butanolic fraction from *P. edulis* leaves is shown in figure 1. Peaks **1-9** correspond to vicenin-2 (peak **2**), 6,8-di-*C*-glycosylchrysin (peak **3**), spinosin (peak **4**), isoorientin (peak **5**), isovitexin (peak **6**), orientin (peak **7**)

and vitexin (peak **9**), as described in our previous work (Zucolotto et al., 2009). In addition, in this chromatogram there are two unknown components (peak **1** and **8**).

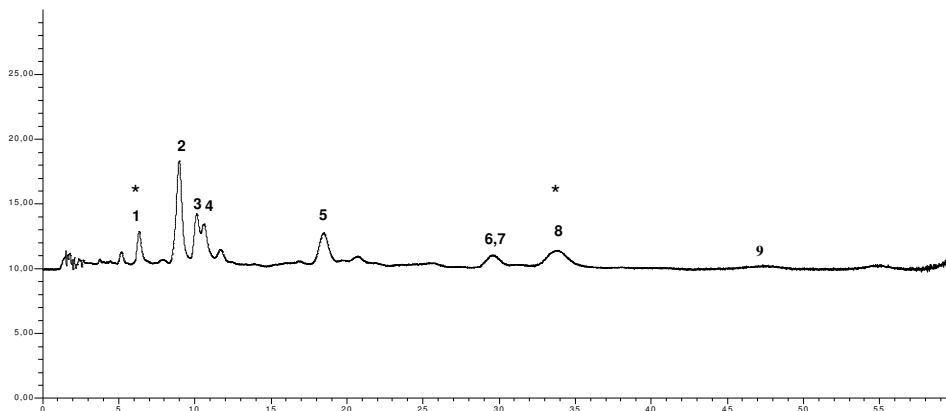


Figure 1: Chromatographic profile of butanolic fraction from *P. edulis* leaves. Peaks: **1** and **8**: unknown components. **2**: vicenin-2. **3**: 6,8-di-*C*-glycosylchrysin. **4**: spinosin. **5**: isoorientin. **6** and **7**: isovitexin and orientin. **9**: vitexin. For chromatographic conditions see Material and Methods.

In order to isolate these components by HSCCC, several two-phase solvent systems were tested including CHCl_3 : MeOH: IsPr: H_2O (9:12:1:8, v/v/v), CHCl_3 : MeOH: H_2O (46:25:29, v/v/v) and AcOEt: BuOH: MeOH: H_2O (35:10:11:44, v/v/v/v) and AcOEt: *n*-BuOH: H_2O (2:1:3, v/v/v). The first three solvent systems were not suitable for HSCCC separation because most components of the butanolic fraction are distributed only in the upper phase. On the other hand, the solvent system of AcOEt: *n*-BuOH: H_2O at a ratio of 2:1:3 was found to be satisfactory for the separation of these glycosyl flavonoids. TLC analysis showed that the mainly di-*C*-glycosyl flavonoids were retained in the lower phase and the monoglycosyl flavonoids showed affinity to the upper phase. The selected solvent system was used in the HSCCC in normal phase, being the lower phase as stationary phase.

As result, using these conditions were obtained two main partially purified fractions (fractions **I** and **II**) from 1.5 g butanolic fraction and the separation time was

7 hours. The retention of the stationary phase was 63 %. HPLC analysis was used to determine the purities of these two fractions obtained by HSCCC, as shown in figures 2a and 3a. The results indicated that the fraction **I** consists of only one major compound ($rt= 28.5$ min) with purity of 79 %. This compound corresponds to peak **8** of the chromatogram of the butanolic fraction (figure 1). Therefore, fraction **I** was purified, resulting in 46 mg of a unknown compound (compound **8**) (figure 2b), with a purity of 87 %.

Fraction **II** (figure 3a) contains the C-glycosylflavone isoorientin ($rt= 16.5$ min), as the major compound, with purity of 75 %. Fraction **II** was purified, yielding 30 mg of isoorientin (purity of 93 %), identified by co-injection with authentic sample and comparison of UV spectra.

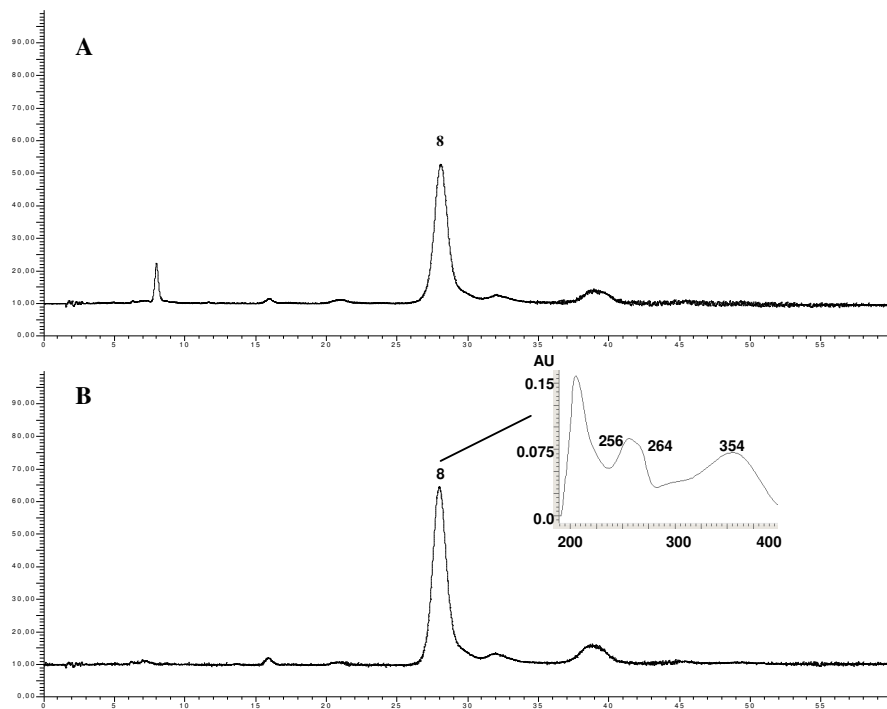


Figure 2: Chromatogram of fraction I (A) and compound 8 (B). For chromatographic conditions see Material and Methods.

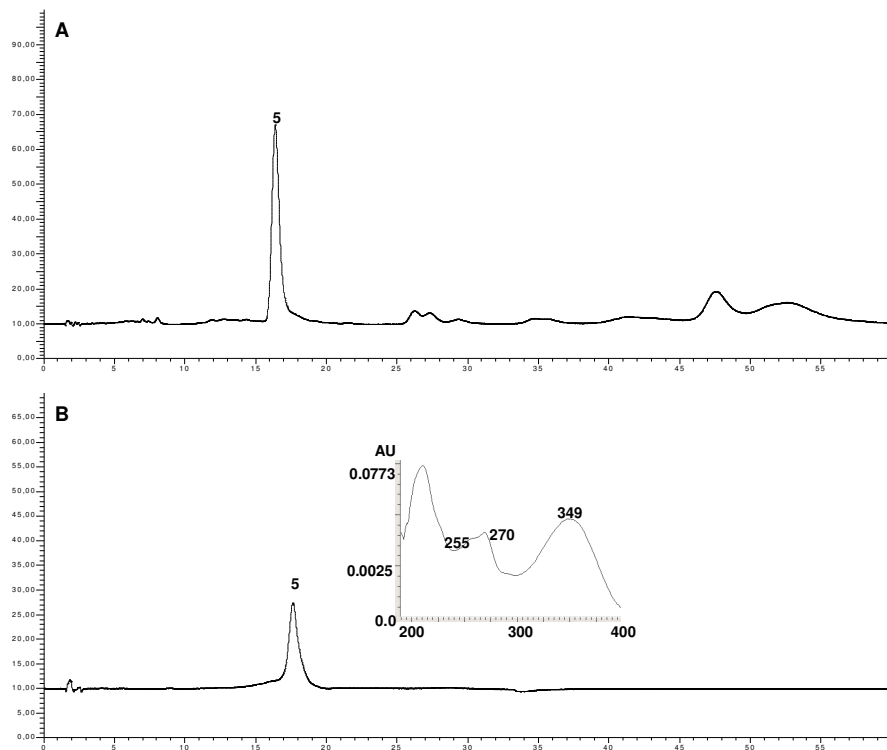


Figure 3: Chromatogram of fraction II (A) and compound 5 (B). For chromatographic conditions see Material and Methods.

In this method, di-*C*-glycosyl flavonoids were retained in the stationary phase (fraction **III**) (figure 4). The peaks **2**, **3** and **4** (figure 4) were previously identified as vicenin-2 ($rt= 8.0$ min), 6,8 di-*C*-glycosylchrysin ($rt= 9.5$ min) and spinosin ($rt= 10.2$ min), respectively (Zucolotto et al., 2009). In addition, the fraction **III** showed an unknown component ($rt= 5.5$ min) (peak **1**, figure 4). The chromatographic characteristics by TLC and HPLC suggest that the compound **1** is the most polar component in butanolic fraction from *P. edulis* leaves. It showed UV maxima absorption similar to luteolin derivatives.

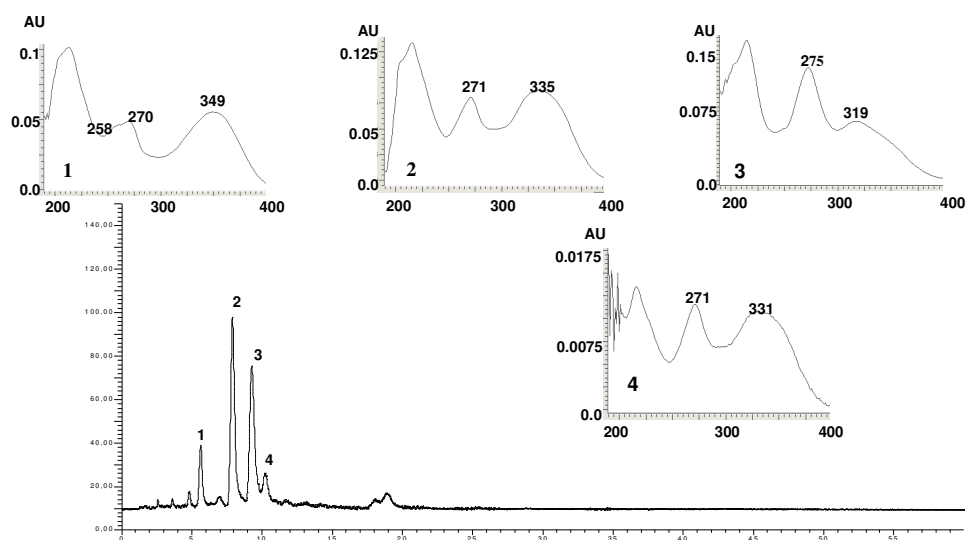


Figure 4: Chromatogram of fraction **III**. For chromatographic conditions see Material and Methods.

In order to obtain the unknown component (**1**) from fraction **III**, it was submitted to preparative HPLC. However, it was obtained in low quantity, since it is a minor component from fraction **III**. Then, preliminary HSCCC experiment was carried out to obtain more purified fractions containing the same compound **1**. As this compound is the most polar component from the butanolic fraction, we decided to separate it with another procedure, using the lower phase as mobile phase. As result, two partially purified fractions (**IV** and **V**) containing compound **1** as the only

major peak were obtained. The chromatogram of one of these fractions (**IV**) (purity of 88%) is shown in figure 5a. The fractions (**IV** and **V**) were purified, yielding the compound **1** (figure 5b), with purity of 89 %.

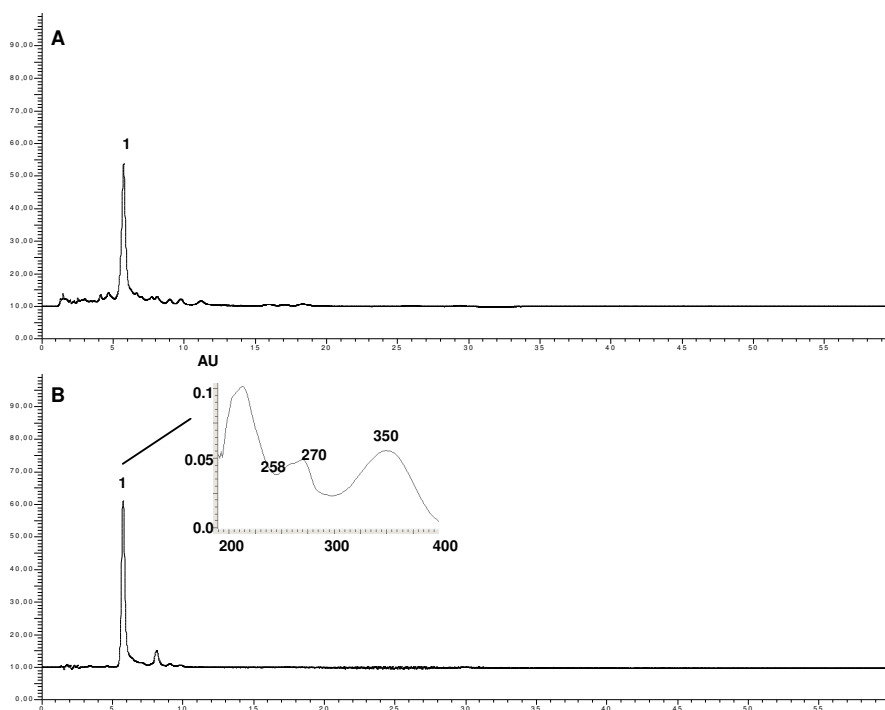


Figure 5: Chromatogram of fraction IV and compound 1. For chromatographic conditions see Material and Methods.

Conclusion

In conclusion, an HSCCC method for the preparative separation of glycosyl flavonoids from *P. edulis* var. *flavicarpa* leaves was developed. The HSCCC procedure using chromatographic conditions in normal phase (lower phase as stationary phase), allowed the obtention of the two main components, 46 mg of an one unknown compound (compound **8**) and 30 mg of the *C*-glycosylflavone isoorientin. In addition, using this method, di-*C*-glycosyl flavonoids, as vicerin-2, 6,8-di-*C*-glycosylchrysin, spinosin and an unknown component (compound **1**) were retained in stationary phase. Then, using the lower phase as mobile phase to

separate the retained compounds in stationary phase, it was possible to obtain purified fraction of compound **1**. HSCCC analysis showed a powerful technique for preparative separation and purification of glycosyl flavonoids from leaves of *P. edulis* extract.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

ALMEIDA, R. R.; RAIMUNDO, J. M.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C. R.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, p. 109-113, 2006.

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

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; DE LIMA, T.C.M. 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. 1067-1073, 2006.

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

FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed., São Paulo: Andrei, p. 839-840, 1976.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. 2009 *in press*.

ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Journal of Chromatographic Science*, v. 8, p. 315-322, 1970.

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 counter-current chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochemical Analysis*, v. 14, p. 96-99, 2003.

ORSINI, F.; VEROTTA, L. Separation of natural polar substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography, centrifugal thin-layer chromatography and droplet counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 349, p. 69-75, 1985.

KREEN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; PETR, U.; KOPP, B. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift Naturforsch*, v. 58c, p. 11-16, 2003.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 45, 2006.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 5v , 1978.

PAN, Y.; LU, Y. Recent progress in countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 30, p. 649- 679, 2007.

PAULI, G. F.; PRO, S. M.; FRIESEN, J. B. Countercurrent separation of natural products. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1489-1508, 2008.

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. 111-115, 2005.

SACCO, J. C. Passifloráceas. In: Reitz, R (Ed). *Flora Illustrada Catarinense*, fasc. PASS. Itajaí, 1980, 132p.

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

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

ZUCOLOTTO, S.M.; GOULART, S.; MONTANHER, A.; REGINATTO, F. H., SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Biassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica*, 75, p. 1221-6, 2009.

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.

DISCUSSÃO GERAL

Através de uma busca na literatura é possível constatar que há um número expressivo de trabalhos científicos com espécies de *Passiflora*. Esses estudos são realizados por diversos grupos de pesquisa do mundo e, inclusive foram muitos desses trabalhos realizados no Brasil. No entanto, até o presente momento, ainda não existe nenhum extrato padronizado e não se sabe quais os compostos são responsáveis pelas atividades farmacológicas relatadas para as espécies de *Passiflora*. A maior parte dos estudos com as espécies de *Passiflora* foi conduzida com *P. edulis* (var. *edulis* e var. *flavicarpa*), *P. alata* e, especialmente, com a espécie *P. incarnata*. As espécies de *Passiflora*, conhecidas no Brasil, como maracujás, são amplamente utilizadas para a preparação de sucos e o uso do chá de suas folhas, principalmente como remédio calmante e tranqüilizante, é amplamente difundido. Também é descrito o uso de espécies de *Passiflora* para o tratamento de problemas inflamatórios e como diuréticas. Especificamente *P. edulis* var. *flavicarpa* (maracujá amarelo), é uma espécie amplamente cultivada no país e o Brasil é o primeiro produtor mundial de maracujá amarelo. Neste contexto, faz-se necessário aprofundar os estudos químicos e farmacológicos com a espécie.

Na primeira parte deste trabalho foi proposto um fracionamento biomonitorado para caracterizar os compostos envolvidos na resposta inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis*, já descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (MONTANHER et al., 2007; BENINCÁ et al., 2007). Foi avaliada a atividade anti-inflamatória da fração butanólica (50 e 100 mg/Kg, i.p.) das folhas de *P. edulis*, rica em flavonóides do tipo C glicosilados, no modelo de pleurisia induzida por carragenina. A fração apresentou um significativo percentual de inibição do influxo de leucócitos do tipo polimorfonucleares no sítio da inflamação. Em continuidade, a partir da sub-fração mais ativa (sub-fração C) (perfil cromatográfico

na sub-fração C por CCD está apresentado na figura 24), foram obtidas três *C*-glicosilflavonas, isoorientina, vicenina-2 e spinosina (CCD da sub-fração C e dos compostos isolados está apresentada na figura 25). Da sub-fração C, também foi isolado o composto crisina 6,8-di-*C*-glicopiranosídeo, no entanto, em função da quantidade obtida, não foi possível avaliar a atividade anti-inflamatória. Todos compostos (25 mg/Kg, i.p.) inibiram o influxo de leucócitos devido a inibição de polimorfonucleares. Adicionalmente, a fração butanólica, a sub-fração C e o composto isoorientina inibiram a atividade da enzima MPO, considerada um marcador direto do influxo de neutrófilos ativados. Na figura 26 está representado um esquema com o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso, frações e compostos isolados das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, no modelo de pleurisia induzida por carragenina, dos resultados obtidos anteriormente (MONTANHER et al., 2007) e os resultados obtidos no presente trabalho (ZUCOLOTTO et al., 2009).

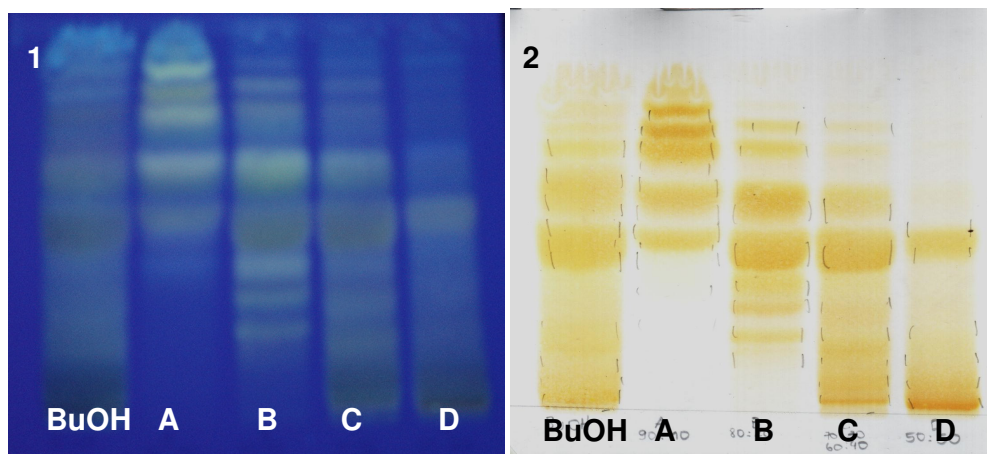


Figura 24: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* e das sub-frações A- D.

Fase móvel: AcOEt: CH₂O₂: H₂O (80:10:10; v/v/v);

Adorvente: Gel de sílica 60 F 254

Revelador: Reagente Natural 1%

1: UV 366 nm/ 2: visível

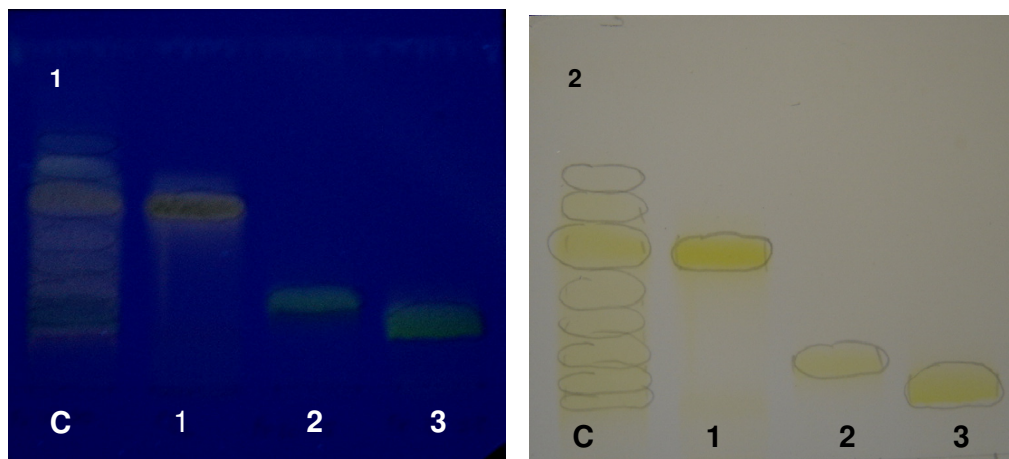


Figura 25: Cromatografia em camada delgada da sub-fração C das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* e dos compostos isolados. 1= isoorientina. 2= spinosina. 3= vicenina-2. Fase móvel: AcOEt: CH₂O₂: H₂O (80:10:10; v/v/v); Adorvente: Gel de sílica 60 F 254 Revelador: Reagente Natural 1% 1: UV 366 nm/ 2: visível

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que os flavonóides do tipo C glicosilados estão, pelo menos em parte, envolvidos na resposta inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis*. É bem estabelecido na literatura que os flavonóides atuam como agentes anti-inflamatórios, em vários modelos de inflamação (por exemplo: ROTELLI et al., 2003; UEDA; YAMAZAKI; YAMAZAKI, 2004; TAKANO-ISHIKAWA; GOTO; YAMAKI, 2006). Esses estudos mostram que alguns flavonóides, de acordo com as características estruturais, modulam as atividades de enzimas envolvidas no processo inflamatório, como a fosfolipase A2, ciclooxigenases 1 e 2, lipooxigenase e óxido nítrico sintase, inibindo a produção de importantes mediadores da resposta inflamatória, como ácido araquidônico, prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico.

Especificamente em relação a flavonóides do tipo C glicosilados, também foram encontrados trabalhos que relatam atividade anti-inflamatória para isoorientina (KUEPELI et al., 2004; ODONTUYA et al., 2005) e vicenina-2 (RÍOS et al., 1990), componentes majoritários do extrato das folhas de *P. edulis*. Em ambos estudos, a

administração foi via oral, diferentemente do estudo conduzido pelo nosso grupo. Embora sejam modelos de inflamação diferentes, esses resultados são importantes, porque demonstram que isoorientina e vicenina-2, por tratamento via oral, mantêm a atividade. Também foram encontrados relatos de atividade anti-inflamatória para as C-glicosilflavonas spinosina (RÍOS et al., 1990), vitexina (MELO et al., 2005) e isovitexina (LIN et al., 2005; HUANG et al., 2005).

O uso de espécies de *Passiflora* como anti-inflamatório não é tão difundido popularmente como o uso dessas espécies como remédio calmante e tranqüilizante. No entanto, nossos resultados, obtidos com o infuso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* justificam os relatos populares do uso de espécies de *Passiflora* no tratamento de problemas inflamatórios, no entanto, ainda faz-se necessário a avaliação da atividade anti-inflamatória por administração via oral.

As investigações químico-farmacológicas da segunda parte deste trabalho, seguiram sobre a avaliação de possíveis ações neurofarmacológicas do extrato aquoso do pericarpo de *P. edulis* var. *flavicarpa*. As atividades relacionadas ao sistema nervoso central, especialmente atividade tipo ansiolítica e sedativa de espécies de *Passiflora*, são extensamente discutidas na literatura. No entanto, todos estudos relatados, com exceção de um relato ainda da década de 70, que avaliou a atividade do suco (LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975), foram conduzidos com extratos preparados a partir das folhas e/ou partes aéreas e não há um consenso sobre os componentes responsáveis pela ações neurofarmacológicas.

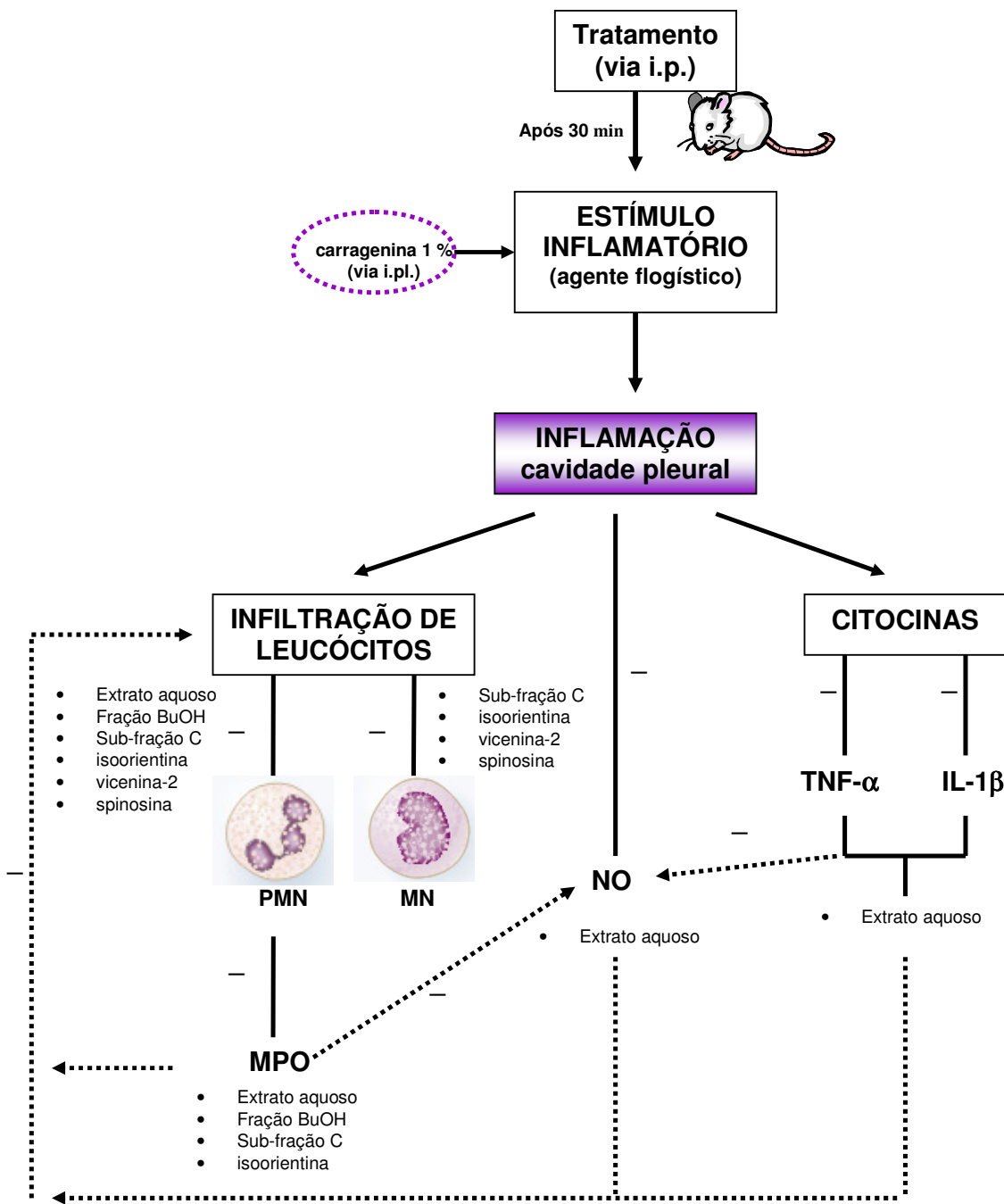


Figura 26: Mecanismo antiinflamatório proposto para o extrato aquoso, sub-frações e compostos isolados das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* (Montanher et al., 2007; Zucolotto et al., 2007), no modelo de pleurisia induzida por carragenina.

PMN= leucócitos polimorfonucleares. MN= leucócitos mononucleares. MPO= mieloperoxidase. NO= óxido nítrico. TNF- α = fator de necrose tumoral alfa. IL-1 β = interleucina 1 beta. (-)= efeito inibitório. Administração via i.p.

Dentro deste contexto, por meio de uma triagem prévia com extratos preparados a partir de diferentes partes da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*, foi selecionado o extrato aquoso do pericarpo para dar continuidade aos estudos das atividades neurofarmacológicas, utilizando um fracionamento biomonitorado. Os resultados mostraram que o tratamento com o extrato aquoso do pericarpo (100 e 300 mg/kg, v.o.), aumentou significativamente o tempo total de permanência dos animais no compartimento claro, no modelo de transição claro-escuro, sugerindo uma atividade tipo ansiolítica. O mesmo tratamento diminuiu significativamente, em ambas as doses, o tempo de latência para o início do sono induzido por éter etílico e um aumento do tempo total de sono, indicando uma atividade sedativa. Em continuidade, foi observado que a fração butanólica do pericarpo, enriquecida em flavonóides do tipo C-glicosídeos apresentou atividade mais significativa quando comparada a fração residual aquosa (SENA et al., 2009).

A fração butanólica do pericarpo da variedade *flavicarpa* apresentou isoorientina, como composto majoritário, seguido das di-C-glicosilflavonas, vicenina-2, crisina 6,8-di-C-glicopiranosídeo e spinosina. Como já citado anteriormente, até o presente momento, há muitas controvérsias sobre os compostos responsáveis pelas ações neurofarmacológicas das espécies de *Passiflora*. Alguns trabalhos têm correlacionado as atividades do tipo ansiolítica e sedativa dos extratos de *Passiflora* à presença de flavonóides do tipo C glicosilados. De-Paris e colaboradores (2002) observaram uma correlação positiva entre os flavonóides vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina e as ações psicofarmacológicas do extrato das folhas da espécie *P. edulis*. Coleta e colaboradores (2001) mostraram, seguindo um fracionamento biomonitorado, que o extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *edulis*, uma fração enriquecida em flavonóides e o composto luteolina 7-0-2-

ramnosilglicopiranosídeo, administrados via oral, apresentam efeito tipo ansiolítico. Santos e colaboradores (2006) também observaram que o extrato aquoso e metanólico das folhas de *P. actinia* e frações contendo isovitexina apresentam atividade do tipo ansiolítica e sedativa. No entanto, estudos anteriores não observaram atividades relacionadas ao sistema nervoso central para os compostos vitexina e isovitexina (SPERONI, MINGUETTI, 1988) e posteriormente, para orientina foram observados somente efeitos ansiolíticos moderados (OKUYAMA et al., 1996).

O pericarpo dos frutos de maracujá representa cerca de 60-70% do peso do fruto e o Brasil é o maior produtor mundial de suco de maracujá. Embora não exista embasamento popular no uso do pericarpo de espécies de *Passiflora* como remédio calmante e tranquilizante, encontrar uso para o pericarpo dos frutos, que é considerado um resíduo pode apresentar importante impacto tanto econômico quanto ambiental (OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, a parte da importância científica é destacada pela relevância econômica e social, em vista de tratar-se de uma espécie amplamente cultivada em todo o Brasil. Dessa forma, a existência de cultivo extensivo com vistas à produção para a indústria de alimentos, faz com que exista um ciclo de produção da matéria-prima, o que favoreceria o desenvolvimento de um fitoterápico.

Cabe destacar, que a análise do perfil cromatográfico da fração butanólica das folhas e do pericarpo da variedade *flavicarpa* por CCD e por CLAE, mostrou que ambas frações apresentaram perfil cromatográfico semelhante referente a presença de flavonóides C-glicosídeos. Esta é a primeira vez que foi relatada a presença desses compostos no pericarpo da variedade *flavicarpa*.

Os resultados obtidos no capítulo 2 e 3 deste trabalho contribuem para o conhecimento químico e farmacológico de uma espécie amplamente cultivada para a produção de suco no país e o seu uso popular bastante difundido como remédio calmante e tranqüilizante. No entanto, a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* ainda carece de embasamento científico, embora muitas preparações farmacêuticas contenham extratos de suas folhas e/ou partes aéreas como componente ativo.

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 e em outros países da América do Sul. A flora colombiana é uma das mais diversificadas em espécies de *Passiflora* (ESCOBAR, 1988). Há registros de 141 espécies no país (HERNÁNDEZ, BERNAL, 2000), no entanto, os estudos químicos e farmacológicos com essas espécies são muito escassos. Dessa maneira, a realização de estágio doutoral no exterior, permitiu o início dos estudos químicos associados a estudos farmacológicos com espécies colombianas de *Passiflora*.

Como primeira parte do trabalho desenvolvido no estágio doutoral no exterior, foi realizado um estudo comparativo do perfil cromatográfico das folhas e do pericarpo por CLAE, referente à presença de flavonóides do tipo C glicosilados de espécies cultivadas na Colômbia: *P. tripartita* var. *mollissima*, *P. edulis* var. *edulis*, *P. liguralis*, *P. quadrangularis* e *P. manicata*. O perfil cromatográfico das espécies colombianas foram comparados com as espécies, *P. edulis* var. *flavicarpa* e *P. alata*, originárias do Brasil.

Foi observada nas folhas e nos frutos, de todas as espécies de *Passiflora*, a presença de flavonóides glicosilados (CCD das frações butanólicas das folhas e dos

frutos- figura 27 e 28). Os flavonóides *C*-glicosídeos mais comumente identificados em um maior número de espécies foram isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina.

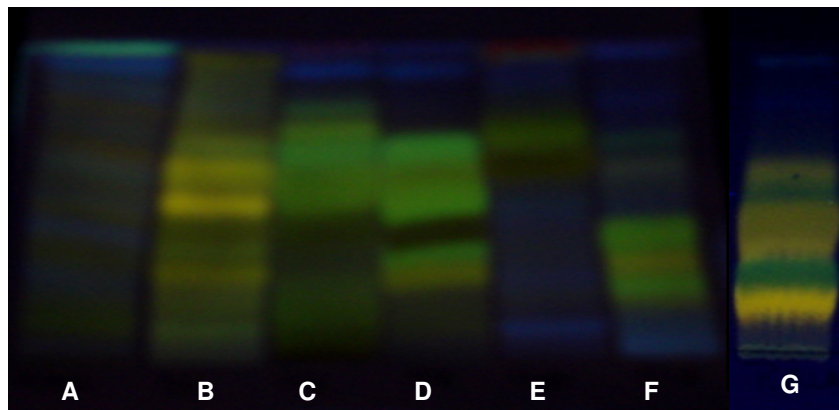


Figura 27: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de espécies de *Passiflora*.

A= *P.edulis* var. *flavicarpa* (amostra coletada no Brasil). **B=** *P. edulis* var. *edulis*. **C=** *P. tripartita* var. *mollissima*. **D=** *P. manicata*. **E=** *P. ligularis*. **F=** *P. quadrangularis*. **G=** *P. alata*. Adsovente: gel de sílica F₂₅₄. Fase móvel: AcOEt: CH₂O₂: H₂O (8:1:1, v/v/v). Revelador: Reagente Natural A 1%. UV: 366 nm.

De todas as espécies, *P. tripartita* foi a espécie que apresentou maior diversidade referente à presença de flavonóides glicosilados tanto nas folhas, como no pericarpo (CCD da fração butanólica das folhas de *P. tripartita*- figura 27C e do pericarpo dos frutos-figura 28A), muitos com características de flavonóides do tipo di e triglicosilados. A caracterização química dessa espécie é de suma importância, visto que, recentemente foi aprovado um produto a base do extrato das folhas de *P. tripartita*, como sedativo e hipnótico, pela Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos da Colômbia (INVIMA, 2005). Este estudo pode contribuir para a caracterização de extrativos vegetais a base de *P. tripartita*, visto que até o presente momento, há na literatura somente um estudo que relata os compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos frutos da espécie (FROEHLICH et al., 2009).

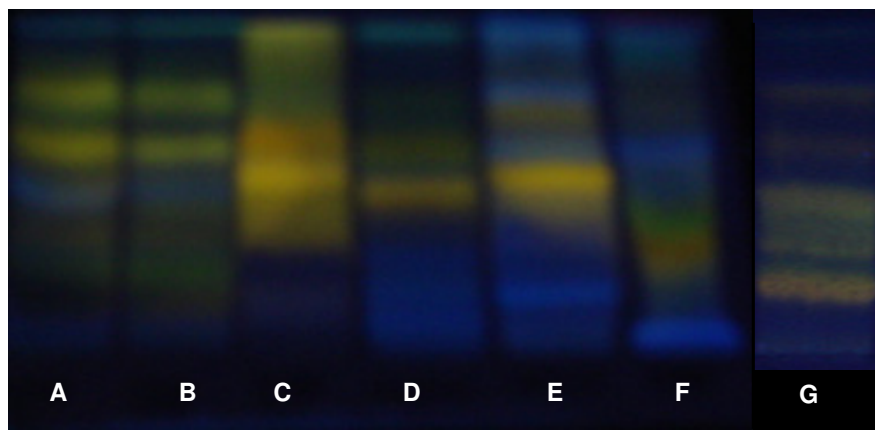


Figura 28: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH do pericarpo de espécies de *Passiflora*. **A**= *P. tripartita* var. *mollissima* (**curuba**). **B**= *P. tripartita* var. *mollissima* (amostra comercial) (**curuba**). **C**= *P. edulis* var. *edulis* (**gulupa**). **D**= *P. ligularis* (**granadilla**). **E**= *P. edulis* var. *flavircarpa* (**maracujá-amarelo**). **F**= *P. quadrangularis* (**badea**). **G**= *P. alata* (**maracujá-doce**). Fase móvel: AcOEt: acetona: HAc: H₂O (6:2:1:1, v/v/v). Revelador: Reagente Natural A 1%. UV: 366 nm.

A espécie *P. manicata* também mostrou-se ser rica em flavonóides glicosilados (CCD da fração butanólica das folhas de *P. manicata*- figura 27D). No entanto, essa espécie não tem importância econômica, já que não possui frutos comestíveis. Além disso, há relatos sobre a planta ser tóxica, com efeitos alucinógenos, por isso também chamada de “diablito”.

As espécies *P. quadrangularis* e *P. ligularis* foram as espécies que apresentaram perfil cromatográfico mais simples referente à presença de flavonóides glicosilados, tanto nas folhas, como no pericarpo. Embora, por CCD, tenham sido observados compostos com características de flavonóides (CCD da fração butanólica das folhas e do pericarpo de ambas espécies- figura 27,28), por CLAE, utilizando o sistema comum de análise para todas espécies, não foi possível detectar esses compostos nas folhas e no pericarpo. Já para *P. quadrangularis*, foi observada a presença de dois compostos majoritários nas folhas, mas que não foram identificados por comparação com as substâncias utilizadas no estudo. No

pericarpo também não foi possível identificar os flavonóides observados. *P. ligularis* é amplamente consumida na Colômbia, já *P. quadrangularis*, embora seja conhecida em âmbito nacional, é mais comercializada e consumida em alguns locais da Colômbia, de clima quente.

Outro resultado de relevada importância observado nesse estudo foi a comparação dos perfis cromatográficos das variedades de *P. edulis* (var. *flavicarpa* e var. *edulis*). Ambas variedades apresentaram perfis cromatográficos das folhas e do pericarpo diferentes, o que justifica a importância de especificar a variedade, em trabalhos científicos. Em alguns trabalhos na literatura, o nome da espécie em estudo, é citado erroneamente de forma incompleta somente como *P. edulis* ou algumas vezes, utiliza-se *P. edulis* Sims, para a variedade *flavicarpa*. No entanto, é importante distinguir-las pelo nome científico correto ou pela coloração do fruto, já que os resultados obtidos com a variedade *flavicarpa*, não podem ser extrapolados para a variedade *edulis*.

P. alata não apresentou perfil complexo de flavonóides glicosilados nas folhas e no pericarpo e foi observada a presença de vitexina 2"-O-ramnosídeo, como composto majoritário das folhas. Por outro lado, no pericarpo não foram identificados os flavonóides observados nas folhas. Trabalhos prévios têm demonstrado que essa espécie é rica em saponinas (REGINATTO et al., 2001, 2004).

Os resultados obtidos são importantes, já que representam uma caracterização química prévia de espécies de *Passiflora* nativas da América do Sul, contribuindo para a caracterização de extrativos vegetais que contenham essas espécies de *Passiflora* como componentes ativos.

A segunda parte do trabalho desenvolvido no estágio no exterior, foi o uso da técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade para o isolamento

de flavonóides glicosilados da espécie *P. edulis* var. *flavicarpa*. Segundo relatos encontrados na literatura (por exemplo: PENG et al., 2005; ZHOU et al., 2005), a técnica de HSCCC é uma excelente ferramenta para a obtenção de flavonóides do tipo *C* glicosilados, em quantidades favoráveis, em poucas horas de análise.

A experiência de purificação desses compostos em nosso laboratório, de diferentes espécies vegetais, demonstra que, por técnicas convencionais, geralmente é um processo que requer muito tempo de análise para a obtenção de pequenas quantidades dos compostos puros, geralmente inferiores a 50 mg. Dessa forma, é importante encontrar técnicas eficazes para a obtenção rápida desses compostos e, em quantidades suficientes para a realização de ensaios farmacológicos.

O método proposto, utilizando ACOEt: *n*-BuOH: H₂O (2:1:3, v/v/v), como sistema de solvente e a fase inferior como fase estacionária (análise em fase normal) favoreceu a obtenção rápida de dois compostos, um flavonóide (composto **8**) (CCD do composto 8- figura 29), ainda não identificado, em maior quantidade e a *C*-glicosilflavona isoorientina, a partir das fração butanólica das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Além disso, a técnica possibilitou a retenção dos componentes mais polares da fração (componentes diglicosilados), na fase estacionária, na qual foi possível purificar pequena quantidade do composto denominado **1** (CCD do composto 1-figura 30). Para tentar recuperar os compostos retidos na fase estacionária, ao invés de utilizar métodos convencionais (como por exemplo, o uso de nitrogênio gasoso), foi realizado um novo procedimento por HSCCC, no entanto, foram invertidas as condições cromatográficas e a fase inferior foi utilizada como fase móvel, resultando na obtenção de duas frações enriquecidas (CCD das frações obtidas por HSCC- figura 31) no composto mais polar da fração butanólica das

folhas de *P. edulis* (composto **1**), posteriormente purificado por cromatografia em coluna. A estrutura desse composto ainda não foi elucidada, mas os dados do espectro de UV sugerem um composto com núcleo básico do tipo luteolina.

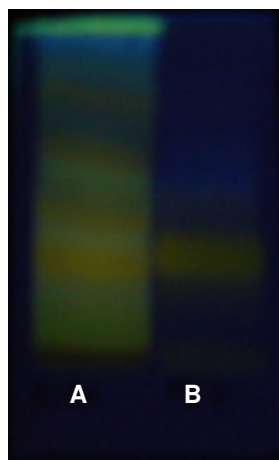


Figura 29: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* (**A**) e do composto **8** (**B**). Fase móvel: AcOEt: CH₂O₂: H₂O (8:1:1, v/v/v). Revelador: Reagente Natural A 1%. UV: 366 nm.

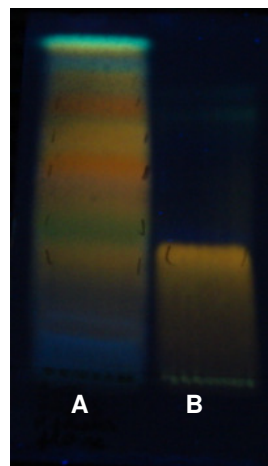


Figura 30: Cromatografia em camada delgada da fração BuOH das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* (**A**) e do composto **1** (**B**). Fase móvel: AcOEt: acetona: HAc: H₂O (6:2:1:1, v/v/v). Revelador: Reagente Natural A 1%. UV: 366 nm.

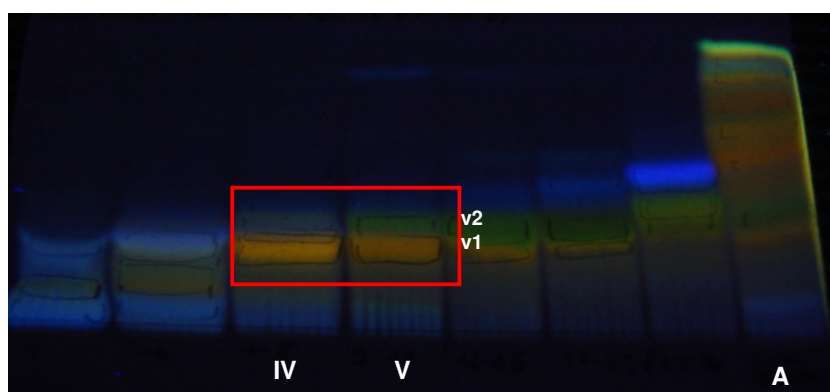


Figura 31: Cromatografia em camada delgada das sub-frações obtidas por Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade da fração BuOH (em fase reversa) das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*.

IV= Sub-fração **IV**. **V**= Sub-fração **V** (**V1**= composto **1**. **V2**= vicenina-2). Em destaque, composto **1** de coloração alaranjada.

A= fração BuOH das folhas.

Fase móvel: AcOEt: acetona: HAc: H₂O (6:2:1:1, v/v/v).

Revelador: Reagente Natural A 1%. UV: 366 nm.

CONCLUSÕES

Em relação ao estudo biomonitorado para caracterizar os compostos envolvidos na atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, pelo modelo de pleurisia, em camundongos, pode-se concluir que:

- A atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa* está relacionada, pelo menos em parte, pela presença de flavonóides C-glicosídeos, já que a fração butanólica, rica em flavonóides C-glicosídeos apresentou significante percentual de inibição do influxo de leucócitos do tipo polimorfonucleares para o local da inflamação e a partir da sub-fração mais ativa, foram obtidas as C-glicosilflavonas, isoorientina, vicenina-2 e spinosina, que também apresentaram significante atividade anti-inflamatória.

De forma semelhante que os resultados obtidos com a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, na avaliação da composição química e das atividades psicofarmacológicas do extrato aquoso do pericarpo da var. *flavicarpa*, pode-se concluir que:

- A atividade tipo-ansiolítica e sedativa do extrato aquoso do pericarpo pode estar relacionada à presença de flavonóides C-glicosídeos identificados nesse extrato;
- O pericarpo apresentou perfil cromatográfico semelhante às folhas, sendo identificado o composto isoorientina, como composto majoritário.

Os resultados obtidos com a análise cromatográfica comparativa por CLAE-DAD, entre as espécies de *Passiflora* da América do Sul, em relação à presença de flavonóides C-glicosídeos, permitem concluir que:

- Foi observada a presença desses compostos nas folhas e no pericarpo de todas as espécies de *Passiflora*, com diferentes perfis cromatográficos e

diferentes compostos majoritários. Entre as espécies colombianas, *P. tripartita* var. *mollissima* destacou-se por apresentar o extrato com maior diversidade de flavonóides glicosilados.

Em relação ao uso da técnica de CCC para a purificação dos flavonóides *C*-glicosídeos das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*, pode-se concluir que:

- A técnica de CCC permitiu a obtenção de dois flavonóides ainda não identificados (denominados compostos 1 e 8) e da *C*-glicosilflavona isoorientina, demonstrando ser um método eficaz, rápido e com baixo custo para a purificação de flavonóides glicosilados das folhas de *P. edulis* var. *flavicarpa*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R. F. Fitoterapia baseada em evidências: Exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina. Florianópolis: Programa de Pos-Graduação em Farmácia da UFSC, 2004, 412p. (Dissertação de Mestrado).
- ALMEIDA, R. R.; RAIMUNDO, J. M.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C.; GATTASS, C. R.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, p. 109-113, 2006.
- ALVES, A.L.; RIBEIRO, F.A.Q. O papel das citocinas na colesteatoma adquirido da orelha média: Revisão da literatura. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, p. 813-818, 2004.
- ARBELAEZ, E. P. Plantas utiles de Colombia (5 ed). Bogotá: Fondo Fen. Colombia. Dama Jardín Botanico José Celestino Mutis, 1996.
- ASTURIZAGA, A. S.; OLLGAARD, B.; BALSLEV, H. Frutos comestibles. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, p.329-346, 2009.
- BARKSBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 149, n.2, p. 217-225, 2007.
- BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHEKEL, E.P.; FRODE, T. S. Evaluation of anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1097-1105, 2007.
- BERNAL, J. A.; DÍAZ, C. A. Tecnología para el cultivo de la curuba. Manual Técnico 6. Rio Negro: CORPOICA, 2005.
- BIRK, C. D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, E. P.; SCHENKEL, E. P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, p. 2285-2291, 2005.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDEBERG, A.; BRINCKMANN, J. Herbal Medicine: Expanded Commission E monographs. Austin: American Botanical Council, 2000, p.293-296.
- BOMBARDELLI, E.; BONATTI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G. Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 12, 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.
- BORSINI, F.; LECCI, A.; VOLTERRA, G.; MELI, A. A model to measure anticipatory anxiety in mice? *Psychopharmacology*, v. 98, p. 207-211, 1989.

- BUJAK, M.; FRANGOGIANNIS, N. G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2009 *in press*.
- BOZKURT, B.; MANN, D. L.; DESWAL, A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 2009 *in press*.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution à l'étude pharmacognostique de la Passiflore. *Journal de Pharmacie de Belgique*, v. 39, p. 15-22, 1984 apud ESCOP. *Passiflorae herba: Monographs on the medicinal uses of plant drugs, Fascicule 4*. Exeter, UK, p. 1-5, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Extratificação do Consumo de Frutas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 25 ago. 2009.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. RDC nº 48/2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>>>. Acesso em: 15 ago. 2009.
- 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.
- CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria*, v. 45, p. 1-92, 1997.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 3817-3820, 1996.
- CHAU, C. F., HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, p. 786-790, 2005.
- CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 757-759, 1998
- CHRISTENSEN, J.; JAROSZEWSKI, J. W. Natural glycosides containing allopyranose from the passion fruit and circular dichroism of benzaldehyde cyanohydrin glycosides. *Organic Letters*, v. 3, n. 14, p. 2193-2195, 2001.
- COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; DE LIMA, T.C.M. 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. 1067-1073, 2006.
- CONE, J. B. Inflammation. *The American Journal of Surgery*, v. 182, p. 558-562, 2001.

- CONGORA, C.; PROLIAC, A.; RAYNAUD, J. Isolation and identification of two mono-C-glucosylluteolins and of the di-C-substituted 6,8-diglucosylluteolin from the leafy stalks of *Passiflora incarnata*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 69, n. 1, p. 251-253, 1986.
- CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZIS-NETO, G., DE FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.
- COSTA A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3.v, 3 ed., 1977.
- DA CUNHA, F.M.; FRODE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL, V.; YUNES, R.; CALIXTO, J.B. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sciences*, v. 70, p. 159-169, 2001.
- DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 299-306, 2002.
- DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transplant Immunology*, v. 12, p. 151-157, 2004.
- DE KEYSER, F.; BAETEN, D.; VAN DEN BOSCH, F.; KRUIHOF, E.; VERBRUGGEN, G.; MIELANTS, H.; VEYS, E.. Structure-modifying capacity of anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in ankylosing spondylitis. *Drug*, v. 64, p. 2793-2811, 2004.
- DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINSKI; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.
- DEUTSCHES Arzneibuch. 10 ed. Ausgabe. Stuttgart: Govi, 1v, 1992.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *Passiflora edulis*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 698-702, 2001.
- DUBANT, S.; MATHEWS, B.; HIGGINSON, P.; CROOK, R.; SNOWDEN, M.; MITCHELL, J. Practical solvent system selection for counter-current separation of pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 1207, p. 190-192, 2008.
- ESCOBAR, L. A. Passifloraceae. In: PINTO, P.; LOZANO, G. (eds). Flora de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1988.

- FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, A.B.; JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clinica Chimica Acta*, v. 396, n. 1-2, p. 23-25, 2008.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed., São Paulo: Andrei, p. 839-840, 1976.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. 2009 *in press*.
- FRÖDE -SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Analysis of the inflammatory response induced by substance P in the mouse pleural cavity. *Peptides*, v. 20, p. 259-265, 1999.
- FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators of Inflammation*, v. 10, n. 4, p. 223-227, 2001.
- FRÖDE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B.. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 17, p. 149-156, 2002.
- FROHLICH, O.; DUQUE, C.; SHREIER, P. Volatile constituents of curuba (*Passiflora mollissima*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, p. 421-425, 1989.
- Fruits from America. [http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits from americas/frutales](http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales). Acesso em 23 de maio de 2009.
- 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, n. 16, p. 2513-2523, 2001.
- HASKÓ, G.; PACHER, P.; DEITCH, E.A.; VIZI, E.S. Shaping of monocytes and macrophages function by adenosine receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 113, n. 2, p. 264-275, 2007.
- HERNÁNDEZ, A.; BERNAL, R. Lista de espécies de *Passifloraceae* de Colombia. *Biota Colombiana*, v. 1, n. 3, p. 320-335, 2000.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; NAKANISHI, K. Droplet counter-current chromatography for the preparative isolation of various glycosides. *Journal of Chromatography*, v. 170, p. 355-361, 1979.
- HUANG, S.T.; CHEN, C.T.; CHIENG, K. T.; HUANG, S. H.; CHIANG, B. H.; WANG, L. F.; WANG, L. F.; KUO, H. S.; LIN, C. M. Inhibitory effect of a rice hull constituent on tumor necrosis factor α , prostaglandin E2 and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1042, p. 387-395, 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, n. 3, p. 718-721, 2006.
- INVIMA, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Disponível <<http://www.invima.gov.co/Invima//normatividad/farmaceuticas.jsp?codigo=190>>. Acesso em: 29 maio 2009.
- ITO, Y.; BOWMAN, R. L. Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Journal of Chromatographic Science*, v. 8, p. 315-322, 1970.
- JAWIEN, J. New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewenetrznej*, v. 118, n. 3, p. 127-131, 2008.
- JUNUEIRA-GUERTZENSTEIN, S. M. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) amarelo na alimentação de ratos (*Rattus norvegicus*) normal e diabéticos. *Revista Cadernos do Centro Universitário São Camilo*, v. 10, p. 213-218, 2002.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KREEN, L.; MIRON, A.; PEMP, E.; PETR, U.; KOPP, B. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Zeitschrift Naturforsch*, v. 58c, p. 11-16, 2003.
- KUEPELI, E.; ASLAN, M.; GUERBUEZ, I.; YESILADA, E. Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. *Journal of Biosciences*, v. 59, p. 787-790, 2004.
- LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammation vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 111, n. 1, p. 16-26, 2006.
- LI, H.; CHEN, F. Application of high-speed countercurrent chromatography to the isolation of bioactive natural products. In: COLEGATE, M.; MOLYNEUX, R. J. *Bioactive Natural Products, Detection, Isolation, and Structural Determination* (2 ed.) Londres: CRC Press, p. 267- 298, 2008.
- LIN, C. M.; HUANG, S. T.; LIANG, Y. C.; LIN, M. S.; SHIH, C. M.; CHANG, Y. C., CHEN, C. T. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. *Planta Medica*, v. 71, p. 748-753, 2005.
- LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, n. 45, 2006.
- LORENZI, H., MATOS, F. J. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, p. 371-374.

- LUSTER, A. D. Chemokines –Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 7, p. 436-445.
- 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* forma *flavicarpa*. *Planta Medica*, v. 27, p. 112-21, 1975.
- MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*, v. 5, n. 6, p. 262-266, 1991.
- MANDERSCHIED, P.A.; BODKIN, R.P.; DAVIDON, B.A.; JENSEN, E.; RUSSO, T.A.; KNIGHT, P.R.. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 11, p. 742-751, 2004.
- MARECK, U.; GALENSA, R.; HERRMANN, K. Identification of passionfruit juice in fruit products by HPLC. *Zeitschrift fuerLebensmittel-Untersuchung und- Forschung*, v. 191, n. 4/5 p. 269-274, 1990.
- 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.
- MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2785- 2797, 2007.
- MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. The edible species of *Passiflora*. *Economic Botany*, Bronx, v. 24, p. 333-43, 1970.
- McALPINE, J. B.; MORRIS, P. Separation by high-speed countercurrent chromatography. In: SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. *Natural Products Isolation*, Totowa: Humana Press, p. 185- 211, 2006.
- MELO, G. O.; MUZITANO, M. F.; LEGORA-MACHADO, A.; ALMEIDA, T. A.; OLIVEIRA, D. B. O.; KAISER, C. R.; KOATZ, V. L.; COSTA, S. S. C-glucosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. *Planta Medica*, v. 71, p. 362–363, 2005.
- MONTANHER, A.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in a inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109. p. 281-289, 2007.
- MULLER, V.; CHÁVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTO, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; ZANETTI, C.

R.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex type 1 and rabies virus. *Phytotherapy Research*, v.21, n. 10, p. 970-974, 2007.

NACIF, S. R. Ontogenia e crescimento do fruto de maracujá-amarelo (*P. edulis* var. *flavicarpa*). Viçosa: UFV, 1991. 60p. (Dissertação de Mestrado) apud SALOMÃO, L. C. C., VIEIRA, G.; MOTA, W. F. Tecnologia de colheita e Pós-Colheita. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. Maracujá. Tecnologia de Produção, Pós-colheita, Agroindústria, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.33-49, 2001.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R.; HOUGHTON, P. J. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 782-786, 2005.

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.

OKA, F.; OKA, H.; ITO, Y. Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 538, p. 99-108, 1991.

OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Pharmacologically active components of a *Peruvian* medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillata*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 44, p. 333-336, 1996.

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, n. 3, 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 counter-current chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochemical Analysis*, v. 14, p. 96-99, 2003.

ORSINI, F.; VEROTTA, L. Separation of natural polar substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography, centrifugal thin-layer chromatography and droplet counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 349, p. 69-75, 1985.

ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P.; ATAHYDE, M. L.; MENTZ, L. A. Brasilianische Phytotherapeutika: Ihre Rolle im Arzneimittelmarkt. *Deutsche Apotheker Zeitung, Alemanha*, v. 129, n. 35, p. 1847-1848, 1989.

ORSINI, F.; VEROTTA, L. Separation of natural polar substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography, centrifugal thin-layer chromatography and droplet counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 349, p. 69-75, 1985.

- PAN, Y.; LU, Y. Recent progress in countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 30, p. 649- 679, 2007.
- PAULI, G. F.; PRO, S. M.; FRIESEN, J. B. Countercurrent separation of natural products. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1489-1508, 2008.
- 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. 111-115, 2005.
- PETRY, R. D. Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de *Passiflora edulis* Sims (maracujá). Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1999, 114 p. (Dissertação de Mestrado).
- 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.
- PHARMACOPOEIA Helvetica. 7 ed. Bern: Eidgenössische, 1v, 1987.
- PHARMACOPÉE Française. 10 ed. Paris: Adrpharm, 1v, 1980.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 5v , 1978.
- PRIMOT, S.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; RIOUX, V.; PÉREZ, J. A. C. O.; GARCIN, F. Variación morfológica de tres especies de curubas (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* y *P. mixta*) y sus híbridos en el Valle del Cauca (Colombia). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27, n. 3, p. 467-471, 2005.
- PUJOL, J.P.; CHADJICHRISTOS, C.; LEGENDRE, F.; BAUGE, C.; BEAUCHEF, G.; ANDRIAAMANALIJAONA, R.; GALERA, P.; BOUMEDIENE, K. Interleukine-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connective Tissue Research*, v. 49, n. 3, p. 293-297, 2008.
- PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia*, v. 74, n. 3, p. 302-304, 2003.
- RAFFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCANTI, G., TOJAE, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *Journal of Chromatography A*, v. 777, p. 223-231, 1997.
- RAMÍREZ, G. C.; GONZÁLEZ, V. F. La curuba de castilla. *Passiflora mollissima* (H.B.K.) Bailey. Bogotá: Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, p. 1-23, 1997.

- 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, n. 4, p.592-597, 2007.
- REBELLO, B. M.; MORENO, S. R. F.; GODINHO, C. R.; NEVES, R. F.; FONSECA, A. S.; BERNARDO-FILHO, M.; MEDEIROS, A. C. Effects of *Passiflora edulis flavicarpa* on the radiolabelind of blood constituents, morphology of red blood cells and on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats. *Applied Radition and Isotopes*, v. 66, n. 12, p. 1788-1792, 2009.
- REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 15, p. 195- 197, 2001.
- REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. P. Assay of Quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC. *Phytochemical Analysis*, v. 15, p. 195-197, 2004.
- REGINATTO, F.H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G.O.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two species 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.
- 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 (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) e de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) CV. Cameroon e suas combinações. *Ciência Agrotecnologia*, v. 24, n. 1, p. 213-224, 2000.
- RÍOS, J. I.; GINER, R. M.; JIMÉNEZ, M. J. A study on the anti-inflammatory activity of *Cayaponia tayuya* root. *Fitoterapia*, v. 3. p. 275–278, 1990.
- ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO, R.; TOMÁS, G.; CHENGUAYEN, J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, v. 67, n. 3, p. 206-213, 2006.
- ROSENTHALER, L. Distribution of hydrocyanic acid in the plant kingdom. *Schweizerische Apotheker-Zeitung*, v. 57, p. 279-283, 295-297, 307-313, 324-329, 341-346, 1919 apud SPENCER, K.; SEIGLER, D. S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 31, p. 794-796, 1983.
- ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PEZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003,

- RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DALPIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, v. 100, p. 719-724, 2007.
- SACCO, J. C. Passifloráceas. In: Reitz, R (Ed). *Flora Illustrada Catarinense*, fasc. PASS. Itajaí, 1980, 132p.
- SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 811-819, 1996.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 331, p. 43-52, 1997.
- SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, p. 949-956, 1999.
- SANTOS, K.C.; KURTZ, S. M. T. F.; MULLER, S. D.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R.M.M.W.; SANTOS, C.A.M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 4, p.565-573, 2006.
- SATO, G.S.; CHABARIBERY, D.; BESSA JR., A.A. Panorama da produção e de mercado do maracujá. *Informações Econômicas*, v. 22, n. 6, p. 17-31, 1992.
- SAUNDERS, J.; TARBY, C. M. Opportunities for novel therapeutic agents acting at chemokine receptors. *Drug Discovery Today*, v. 4, n. 2, p.80-92, 1999.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 93-151, 2006.
- SEAFORTH, C. E. Antidiabetic plants in the Caribbean. In: SOUMYANATH, A. Traditional medicines for modern times. Antidiabetic Plants. Boca Raton: Taylor & Francis, v. 6, p. 195-201, 2006.
- SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: Textbook of immunopharmacology. New York, 1989. p. 253-261.
- 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.
- SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. *Annual Review Immunology*, v. 23, p. 197-223, 2005.
- 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* variety

- flavicarpa* Degener in mice: putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Experimental Biology and Medicine*, v. 234, p. 967-975, 2009.
- SPECTOR, W.G.. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 72, p. 367-380, 1956.
- 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 extract from *P. incarnata*. *Planta Medica*, v. 54, p. 488-491, 1988.
- STICHER, O. Natural product isolation. *Natural Products Reports*, v. 25, p. 517-554, 2008.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V. EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, n. 6, p. 881-900, 2003.
- TAKAHASHI, K.; TAKEYA, M.; SAKASHITA, N.. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Medical Electron Microscopy*, v. 35, p. 179-203, 2002.
- TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M.; YAMAKI, K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E₂ production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2006.
- TAYAL, V.; KALRA, B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutic – An update. *European Journal of Pharmacology*, v. 579, n. 1-3, p. 1-12, 2008.
- TOUSSIROT, E.; WENDLING, D. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 8, p. 2089-2107, 2007.
- UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M.. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity an inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, p. 119-125, 2004.
- ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-Glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manjii* *Journal of Natural Products*, v. 45, n. 6, p. 783, 1982a.
- 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, 1982b.
- VALE, N.B.; LEITE, J.R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 11-24, 1983.

- VAN DER HEYDEN, J. A. M.; ZETHOF, T. J. J.; OLIVIER, B. Stress-Induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiology & Behavior*, v. 62, n. 3, p. 463-470, 1997.
- VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, 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.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.
- WARK, P. A.; BUCCHIERI, F.; JOHNSTON, S. L.; GIBSON, P. G.; HAMILTON, L.; MIMICA, J.; ZUMMO, G.; HOLGATE, S. T.; ATTIA, J.; THAKKINSTIAN, A.; DAVIES, D. E. IFN-gama-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 3, p. 586- 593, 2007.
- WATSON, R. R.; ZIBALDI, S.; RAFATPANAH, H.; JABBARI, F.; GHASEMI, R.; GHAFARI, J.; AFRASIABI, H.; FOO, L. Y.; FARIDHOSSEINI, R. Oral administration of the purple passion fruit peel extracts reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. *Nutrition Research*, v. 28, p. 166-171, 2008.
- WELLS, T. N., PROUDFOOT, A. E.; POWER, C. A. Chemokine receptors and their role in leukocyte activation. *Immunology Letters*, v. 65, p. 35-40, 1999.
- WILLIAMS, P. A.; BUXTON, R. P. Aspects of the ecology of two species of *Passiflora* (*P. mollissima* (Kunth) L. Bailey and *P. pinnastitipula* Cav.) as weeds in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, v. 33, p. 315-323, 1995.
- WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 7, n. 1, p. 53-58, 2000.
- 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.
- 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.
- ZIBALDI, 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.

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

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