

LARISSA DE BIAGGI VILLAS BÔAS



ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ANSIOLÍTICOS E SEDATIVOS DE
Passiflora actinia Hook., PASSIFLORACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Ambré M. Santos

CURITIBA
2007

LARISSA DE BIAGGI VILLAS BÔAS

ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ANSIOLÍTICOS E SEDATIVOS DE
Passiflora actinia Hook., PASSIFLORACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré M. Santos

CURITIBA
2007

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia e Indústria pela Universidade Federal do Paraná em 2004. Durante sua graduação foi bolsista de iniciação científica duas vezes: em 2001, no Departamento de Bioquímica, sob orientação da Prof^a Dr. Selma Faria Zawadzki, na área de biossíntese de heteropolissacarídeos, de agosto/2002 a julho/2003, no Laboratório de Farmacognosia, sob orientação do Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos, desenvolvendo o projeto “Determinação da atividade antioxidante de plantas medicinais e aromáticas”, cujos resultados conferiram à autora o primeiro lugar no XI EVINCI (Evento de Iniciação Científica da UFPR, 2003). Em 2004 foi professora de química na Sociedade Educacional Le Cristo/Centro Estudantil Domus Mariae, em Curitiba, e no ano seguinte ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na UFPR, área de insumos, medicamentos e correlatos, onde desenvolveu trabalho de pesquisa dos constituintes químicos ansiolíticos e sedativos de *Passiflora actinia* Hook.. Como contribuições desse estudo foram publicados os seguintes trabalhos:

1. Villas-Bôas, L. B., Sanches, M. C. R., Oliveira, R. M. M. W. e Santos, C. A. M.: Estudo cromatográfico da fração *n*-butanol das folhas do extrato hidroalcoólico de *Passiflora actinia* Hooker. Em V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais, Hotel Bourbon, Joinville-SC, 8-12 de maio, p. 172, 2006.
2. Lolli, L. F., Sato, C. M., Romanini, C. V., Villas-Bôas, L. B., Santos, C. A. M. e Oliveira, R. M. W.: Possible involvement of GABA_a-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. Journal of Ethnopharmacology, *articles in press*, doi:10.1016/j.jep.2006.11.02, 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ademar e Silvana

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cid Aimbiré de Moraes Santos pela seriedade com que conduz seus projetos, pela dedicação constante e acima de tudo por ter me acolhido em seu laboratório e acreditado no meu trabalho.

Aos meus pais Ademar e Silvana, irmãos Guilherme e Luis Felipe e os familiares que sempre foram a minha base, pelo incansável apoio, amor e estímulo em todos os momentos.

Ao Marlos, meu amor. Por me apoiar em todos os momentos da minha vida, me incentivar nos estudos e por entender minha ausência nos momentos que eram exclusivamente seus.

A técnica Maria da Graça Toledo (Gracinha) por ter me auxiliado nos experimentos no equipamento de CLAE.

A Professora Rúbia M. W. de Oliveira da UEM, pela colaboração no projeto realizando os experimentos farmacológicos.

Ao Dr. Anderson Barrisson e a técnica Paula Zangaro dos Santos do Departamento de Química da UFPR pela indispensável colaboração na obtenção e interpretação dos espectros de ressonância.

Ao Professor Eloir Paulo Schenkel por ter me recebido em seu laboratório na UFSC, compartilhado comigo sua experiência e cedido padrões. Agradeço também ao casal de amigos Juliana e Flávio pela hospitalidade em sua casa.

A Professora Maique Weber Biavatti por todo o apoio durante a execução desse projeto, interpretação dos espectros de ressonância e cromatogramas obtidos em CLAE, doação de reagentes e por ter me acolhido em sua casa em Itajaí-SC.

Aos colegas de laboratório Ingrid, Ciça, Cláudia, Elise, Lígia, Fernanda, Dania, Juliano, Cris, Rodrigo, Rosana, Ariane, Jane, Wesley, Marcelo, Mariana, Tammy, Beatriz, Patrícia, Melissa, Fabiana por toda ajuda prestada e pelas boas risadas. A D. Maria, pelo auxílio técnico e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos amigos de mestrado Lorena, Christian e Sílvia por terem compartilhado comigo todos os momentos de conquistas, frustração e cansaço. E acima de tudo por entenderem esse meu sentimento.

Ao Professor José Domingos Fontana por ter nos cedido padrão e pelas suas idéias sempre muito úteis.

A Professora Almeriane Maria Weffort Santos, coordenadora do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por toda a amizade e pelo esforço em sempre fazer desse curso o melhor possível.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado.

EPÍGRAFE

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;

é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."

Martin Luther King

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA	i
DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS	iii
EPÍGRAFE	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE ESQUEMAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE TABELAS	x
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
Considerações botânicas	6
Gênero <i>Passiflora</i>	6
Considerações químicas	7
Glicosídeos cianogênicos.....	7
Alcalóides	10
Flavonóides	13
Saponinas	18
Considerações farmacológicas	20
A espécie <i>Passiflora actinia</i>	31
Estudos prévios de <i>Passiflora actinia</i>	32
OBJETIVOS	36
MATERIAIS E MÉTODOS	37
Procedimentos gerais	37
Reação de acetilação	38

Separação cromatográfica em Sephadex LH-20.....	39
Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16	39
Material botânico	39
Preparo dos extratos.....	40
Extrato fluido e frações.....	40
Extrato metanólico e frações	41
Técnica de CLAE	43
Separação da fração <i>n</i>-BuOH.....	43
Isolamento da substância ACT ₂₄	43
Fração SP-HPLC1.....	44
Separação da fração aquosa.....	45
Fracionamento da fração aquosa liofilizada	45
Coluna CV ₃ e subfrações.....	45
Coluna CV _{2,3} (todas)	46
Separação cromatográfica em Sephadex LH-20.....	47
Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16	47
Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16/Sephadex	47
Reação de hidrólise ácida	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Extrato fluido e metanólico desclorofilado	49
Fração <i>n</i>-BuOH	54
Fração aquosa	60
CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS.....	75

LISTA DE ESQUEMAS

1: Formação dos alcalóides β -carbolínicos a partir da condensação de Pictet-Spengler.....	11
2: Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de <i>P. actinia</i>	41
3: Fluxograma de preparo do extrato metanólico e fracionamento de <i>P. actinia</i>	42

LISTA DE FIGURAS

1: Distribuição geográfica da espécie <i>Passiflora actinia</i> no Brasil, destacados em vermelho	32
2: Aspecto geral de <i>Passiflora actinia</i> Hooker, Passifloraceae	34
3: Cromatograma do extrato fluido de <i>P. actinia</i> obtido na sétima fase de otimização da metodologia em CLAE. FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm	51
4: Cromatograma do padrão isovitexina em CLAE. FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm	52
5: Cromatograma do extrato fluido de <i>P. actinia</i> , extrato fluido adicionado de padrão de isovitexina e padrão isovitexina em CLAE. FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm	53
6: Cromatograma do extrato metanólico desclorofilado de <i>P. actinia</i> em CLAE. FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm	53
7: CCD da fração <i>n</i> -BuOH e aquosa do extrato metanólico desclorofilado de <i>P. actinia</i> FM: EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (8:1:1), revelador: NEU	54
8: Perfil cromatográfico em CLAE da fração <i>n</i> -BuOH de <i>P. actinia</i> . FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm.....	55
9: Perfil cromatográfico em CLAE da fração <i>n</i> -BuOH e dos padrões vitexina, isovitexina e orientina. FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm...	56
10: Espectro de ¹ H- RMN (400 MHz, CDCl ₃) da substância 30	57

11: (a) Perfil cromatográfico da fração SP-HPLC1 em CCD. FM: EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (6:1:1), revelador NEU e (b) CLAE FM: sol. aquosa HCO ₂ H 2%-CH ₃ CN 90:10, fluxo 1,0 ml/min e $\lambda=340$ nm	59
12: Perfil cromatográfico em CCD da fração (I) e sub-frações da SP-HPLC1 FM: EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (6:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico	60
13: Fracionamento da fração aquosa do extrato metanólico desclorofilado em coluna à vácuo (CV ₃), FM: DCM-EtOH (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico	61
14: Resultado da coluna ACT 4, 5, 6 CV ₃ . FM: tolueno-EtOAc (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.....	62
15: Resultado da coluna ACT 7, 8, 9 CV ₃ (material partida, frações e material limpeza coluna). FM: tolueno- EtOAc (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico	62
16: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) da substância ACT ₄₃	63
17: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) do glicerol acetilado.....	66
18: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl ₃) do glicerol acetilado	67
19: Substância tri-acetato de glicerol	67
20: CCD da fração aquosa e suas frações da SP ₁ . Em destaque a F ₃ de coloração avermelhada. FM: DCM-EtOH (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.....	68
21: Frações SP ₄ (F ₃ -SP ₁)F ₁ e SP ₄ (F ₃ -SP ₁)F ₂ nas seguintes fases móveis: (1) EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (6:1:1) e (2) DCM-EtOH (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico	69
22: Coluna Amberlite XAD-16 fração SP ₄ (F ₃ -SP ₁)F ₁ F ₂ FM: EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (6:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.....	70
23: Coluna AMB-FLO da fração aquosa. Em destaque a fração F ₁ . FM: EtOAc-HCO ₂ H-H ₂ O (5:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.....	71
24: Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃) dos cristais (F ₁).....	72

LISTA DE QUADROS

1: Posição sistemática da espécie <i>Passiflora actinia</i> segundo Engler e Cronquist	31
---	----

LISTA DE TABELAS

1: Etapas de otimização da metodologia de CLAE para extratos e frações de <i>P. actinia</i>	51
---	----

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

No presente trabalho foi adotado o Sistema Internacional de pesos e medidas.

λ	Comprimento de onda
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
μ	Micra
μg	Micrograma
CA	Campo aberto
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CHCl_3	Clorofórmio
CH_3CN	Acetonitrila
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	Ácido acético
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	COrrrelated SpectroscopY
CV	Coluna à vácuo
D_2O	Água deuterada
DCM	Diclorometano
δ	Delta
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
FM	Fase móvel
GABA	Ácido <i>g</i> -aminobutírico
g	Gramas
h	Hora
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
H_2O	Água

HCl	Ácido clorídrico
HCO ₂ H	Ácido fórmico
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>High performance thin layer chromatography</i>
<i>i. p.</i>	Intraperitoneal
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LCE	Labirinto em cruz elevada
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
min	Minuto
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Espectrometria de massa
nm	Nanômetro
<i>n</i> -BuOH	Fração <i>n</i> -butanol
p.e.	Ponto de ebulição
p/p	Peso/peso
R _f	Relação de frente
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
t _r	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral

RESUMO

O maracujá é constituído por diversas espécies do gênero *Passiflora*, cujas folhas são utilizadas como sedativo e calmante na forma de extratos, tinturas infusos e decoctos. A espécie *Passiflora actinia* Hook., conhecida popularmente como maracujá-do-mato, é uma espécie nativa da região Sul do Brasil. Seus estudos químicos e farmacológicos são ainda escassos, sendo o objetivo dessa dissertação de mestrado contribuir para o conhecimento dessa espécie. Os extratos, fluido e metanólico desclorofilado, analisados em CLAE apresentaram pico com tempo de retenção semelhante ao do padrão isovitexina, que também está presente em grande quantidade na espécie *P. incarnata*. As frações mais polares (*n*-BuOH e aquosa) apresentaram em estudos anteriores resultados que sugerem a existência de potencial ansiolítico e sedativo em ratos, sendo que o isolamento de substâncias presentes nessas frações, juntamente com biomonitoramento foi um dos objetivos desse trabalho. A fração *n*-BuOH, constituída majoritariamente por flavonóides, possui isovitexina, mas orientina e vitexina estão ausentes. Outros flavonóides estão presentes nas frações, mas não puderam ser isolados e identificados. Parte da fração aquosa do extrato metanólico desclorofilado foi submetida à acetilação, de onde foi isolada uma substância e, identificada por ^1H e ^{13}C -RMN como glicerol. As separações de substâncias ativas das frações polares utilizando cromatografia em coluna com Sílica Gel 60G, Sephadex LH-20 e Amberlite XAD-16 não foram bem sucedidas, demonstrando a dificuldade de isolamento de constituintes ativos do maracujá, fato já experimentado por outros pesquisadores.

ABSTRACT

The passion fruit is constituted by several species from the genus *Passiflora*, whose leaves are used as sedative and to calm down in the form of extracts, tinctures, infusion and decocts. The species *Passiflora actinia* Hook., known popularly as "maracujá-do-mato", is a native species of the South area of Brazil. Its chemical and pharmacological studies are still scarce, being the objective of the dissertation to contribute for the knowledge of that species. The extracts fluid and methanolic free from chlorophyll analyzed by HPLC presented pick with retention time similar to the isovitexina, which is also present in great amount in the species *P. incarnata*. The most polar (*n*-BuOH and aqueous) fractions presented in previous studies results that suggest the existence of potential anxiolytic and sedative activities, in mice, being the isolation of active compounds in those fractions through bioassay, was one of the objectives of that work. The fraction *n*-BuOH, constituted mainly of flavonoids, contain isovitexin but orientin and vitexin are absent. Other flavonoids are present in the fractions, but they could not be isolated and identified. Part of the aqueous fraction of the methanolic extract free from chlorophyll was submitted to the acetylation, from where a compound was isolated and identified for ^1H - and ^{13}C -RMN as glycerol. The separation of active compounds from the polar fractions using column chromatography with Silica Gel 60G, Sephadex LH-20 and Amberlite XAD-16 was not successful, demonstrating the difficulty already experienced for other researchers when trying to isolate active compounds from the passion fruit leaves.

INTRODUÇÃO

Plantas, animais e minerais têm sido usados por toda a civilização humana na História para fazer remédios. As civilizações primitivas cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis e de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. No Brasil, as plantas eram usadas pelos povos indígenas em rituais de cura, da mesma maneira que os povos africanos faziam sua associação com rituais religiosos (Ferro, 2006). Registros escritos como os antigos hieróglifos egípcios e manuais chineses de fitoterapia descrevem o uso extensivo de produtos naturais para fins medicinais e a natureza continua a ser o maior recurso de medicamentos em todo o mundo (Polunin e Robbins, 1992).

Um século atrás, muitas drogas eram derivadas de plantas. Drogas sintéticas somente apareceram no mercado no final do Século XIX. Apesar de todo o progresso no desenvolvimento de novas drogas sintéticas, os fármacos naturais nunca perderam totalmente a sua importância. De fato, no final do Século XX, eles conquistaram novamente popularidade, devido às substâncias sintéticas apresentarem grandes efeitos colaterais (Wichtl, 2004).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de medicamentos (Nodari e Guerra, 2003).

Para a obtenção de novos fármacos existem três tipos de abordagem que são utilizadas há muito tempo e podem ser aplicadas até o momento. São elas: a

tradicional, a empírica e a molecular. A tradicional utiliza as informações obtidas (erros e acertos) pelas diversas culturas e sistemas de medicina. Muitas drogas como a morfina e a quinina são exemplos de drogas descobertas pela abordagem tradicional. A empírica se baseia no entendimento de processos fisiológicos e frequentemente utiliza moléculas naturais modelos, que servem de base para o desenvolvimento de outras moléculas ativas. Exemplos incluem a tubocurarina e outros relaxantes musculares, propranolol e outros antagonistas de receptores β -adrenérgicos. A abordagem molecular se baseia no conhecimento do local de ação para o agente terapêutico (Harvey, 1999).

Para a obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade estrutural e a função biológica. A diversidade estrutural dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos produtos de síntese sendo esse fato muito útil na abordagem molecular quando se utiliza a metodologia de seleção ao acaso. Além disso, existem em uma mesma planta substâncias de mesmo grupo químico, com similaridade estrutural, possibilitando uma maior chance de descobrimento de informações sobre estrutura-atividade. Esses fatos possibilitam que as substâncias químicas presentes nas plantas possam vir a se tornar fármacos em potencial para as mais diferentes moléstias (Harvey, 1999; Nodari e Guerra, 2003).

Muitos dos nossos medicamentos atuais são derivados de plantas. A porcentagem de drogas derivadas de produtos naturais era de 40% no ano de 2000, mantendo-se aproximadamente constante nos anos seguintes (Butler, 2004). Exemplos de drogas importantes obtidas de plantas são: morfina, um potente analgésico derivado do ópio (*Papaver somniferum*, Papaveraceae); digoxina, um medicamento para

congestão cardíaca derivado da digital (*Digitalis* spp., Scrophulariaceae); o antihipertensivo reserpina, derivado da ralwolfia (*Rauvolfia serpentina*, Apocynaceae); quinina e quinidina, substâncias antimalária derivadas da *Cinchona* spp., Rubiaceae; vincristina e vimblastina, anticâncer derivados da *Catharanthus roseus*, Apocynaceae; atropina da *Atropa belladonna*, Solanaceae (Cass, 2004; Rates, 2001) e o taxol, anticâncer conhecido pelo nome genérico Paclitaxel, que é um diterpenóide oxigenado complexo isolado da árvore teixo-do-pacífico, *Taxus brevifolia*, Taxaceae. Essa substância foi isolada durante um árduo trabalho de *screening* de diferentes plantas antineoplásicas no final da década de 60 por um grupo de pesquisadores através de abordagem sistemática. Mais tarde, foi isolado em várias outras espécies do gênero *Taxus* (incluindo *Taxus wallichiana*), onde já foram isolados mais de 300 taxóides. O taxol como fármaco foi desenvolvido pelo National Cancer Institute nos Estados Unidos. Em 1992, a Bristol–Myers–Squibb recebeu a aprovação para comercializar o taxol para o tratamento de câncer de ovário refratário, de mama metastático, câncer de pulmão e sarcoma de Kaposi. Um derivado semisintético do taxol, o taxotere, é conhecido atualmente como uma droga anticâncer melhor que o taxol (Srivastava *et al.*, 2005).

Apesar de todas as técnicas analíticas disponíveis a maioria das espécies de plantas não são investigadas quimicamente e biologicamente com grandes detalhes, e, até mesmo plantas medicinais bem conhecidas necessitam de mais estudos clínicos (Phillipson, 2003). Para a pesquisa de novas drogas derivadas de produtos naturais continuarem sendo competitivas com outros métodos de descoberta de fármacos se faz necessário um aumento na velocidade dos processos de estudos prévios, isolamento e elucidação estrutural (Butler, 2004).

O conhecimento da biodiversidade vegetal, além de ser considerado uma fonte de modelos químicos para a síntese de novas moléculas, também deve ser incentivado como um recurso natural com possível atividade na forma de fitoterápico padronizado, eficiente e seguro (Simões e Schenkel, 2002).

A partir das últimas décadas do século XX houve um aumento no uso dos fármacos vegetais em substituição aos medicamentos sintéticos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população acredita e tem confiança em plantas medicinais para o tratamento de sintomas e patologias diversos. Na grande maioria dos casos, o uso dos medicamentos sintéticos é o melhor tratamento, mas, quando apropriadamente utilizadas, as plantas medicinais podem ser a escolha correta. Apesar de nem sempre ser verdade, a população tem descoberto que os fármacos naturais frequentemente podem ser seguros, efetivos e mais baratos em relação aos fármacos comerciais. Algumas das vantagens são: o menor grau de efeitos colaterais, o sinergismo entre os componentes químicos presentes na planta que podem atuar em diferentes sintomas ao mesmo tempo e a atuação das plantas como um agente de equilíbrio na fisiologia do indivíduo e não somente no sintoma específico. Muitas vezes os resultados clínicos com a utilização de plantas medicinais tende a ser mais lento e gradativo do que com os fármacos tradicionais (Cass, 2004).

A seleção de plantas com possível poder farmacológico depende de diversos fatores que incluem: conteúdo químico, toxicidade e uso tradicional pela população em diferentes culturas, que é conhecido como etnobotânica, mais especificamente etnofarmacologia (Rates, 2001). Esta constitui um desdobramento da etnobotânica e estuda os remédios simples ou compostos, produzidos a partir de vegetais, envolvendo

sempre o objetivo de corrigir problemas de saúde, tanto da ordem física, como mental ou espiritual (Camargo, 2003). Um exemplo é o maracujá, cuja droga é constituída por diversas espécies do gênero *Passiflora*, da família Passifloraceae. *Passiflora incarnata* Linn. e outras espécies do gênero (*P. alata* Curtis; *P. coerulea* Linn. , *P. edulis* Sims, *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), são amplamente usadas na medicina tradicional por toda a Europa e nas Américas por suas propriedades sedativas e ansiolíticas. *Passiflora incarnata* é a espécie oficial em Farmacopéias de diversos países, como Suíça, França, Egito, Alemanha (Dhawan *et al.*, 2001a). Esta espécie cresce em solos secos e pobres não se adaptando bem ao clima tropical brasileiro, além de seu fruto possuir sabor amargo, fatos que podem justificar a sua pequena difusão no Brasil (Moraes, 1995; Pereira *et al.*, 2004).

A espécie de maracujá oficializada pelas três primeiras edições da Farmacopéia Brasileira é *Passiflora alata* Curtis (Da-Silva, 1926; Farmacopéia, 1959; Farmacopéia, 1977) indicando as folhas como parte utilizada. Os extratos desta espécie estão incluídos em diversas preparações farmacêuticas registradas, apesar dos poucos estudos químicos e farmacológicos existentes. O desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade das drogas e das preparações farmacêuticas existentes se faz necessário, tanto para a espécie oficial nas Farmacopéias Brasileiras, como para as outras espécies nativas do Brasil.

Considerações Botânicas

Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae compreende cerca de dezoito gêneros e seiscentas e trinta espécies, sendo os gêneros com o maior número de espécies o *Passiflora* (400 espécies) e *Adenia* (100 espécies). As do gênero *Passiflora* estão distribuídas principalmente em regiões tropicais e sub-tropical mas se desenvolvem melhor no clima temperado das Américas e África (Cronquist, 1981; Judd *et al.*, 1999). São plantas escandentes, herbáceas ou lenhosas e possuem gavinhas, as quais são ramos modificados, podendo ainda ser detectada a presença de nectários extraflorais (Barroso, 1978)

Das quatrocentas espécies conhecidas de *Passiflora*, trinta são descritas por terem frutos comestíveis. Somente poucas espécies alcançaram desenvolvimento comercial (Pereira e Vilegas, 2000).

O nome *Passiflora* é atribuído ao significado místico das características físicas de suas flores, nas quais os escritores do século XVI interpretaram suas diferentes partes como representando os símbolos da Paixão de Cristo. O nome *Passiflora* provém do latim *passio*, o equivalente a paixão e *flos oris* o equivalente a flor. Por essa razão, esses vegetais são conhecidos na Europa e América do Norte como flor-da-paixão (Alonso, 1998; Barroso, 1978; Freitas, 1985).

Dentre as várias plantas com atividade farmacológica conhecida, destacam-se algumas espécies do gênero *Passiflora*, conhecido popularmente no Brasil como maracujá (no Brasil termo originado do tupi guarani *muruku'ia*, que significa comida feita

em cuia, numa alusão aos frutos édulos do vegetal) (Moraes, 1995), cujas partes aéreas são empregadas medicinalmente por suas propriedades sedativas, antiespasmódica e ansiolítica (Zuanazzi e Montanha, 2003). Desde 1867, é parte da medicina clássica como sedativo em caso de insônia e irritabilidade (Freitas, 1985).

Considerações químicas

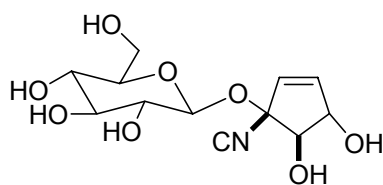
Os estudos referentes à composição química de diversas espécies de *Passiflora* evidenciam principalmente os alcalóides e flavonóides. Entretanto, outras substâncias como glicosídeos cianogênicos (Seigler *et al.*, 1982), maltol (Aoyagi *et al.*, 1974), aminoácidos (Gavasheli *et al.*, 1974), antocianidinas (Kidoy *et al.*, 1997) e glicosídeos fenólicos (Chassagne *et al.*, 1997) também são frequentemente citadas na literatura. A literatura atual revela um grande número de estudos químicos para a *Passiflora incarnata* e *Passiflora edulis*, mas para as outras espécies os estudos são poucos no que diz respeito aos aspectos químicos (Dhawan *et al.*, 2004). Juntamente com as duas espécies citadas, em torno de apenas quarenta outras espécies foram fitoquimicamente investigadas desde os anos 60 (Abourashed *et al.*, 2002). Saponinas são uma classe de substâncias químicas também citadas, apesar de poucos os artigos ao seu respeito para o gênero *Passiflora*.

Glicosídeos cianogênicos

Folhas, raízes, caule e arilo de sementes imaturas são as partes das plantas com maior quantidade de substâncias cianogênicas (Seigler, 1975; Seigler *et al.*, 1982).

A distribuição dos glicosídeos cianogênicos no gênero *Passiflora* apresenta variações distintas para cada nível de subgênero (Jaroszewski *et al.*, 2002).

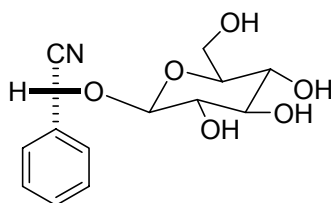
A maioria dos glicosídeos cianogênicos relatados na literatura são da espécie *P. edulis*. Em *P. incarnata* foi encontrado o glicosídeo cianogênico ginocardina (**1**). Esse não é um glicosídeo cianogênico típico do gênero, visto que outras espécies que foram estudadas não possuíam tal substância (Spencer e Seigler, 1984).



1

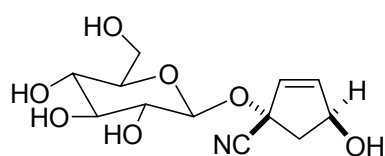
Alguns frutos imaturos de espécies de *Passiflora* (ex. *P. adenopoda*) podem ser tóxicos e até fatais quando ingeridos (Seigler *et al.*, 1982).

Agliconas cianogênicas já foram relatadas na literatura, cuja concentração é bem maior nos frutos imaturos que, por isso são tóxicas. O uso de chá das folhas deve ser controlado devido aos riscos de intoxicação cianídrica conseqüente ao uso de doses altas (Souza, 1991). Prunasina (**2**) foi relatado pela primeira vez em 1983 em folhas e frutos de *P. edulis* Sims. e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Spencer e Seigler, 1983).

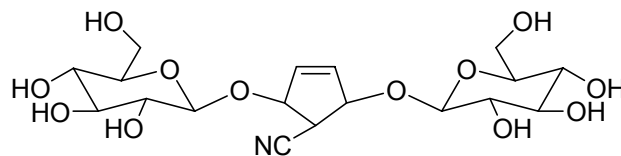


2

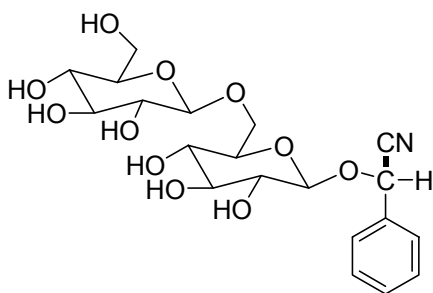
Em 1996 menores quantidades de prunasina foram encontradas em *P. edulis* Sims. Isso pode ser devido às diferenças de maturação do fruto e sua origem. Nas cascas são encontradas as maiores concentrações de glicosídeos cianogênicos, sendo 80% dessas substâncias a prunasina (2) (Chassagne *et al.*, 1996). Foram também encontrados os glicosídeos passicoriacina (3), passicapsina (4), passibiflorina, epipassicoriacina, epitetrafilina B (Dhawan *et al.*, 2004), amigdalina (5), sambunigrina, ramnopiranosil β-D-glucopiranosídeo de mandelonitrila (Chassagne *et al.*, 1996). O glicosídeo cianogênico β-rutinosídeo de α-L-ramnopiranosil-β-D-glucopiranosídeo de mandelonitrila foi isolado de frutos de *P. edulis* (Chassagne e Cruzet, 1998).



3

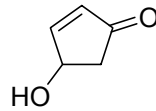


4



5

Os glicosídeos cianogênicos geralmente têm a propriedade de proteger as plantas de herbívoros e fitopatógenos (Francisco e Pinotti, 2000). A substância 4-hidroxi-2-ciclopentenona (6) isolada de folhas de *Passiflora tetraedra* foi responsável pela atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) (Perry *et al.*, 1991).



6

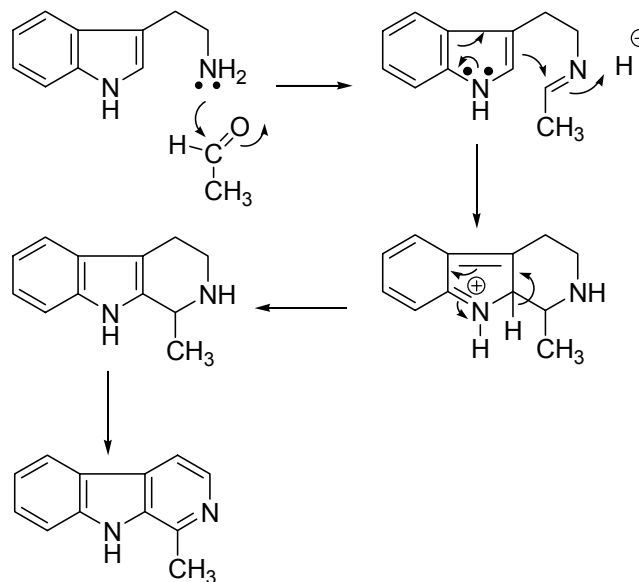
Analisando dezenove espécies de *Passiflora* foi possível identificar para as espécies *P. apetala*, *P. cuneata*, *P. indecora*, *P. murucuja* e *P. perfoliata* o glicosídeo passibiflorina contendo o resíduo 6-deoxi-β-D-glucopiranosil (Jaroszewski *et al.*, 2002). Esses mesmos autores isolaram o glicosídeo passiguatemalina da espécie *P. guatemalensis*.

Tetrafilina A e B, deidaclina e volkenina foram isolados de sementes de *P. foetida* coletadas no oeste do Pacífico, nas Ilhas Galápagos. Quando coletadas no “Reunion Island” foram identificados os glicosídeos tetrafilina B, sulfato de tetrafilina B e volkenina juntamente com um glicosídeo derivado da valina chamado linamarina (Andersen *et al.*, 1998). Em 1982, uma mistura epimérica de sulfatos de tetrafilina B e epitetrafilina B foi isolada de *Passiflora caerulea* e *P. alato-caerulea* (Seigler *et al.*, 1982).

Alcalóides

Os alcalóides são um grupo de substâncias químicas presente em plantas medicinais com grande importância no desenvolvimento de novas drogas. Isso se deve provavelmente à variedade de estruturas químicas possíveis, que podem ser os responsáveis pelas respostas farmacológicas dos alcalóides presentes nas plantas (Elizabetsky e Costa-Campos, 2006).

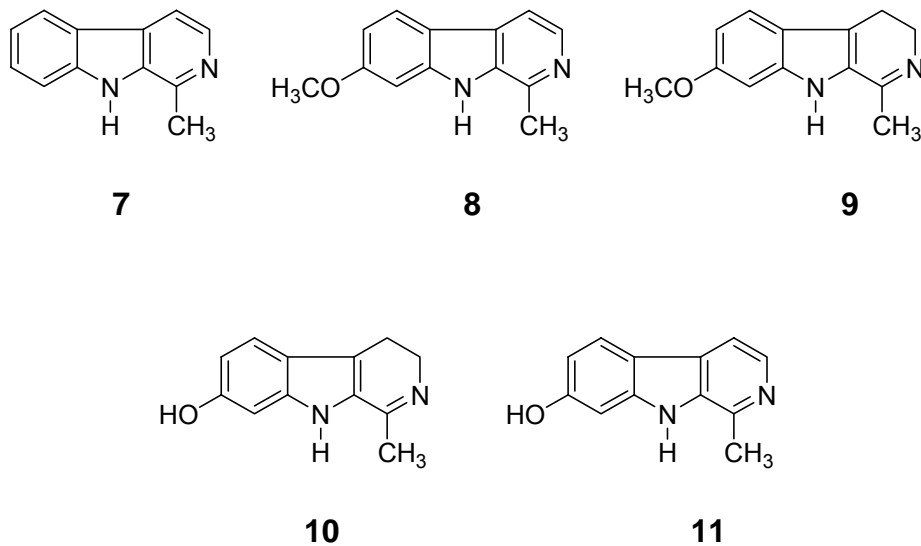
Os alcalóides já encontrados no gênero *Passiflora* são do tipo indólicos simples, derivados do sistema β -carbolina. Conhecidos como β -carbolinas ou alcalóides β -carbolínicos, o mecanismo de reação sugerido para a sua formação se dá por meio da condensação de Pictet-Spengler (Esquema 1) entre a triptamina e um aldeído. A triptamina reage com um aldeído, formando a base de Schiff, que por sua vez, por meio da reação do tipo Mannich, o carbono α age como um nucleófilo para formar o alcalóide. A aromaticidade é restaurada por tautomerismo. Posteriormente, por oxidação forma-se a substância com esqueleto β -carbolina, conforme o esquema a seguir (Cordell, 1981).



Esquema 1: Formação dos alcalóides β -carbolínicos a partir da condensação de Pictet-Spengler

Os alcalóides do tipo harmana (alcalóides indólicos) tem sido alvo de interesse desde o início do século devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Os alcalóides harmana (**7**), harmina (**8**), harmalina (**9**), harmalol (**10**) e harmol (**11**) foram detectados em *P. incarnata* primeiramente na década de 60 (Lutomski, 1959).

Posteriormente (década 70), utilizando um método mais seletivo, detectou-se somente harmana (**7**) e os outros alcalóides não foram encontrados. A concentração encontrada foi tão baixa, que não se pode afirmar que os alcalóides são os princípios ativos responsáveis pelas atividades farmacológicas do maracujá (Löhdefin e Kating, 1974; Poethke *et al.*, 1970).



Speroni e Minghetti (1988) realizaram determinação do teor de harmana por HPLC em um extrato fluido de *P. incarnata* e observaram que a sua quantidade não excedia 0,01 µg/ml no extrato. Considerando que a concentração de extrato que apresentava atividade farmacológica era de 160 g/kg, a quantidade de harmana presente na dose correspondia a negligenciável quantia de 40 ng/kg. Na dose de 4 mg/kg de harmana, os ratos não apresentavam atividade sedativa, concluindo-se que o alcalóide harmana não pode ser o responsável pela atividade farmacológica.

Em 1995, um estudo realizado com amostras comerciais de *Passiflora incarnata*, sendo duas das amostras com coleta de trinta anos atrás, não apresentou nenhum dos alcalóides citados anteriormente, com exceção de uma amostra que detectou um teor de harmana de aproximadamente 0,1 ppm. Imaginou-se que o conteúdo de alcalóides possa ter mudado devido ao modo de cultivo da planta, mas, como as amostras de trinta anos atrás foram também negativas, esta hipótese pode ser desconsiderada. Os autores sugerem que a análise de alcalóides na rotina de controle de qualidade de *Passiflora incarnata* não se faz necessária (Rehwald *et al.*, 1995).

Flavonóides

Os flavonóides estão amplamente distribuídos no Reino Vegetal. Estão presentes em abundância em Angiospermas, apresentando nesse grupo, enorme diversidade estrutural (Zuanazzi e Montanha, 2003).

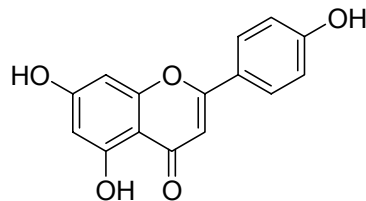
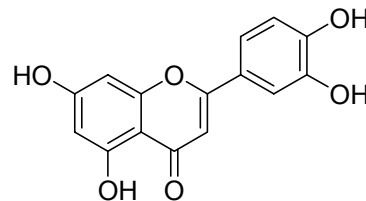
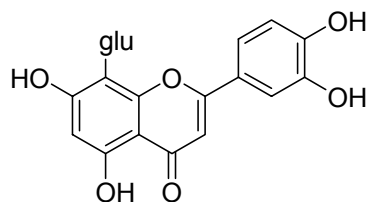
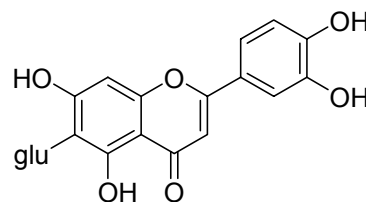
Os flavonóides são capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que muitas substâncias podem possuir efeitos anti-hepatotóxico, antialérgico, antiinflamatório, antiosteoporótico a até antitumoral (Carlo *et al.*, 1999).

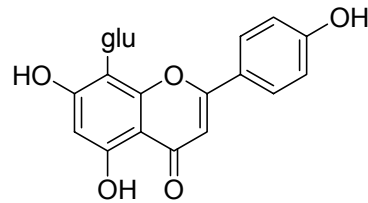
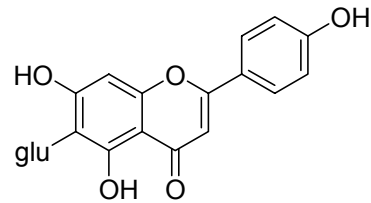
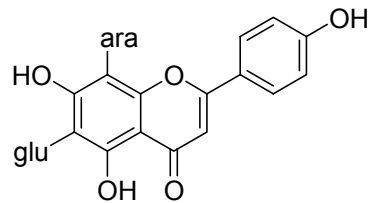
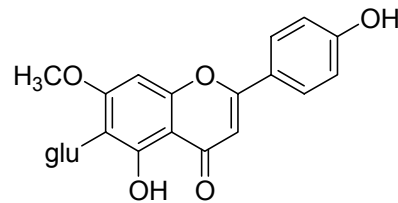
Os flavonóides são biosintetizados por vias combinadas do ácido chiquímico e policetídeos. O ácido cinâmico (derivado fenil propanóide), sintetizado pela via do ácido chiquímico, atua como o iniciador na síntese da porção policetídica, no qual são incorporados três resíduos de acetato. A partir daí segue-se o fechamento do anel. Ocorrem então hidroxilações e reduções subseqüentes que formarão as diferentes classes de flavonóides existentes nas plantas (Carlo *et al.*, 1999).

Devido às diversas atividades farmacológicas que os flavonóides apresentam, sua identificação e quantificação têm sido estudadas extensivamente (Pietta *et al.*, 1989).

Segundo Harborne (1988) citado por Pereira e Vilegas (2000), aproximadamente cinquenta flavonóides C-glicosídeos foram encontrados nas folhas de espécies da família Passifloraceae.

Os principais flavonóides descritos para o gênero *Passiflora* são os C-glicosídeos derivados da apigenina (**12**) e luteolina (**13**), sendo orientina (**14**), isoorientina (**15**) derivados da luteolina e vitexina (**16**), isovitexina (**17**), shaftosídeo (**18**) e swertisina (**19**) derivados da apigenina (Geiger e Markham, 1986) os mais frequentemente encontrados. Nesses flavonóides os açúcares estão ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono, resistente à hidrólise ácida (Zuanazzi e Montanha, 2003).

**12****13****14****15**

**16****17****18****19**

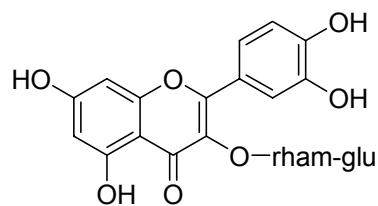
Os estudos a respeito da composição flavonoídica de *Passiflora* foram realizados em sua maioria para a espécie *P. incarnata*. Orientina, isoorientina, shaftosídeo, isoshaftosídeo, isovitexina-2''-O-glucopiranosídeo, isoorientina-2''-O-glucopiranosídeo, isovitexina, vitexina, swertisina, isoscoporamina-2''-O-glicosídeo, vicenina-2, lucenina-2, apigenina-6-glucosil-8-β-D-ribofuranosídeo já foram detectados em espécies de *Passiflora* (Abourashed *et al.*, 2002; Geiger e Markham, 1986; Li *et al.*, 1991; Marchart *et al.*, 2003; Quercia *et al.*, 1978; Raffaelli *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1997; Rehwald *et al.*, 1994).

As substâncias isovitexina, 2''-xilosilvitexina, luteolina-7-O-glicosídeo foram isoladas de *P. pittieri*, e uma mistura de vicenina-2, shaftosídeo e isoshaftosídeo foi identificada. Da espécie *P. ambigua* apenas o flavonóide sapogerina foi obtido (Ulubelen *et al.*, 1982).

A espécie *P. alata* teve o flavonóide 2"-xilosilvitexina isolado em grande quantidade de extrato das suas folhas, mas, apenas pequenas quantidades de vitexina, isovitexina e orientina foram isolados. Isoorientina também já foi identificado na espécie (Freitas, 1985; Ulubelen *et al.*, 1982).

Passiflora edulis foi descrita como sendo rica em glicosídeos que incluem luteolina-6-C-chinovosídeo e luteolina-6-C-fucosídeo (Mareck *et al.*, 1991). Vitexina, isovitexina e orientina foram detectados por CCD (Freitas, 1985) e HPLC (Moraes, 1995).

O O-glicosídeo rutina (**20**) foi detectado pela técnica de HPLC (comparação de tempo de retenção, enriquecimento do extrato com padrões e comparação dos espectros de UV com o dos padrões) nas espécies *P. edulis* e *P. alata* (Moraes, 1995). Hiperosídeo já foi detectado em *P. incarnata* (Pietta *et al.*, 1986; Pietta *et al.*, 1989).



20

Os flavonóides constituem atualmente os melhores marcadores de controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, pois através deles é possível identificar muitas espécies de *Passiflora* (Bokstaller e Schmidt, 1997; Li *et al.*, 1991; Quercia *et al.*, 1978), sendo que o desenvolvimento de novos métodos analíticos para análise dos flavonóides se faz necessário (Muller *et al.*, 2005).

Os dados encontrados na literatura sobre a quantificação dos flavonóides são contraditórios, pois a fração flavonoídica está sujeita a variação no seu conteúdo que

pode ser devido à época da colheita, ao local de cultivo ou à metodologia de análise empregada (Li *et al.*, 1991). Um trabalho realizado com *P. incarnata* que teve como objetivo determinar a variação do conteúdo de flavonóides nos vários estágios de desenvolvimento da planta, mostrou uma maior concentração dessas substâncias nos períodos que antecedem a floração até o período de floração do vegetal sendo ainda que o maior conteúdo de isovitexina foi encontrado nas folhas. O conteúdo total de flavonóides foi expresso em % de isovitexina (Menghini e Mancini, 1988).

O conteúdo de flavonóide diminui rapidamente durante o período de estocagem, por isso deve-se preparar os medicamentos utilizando folhas de *P. incarnata* logo após a colheita (Menghini e Mancini, 1988).

Um dos métodos de quantificação para flavonóides freqüentemente utilizados é a análise espectrométrica de complexos formados com adição de cloreto de alumínio após hidrólise e extração com acetato de etila. Seu cálculo é feito baseado na leitura de absorvância no ultravioleta. Os C-glicosídeos resistem à hidrólise ácida e conseqüentemente não são determinados através do método clássico da espectrometria (Petry *et al.*, 1998; Rehwald *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que cromatografia líquida é um método eficiente para análise qualitativa e quantitativa de flavonóides C-glicosídeos presentes em espécies de maracujá (Petry *et al.*, 1998).

Um método utilizando cromatografia líquida, apropriado e reprodutível para análise quantitativa e qualitativa de extratos fluidos de *P. alata* e *P. incarnata* e para diferenciação de espécies foi desenvolvido. Os extratos fluido das folhas de *P. alata* apresentaram isovitexina (0,018 mg/ml) e apenas traços de vitexina. Um extrato fluido

comercial de *P. incarnata* foi analisado, apresentando 1,198% de isovitexina. Apesar da presença do mesmo flavonóide nas duas espécies, o perfil cromatográfico observado foi diferente. Esse mesmo trabalho demonstrou que diferença de estação do ano (verão e inverno) altera a concentração de flavonóides, sendo que no inverno a concentração é menor, sem entanto alterar o seu perfil cromatográfico (Muller *et al.*, 2005).

HPTLC também tem sido empregado na quantificação de flavonóides em folhas de espécies de *Passiflora*. Uma metodologia HPTLC padronizada possibilitou a quantificação das dez substâncias majoritárias do extrato metanólico de *P. coerulea* (Pastene *et al.*, 1997).

As C-glicosilflavonas dos diversos gêneros de *Passiflora* geralmente ocorrem como isômeros (Pereira e Vilegas, 2000), e já existem maneiras de diferenciá-los. Uma delas é utilizar técnicas HPLC-CID/MS para produzir pseudos espectros MS/MS que fornecem dados de fragmentação incluindo medidas exatas de massa para diferenciar os pares vitexina/isovitexina e orientina/isorientina de extratos de *Passiflora* (Pereira *et al.*, 2005).

Saponinas

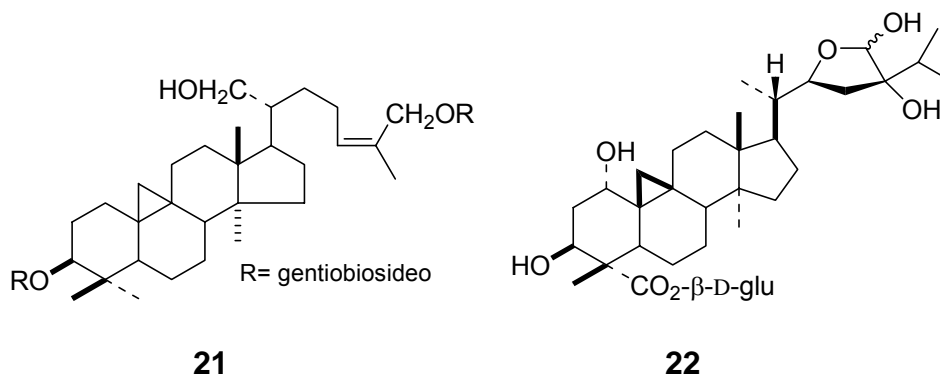
Atualmente, as saponinas também estão sendo estudadas. Segundo Reginatto *et al.* (2001), isso se deve ao fato de que muitas das atividades terapêuticas, ou até substâncias alérgicas presentes nos extratos de *Passiflora* são ainda desconhecidas.

Saponinas já foram relatadas em *P. quadrangularis* (Orsini *et al.*, 1987; Orsini *et al.*, 1986) da qual foi isolada pela primeira vez a saponina quadrandulosídeo (**21**), em *P. edulis* (Bombardelli *et al.*, 1975; Yoshikawa *et al.*, 2000a; Yoshikawa *et al.*, 2000b) e em

P. alata (Reginatto *et al.*, 2001) podendo ser este grupo de substâncias químicas altamente polares a grande aposta em relação aos responsáveis pelo potencial farmacológico sedativo e ansiolítico do gênero. Passiflorina (**22**) foi encontrado em *P. edulis* em 1975 (Bombardelli *et al.*, 1975).

Cinco glicosídeos foram isolados de folhas de *Passiflora alata* (3-O- β -D-glicopiranosil-estigmasterol, ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-oleanólico e 9,19-ciclolanost-24-Z-en-3 β ,21,26-tri-hidroxi-3,26-di-O-gentiobiose (quadrangulosídeo) (Reginatto *et al.*, 2001).

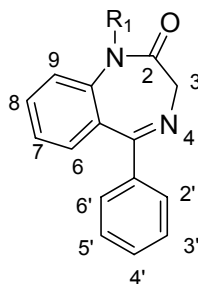
Reginatto em 2004 desenvolveu uma metodologia por HPLC com detecção em UV com o objetivo de quantificar quadrangulosídeo (**21**), a saponina em maior quantidade em folhas de *Passiflora alata*. A quantidade de quadrangulosídeo presente no extrato aquoso de folhas de *P. alata* foi estimada em 22% p/p correspondendo a 0,8% (p/p) em relação às folhas secas (Reginatto *et al.*, 2004).



Considerações farmacológicas

A atividade sedativa pode ser definida pela redução da atividade locomotora e diminuição do nível de vigiância, útil para aliviar estados de excitação excessiva. O efeito hipnótico, diferente da sedação, é capaz de induzir e manter o sono de uma pessoa por certo período de tempo (Guimarães, 1999). É difícil estabelecer distinção entre os estados patológico e normal de uma ansiedade; todavia, a despeito desta imprecisão, os agentes ansiolíticos estão entre as substâncias prescritas com maior frequência e utilizadas por mais de 10% da população na maioria dos países desenvolvidos (Rang *et al.*, 2001).

As classes mais comuns de agentes ansiolíticos são os agonistas dos receptores 5-HT que foram recentemente introduzidos, mostrando atividade ansiolítica com pouca sedação, barbitúricos que atualmente são obsoletos como agentes ansiolítico/sedativo, antagonistas dos receptores β -adrenérgicos utilizados freqüentemente para reduzir os sintomas físicos de ansiedade (tremor, palpitação) e benzodiazepínicos (**23**) que é a classe mais importante para esta finalidade terapêutica (Rang *et al.*, 2001). O benzodiazepínico diazepam é o derivado 7-cloro-1-metil, e o flunitrazepam é o derivado 2'-flúor-1-metil-7-nitro.



23

Os efeitos indesejáveis destes medicamentos variam desde efeitos tóxicos, resultantes de superdosagem aguda, efeitos colaterais do uso terapêutico normal (sonolência, confusão, amnésia, comprometimento da coordenação) tolerância e dependência (Carlini, 2003; Rang *et al.*, 2001). Isso significa que o uso destes medicamentos deve ser realizado com cautela (Shinomiya *et al.*, 2005).

Por outro lado, existem diversas drogas vegetais que são utilizadas pela medicina tradicional e popular como ansiolíticas e sedativas como *Melissa officinalis* L., Lamiaceae; *Tilia europaea* L., Tiliaceae; *Hypericum perforatum* L., Clusiaceae; *Matricaria recutita* L., Asteraceae; e *Passiflora* sp. (Coleta *et al.*, 2001; Loggia *et al.*, 1981; Shinomiya *et al.*, 2005).

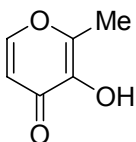
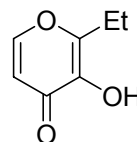
Apesar do seu uso popular e da presença de diversos constituintes químicos no gênero *Passiflora*, apenas poucos artigos considerando investigações farmacológicas estão disponíveis. Destes, a maioria dos estudos farmacológicos tem sido realizado no intuito de verificar os efeitos depressivos no sistema nervoso central (SNC) (Dhawan *et al.*, 2004).

Alguns aspectos bioquímicos também têm sido avaliados por pesquisadores em modelos animais. Estudos com ratos em relação ao ganho de peso e aos parâmetros bioquímicos (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triacilglicerídeos, glutatiónperoxidase, atividade da superóxido desmutase, proteínas totais, ganho de peso e glucose) após administração de 1000 mg/kg do chá das folhas (3x por semana-15 dias) foram realizados. O único parâmetro que apresentou alteração significativa foi HDL-colesterol, sem modificar a concentração de colesterol total, sugerindo ser o extrato de *P. alata* cardioprotetor e antiaterogênico (Doyama *et al.*, 2005).

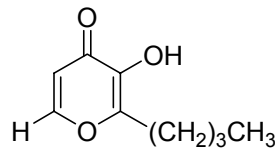
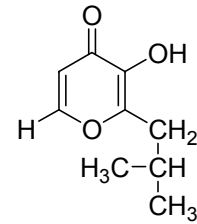
Vários tipos de testes podem ser utilizados para medir a atividade ansiolítica em modelos animais. Um rato em ambiente não familiar normalmente responde ao permanecer imóvel, porém alerta (“supressão comportamental”) por algum tempo, o que pode representar uma ansiedade produzida pelo ambiente estranho. Este estado de imobilidade é reduzido se forem administrados fármacos ansiolíticos (Rang *et al.*, 2001)

O modelo experimental Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um modelo utilizado em estudos recentes para detecção de efeitos ansiolíticos em várias espécies de *Passiflora* em roedores. Neste teste, dois braços da cruz são fechados, enquanto os outros dois são abertos. Em estado normal, os ratos passam a maior parte do seu tempo nos braços fechados e evitam os braços abertos (com medo de caírem). A administração de agentes ansiolíticos aumenta o tempo em que os animais ficam nos braços abertos e também aumenta a mobilidade dos ratos, a julgar pela frequência que atravessam o cruzamento (Handley e Mithani, 1984; Rang *et al.*, 2001). Outro teste utilizado é o do Campo Aberto (CA). Durante o período do teste são observados os seguintes aspectos: frequência de locomoção ou número de cruzamentos (número de quadrantes percorridos) e o número de levantamentos ou *rearings* (levantamento do animal sobre as patas traseiras) (Royce, 1977).

Os derivados das pironas maltol (**24**) e etil maltol (**25**) isolados da *Passiflora incarnata*, causaram efeitos depressores em estudo com camundongos.

**24****25**

Maltol causou potencialização do sono induzido por hexobarbital, ação anticonvulsivante em altas doses e diminuição da atividade locomotora em doses baixas. Etil maltol apresentou as mesmas ações, com maior poder anticonvulsivante e menor poder inibidor dos efeitos na atividade locomotora (Aoyagi *et al.*, 1974). Análogos estruturais do maltol foram avaliados farmacologicamente, e verificou-se que dois deles, ácidos 2-butil (**26**) e 2-isobutilpiromecônico (**27**) apresentaram efeito anticonvulsivante superior que ao maltol (Kimura *et al.*, 1980).

**26****27**

O flavonóide vitexina foi investigado farmacologicamente em relação ao seu poder hipotensivo, antiinflamatória e antiespasmódico (propriedades não específicas). Os efeitos da atividade hipotensiva da vitexina foram atribuídos às propriedades bloqueadoras dos gânglios e, as atividades antiinflamatórias, às propriedades anti-histamínicas, antibradicinina e anti-serotonina (Prabhakar *et al.*, 1981). Os flavonóides vitexina e isovitexina foram utilizados em testes neurofarmacológicos sendo que nenhum apresentou efeito nas doses de 5,0 e 10,0 mg/kg (Speroni e Minghetti, 1988).

Em relação à *Passiflora alata*, droga oficial na Farmacopéia Brasileira, os estudos farmacológicos iniciaram-se apenas em 1984. O efeito do extrato bruto (extrato fluido preparado segundo Farmacopéia Francesa VIII) de *P. alata* foi avaliado sobre o SNC de ratos. Depois de evaporado e contendo princípios flavonoídicos e alcaloídicos,

a administração *i. p.* do extrato fluido (75 e 150 mg/kg) reduziu a atividade motora espontânea, prolongou o tempo de sono induzido por pentobarbital e aumentou o tempo de latência das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (Oga *et al.*, 1984). Em suas conclusões os pesquisadores sustentaram a idéia de que os alcalóides e flavonóides podem ser os responsáveis pelos efeitos depressores desse maracujá.

Estudo comparativo da atividade ansiolítica de extratos hidroetanólicos das folhas de *P. alata* e *P. edulis* mostrou ser *P. edulis* mais ativa farmacologicamente que *P. alata* utilizando administração *i. p.* e o modelo de ansiedade LCE. Com metade da dose (50 mg/kg) *P. edulis* apresentou efeitos ansiolíticos que só existiram para *P. alata* na dose de 100 mg/kg. Nos resultados fitoquímicos *P. edulis* apresentou em torno de duas vezes mais flavonóides que *P. alata* (Petry *et al.*, 2001). Utilizando extratos aquosos (1:10) de *P. edulis* (50, 100 e 150 mg/kg) e *P. alata* (100 e 150 mg/kg), esse mesmo grupo de pesquisadores encontraram a mesma proporção de flavonóides (1:2) entre as duas espécies, sugerindo que o solvente utilizado (sol. EtOH 40% ou H₂O) não altera qualitativamente a composição química dos extratos e nem a atividade farmacológica (Paris *et al.*, 2002). Utilizando o mesmo modelo de ansiedade *v. o.*, com extratos aquosos secos em "spray-dried", Reginatto *et al.* (2006) confirmaram os resultados já observados no estudo anterior, além de estar de acordo com o uso etnofarmacológico de *Passiflora* (extrato aquoso).

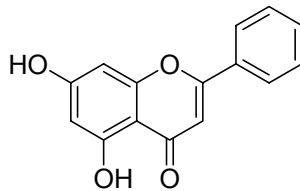
O extrato aquoso (20 e 40 mg/kg *i. p.*) de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener, promoveu depressão no SNC em camundongos (Vale e Leite, 1983). Os autores do estudo apresentam indícios sugerindo que o principio ativo seja de natureza protéica ou

alguma molécula associada a proteínas, mas, deixando indefinida a classificação farmacológica do(s) princípio(s) determinante(s) de sua ação psicofarmacológica.

Foram estudadas as propriedades neurofarmacológicas do extrato fluido de *P. incarnata*. Na dose de 160 mg/kg estas propriedades foram evidentes, mas não pode estar relacionado com a presença dos alcalóides harmana, pois este está presente no extrato em quantidades mínimas (Speroni e Minghetti, 1988).

Em um estudo de caso, foram identificadas reações alérgicas em paciente que manipulava *P. alata*, apesar de não se conhecerem os agentes causadores das reações (Giavina-Bianchi *et al.*, 1997).

O flavonóide crisina (**28**) foi identificado em *Passiflora coerulea* em 1990 (Medina *et al.*, 1990).



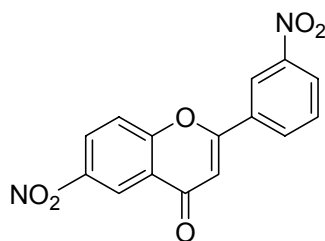
28

Os seus efeitos farmacológicos foram avaliados juntamente com o diazepam, droga reconhecidamente ansiolítica. Ambas as drogas (crisina 1 mg/kg e diazepam 0,3-0,6 mg/kg), no teste de LCE, apresentaram resultados consistentes com ações ansiolíticas. Em comparação ao diazepam, crisina possui ações ansiolíticas sem indução da sedação ou relaxamento muscular, onde postularam ser a crisina um monoflavonóide agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos (Wolfman *et al.*, 1994). Contradizendo essa teoria, Speroni *et al* (1996), não identificou crisina em *P. coerulea* e *P. incarnata* (limite de detecção 1 ppm) utilizando sistema de CLAE. Crisina

apresenta efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), mas as doses necessárias para se obter esses efeitos são muito maiores do que as detectadas nas duas espécies de maracujá.

Os efeitos na mudança do comportamento em ratos foram avaliados quando administrados intraperitonealmente os flavonóides crisina e apigenina (**12**), da *P. incarnata* e *Matricaria recutita* respectivamente. Ambos flavonóides foram capazes de reduzir a atividade locomotora em ratos (dose mínima de 25 mg/kg), enquanto que em baixas doses (1 mg/ml) somente crisina demonstrou ser ativo como ansiolítico no modelo de ansiedade claro-escuro. O efeito sedativo desses flavonóides não pode ser atribuído a uma interação com os receptores GABA-benzodiazepínicos, visto que estes estavam bloqueados por injeção prévia do antagonista benzodiazepínico flumazenil (Zanoli *et al.*, 2000).

Derivados semi-sintéticos das flavonas obtidos por introdução de halogênios, grupos nitro, ou ambos, tiveram um aumento na afinidade pelos receptores benzodiazepínicos e no seu potencial ansiolítico. O 6,3'-dinitroflavona (**29**) foi a molécula modificada derivada da flavona mais ativa. Quando administrada em ratos, teve um potente efeito no teste de LCE, mas não exibiu efeito anticonvulsivante ou miorelaxante (Wolfman *et al.*, 1996). Este estudo deixou claro que muitos flavonóides são moléculas ativadoras do SNC e modificações químicas no núcleo das flavonas aumentam consideravelmente o potencial ansiolítico (Paladini *et al.*, 1999).

**29**

O extrato fluido de *Passiflora incarnata* foi utilizado para avaliação das propriedades neurofarmacológicas em ratos. Quando utilizado intraperitonealmente, o extrato prolongou o tempo de sono, protegeu os animais dos efeitos convulsivantes do pentilenotetrazol e afetou a atividade locomotora. O extrato fluido foi particionado com éter de petróleo (fração I) e *n*-butanol (fração II). O extrato aquoso restante foi liofilizado (fração III). Duas substâncias isoladas da fração II apresentaram atividade, uma mais hidrofílica e outra mais lipofílica, sugerindo-se terem a mesma estrutura ativa, sendo a substância mais lipofílica a aglicona e a mais hidrofílica seu derivado hidroxilado ou glicosilado (Speroni e Minghetti, 1988).

A atividade antiinflamatória dos extratos etanólicos de *P. incarnata* foi investigada. Os resultados sugerem que nas doses de 125-500 mg/kg os extratos exibem atividade antiinflamatória. O estudo concluiu que *P. incarnata* é capaz de inibir formação de granuloma em ratos, apesar de sua atividade ser menor que para a droga de referência (ácido acetilsalisílico) (Borreli *et al.*, 1996).

Os efeitos antiinflamatórios de extratos aquosos das folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa* foram investigados segundo o modelo animal de pleurisia induzida por carragenina sendo que migração de leucócitos, mieloperoxidase, concentração de

óxido nítrico, níveis de fator de necrose tumoral α (FNT α) e interleucina-1- β (IL-1- β) foram os parâmetros avaliados. A migração de leucócitos foi utilizada para verificar a atividade antiinflamatória dos extratos quando os animais foram induzidos a pleurisia por bradicinina, histamina ou substância P. Na dose de 250 mg/kg (*i. p.* 30 min antes da indução do pleurisia), o extrato de *P. edulis* diminuiu a migração de leucócitos, neutrófilos, níveis de mieloperoxidase, óxido nítrico, FNT α e IL-1- β na pleurisia induzido por carragenina. Também inibiu os leucócitos totais e diferenciais na pleurisia induzida por bradicinina, histamina e substância P. Dexametasona foi utilizada como controle positivo (0,5 mg/kg) (Montanher *et al.*, 2006).

A partir de 2001, Dhawan *et al.* começaram a publicar uma série de experimentos relacionados ao gênero *Passiflora*. Durante um estudo comparativo de espécies, somente o extrato metanólico de *P. incarnata* exibiu significativa atividade ansiolítica em ratos (dose oral de 125 mg/kg), enquanto *P. edulis* não apresentou qualquer atividade ansiolítica em qualquer extrato/dose testada (éter de petróleo, clorofórmio e água) usando o modelo de LCE e diazepam como droga de referência (2 mg/kg) (Dhawan *et al.*, 2001c).

O extrato metanólico das folhas de *P. incarnata* apresenta atividade de supressão de tosse induzida por dióxido de enxofre (SO₂) em ratos, sendo essa atividade comparada a codeína, reconhecido antitussígeno opióide (Dhawan e Sharma, 2002) e atividade afrodisíaca nas doses de 100 mg/kg (ratos machos via oral) (Dhawan *et al.*, 2003b).

Foi avaliado o efeito ansiolítico de extratos de vários órgãos vegetais de *P. incarnata* usando o teste LCE. O extrato metanólico das raízes dessa planta é

praticamente destituído de efeitos ansiolíticos. Isso indica que inflorescências e raízes presentes como adulterantes devem ser separadas das partes aéreas antes de qualquer estudo farmacológico e/ou fitoquímico para se obter os melhores resultados (Dhawan *et al.*, 2001b).

Uma das frações derivadas do extrato metanólico de *P. incarnata* exibiu significativa atividade ansiolítica em ratos na dose de 10 mg/kg utilizando o modelo LCE, sendo a substância presente na fração um derivado benzoflavônico trissubstituído (Dhawan *et al.*, 2001a), chamado de BZF o qual não foi apresentado por motivos de patente.

Essa mesma substância amenizou os efeitos da abstinência de etanol em ratos. Todos os grupos tiveram administração de álcool na dose de 2 g/kg durante 6 dias. A substância BZF foi administrada juntamente com o álcool (10, 20 e 50 mg/kg de BZF) (grupo 1, 2 e 3) ou agudamente (10, 20 e 50 mg/kg) (grupos 4, 5 e 6), após os seis dias. Foram avaliados no LCE, e todos os grupos foram efetivos em diminuir os efeitos da abstinência nos animais que pode ser medido pela diminuição da ansiedade (Dhawan *et al.*, 2002b). A mesma substância se mostrou útil em evitar o desenvolvimento de tolerância em ratos em administração crônica de canabinóides (Δ^9 -THC) quando administrados juntos (Dhawan *et al.*, 2002a). A própria substância BZF foi avaliada em relação à chance de causar sintomas após abstinência e concluiu-se ser a substância BZF livre de qualquer risco de tolerância ou dependência (Dhawan *et al.*, 2003a).

Turnera aphrodisiaca Ward, Turneraceae, a qual é usada popularmente como ansiolítica e afrodisíaca, seguiu um fracionamento biomonitorado com o objetivo de encontrar o constituinte químico responsável por essa atividade. Do seu extrato

metanólico isolou-se a 5,7,4'-tri-hidroxi-flavona (apigenina), também presente em espécies de *Passiflora*, que exibiu atividade significativa em ratos (2 mg/kg v.o.) no modelo de ansiedade LCE, o qual os pesquisadores atribuíram ser a substância responsável pelos seus efeitos ansiolíticos (Kumar e Sharma, 2006).

Shinomiya *et al.* (2005), avaliou a atividade hipnótica de extratos aquosos de camomila (*Matricaria chamomilla*) e maracujá (*P. incarnata*) utilizando modelo animal de distúrbio do sono. O extrato de maracujá não mostrou efeitos de latência para o sono até mesmo na dose de 3000 mg/kg, enquanto a camomila apresentou atividade na dose de 300 mg/kg.

As pessoas utilizam os frutos de *P. edulis* para fazer suco, mas a casca é descartada. Utilizando extrato metanólico das cascas de *P. edulis* foi avaliada a diminuição da pressão arterial (sistólica) em ratos. Os extratos (10 e 50 mg/kg) e luteolina (50 mg/kg) foram administrados oralmente e foram capazes de atuar como antihipertensivos. O extrato foi avaliado quanto à presença e quantidade de polifenóis e GABA, sendo o efeito antihipertensivo do extrato de *P. edulis* atribuído ao efeito de GABA e parcialmente ao efeito dos polifenóis que possuem reconhecida atividade vasodilatadora (Ichimura *et al.*, 2006).

Apesar de todos esses estudos apresentados, a(s) substância(s) ativa(s) responsável (is) pela atividade sedativa e ansiolítica de *Passiflora* spp. não foram identificadas até o momento (Reginatto *et al.*, 2006).

A espécie *Passiflora actinia*

A espécie a ser estudada neste trabalho é *Passiflora actinia* Hook., uma das diversas espécies nativas da flora brasileira. A espécie é conhecida popularmente como maracujá-do-mato (Santos *et al.*, 2005). Na medicina popular as folhas são usadas como ansiolítica e sedativa, e os frutos, como suco, apesar de serem poucos os estudos químicos e farmacológicos a respeito da espécie até o presente momento. A posição sistemática da espécie encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1: Posição sistemática da espécie *Passiflora actinia* segundo Engler e Cronquist

Segundo Engler (Joly, 1998)		Segundo Cronquist (1988)	
Divisão:	Angiospermae (Anthophyta)	Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Dicotyledoneae	Classe:	Magnoliopsida
Subclasse:	Archichlamydeae	Subclasse:	Dilleniidae
Ordem:	Violales	Ordem:	Violales
Família:	Passifloraceae	Família:	Passifloraceae
Gênero:	<i>Passiflora</i>	Gênero:	<i>Passiflora</i>
Espécie:	<i>Passiflora actinia</i> Hooker	Espécie:	<i>Passiflora actinia</i> Hooker

Esta é uma espécie típica de Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) e Mista (Mata com Araucária). Cresce no interior ou borda de florestas até seus ramos atingirem a parte mais alta e exposta à luz. Tem sua ocorrência no Brasil observada nos estados do Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) (Figura 1) (Lorenz, 2002).

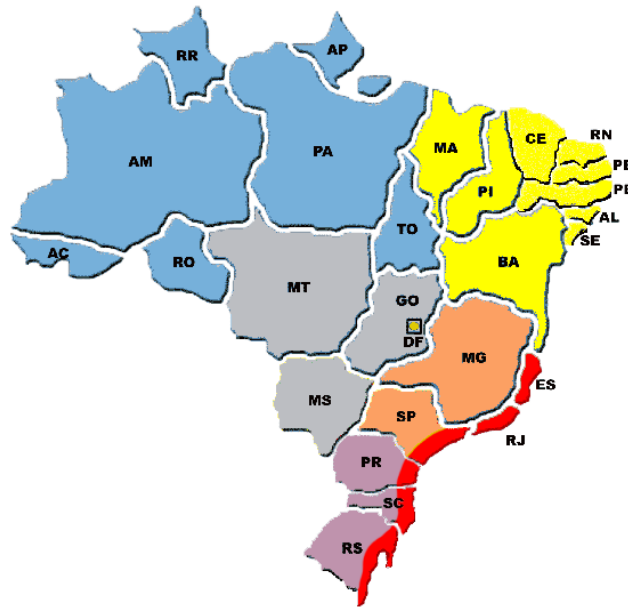


Figura 1: Distribuição geográfica da espécie *Passiflora actinia* no Brasil, destacados em vermelho.

Estudos prévios de *Passiflora actinia*

Kurtz, em 2001, iniciou os trabalhos com *P. actinia* (Figura 2) no Grupo de Pesquisa em Farmacognosia da UFPR. Realizou estudo morfo-anatômico e investigação dos constituintes alcalóidicos das suas folhas. A análise morfo-anatômica das folhas revelou um contorno oval, margem lisa, ápice obtuso, base arredondada e limbo inteiro. Observou-se que a face abaxial da epiderme é papilosa, o mesofilo é dorsiventral, os feixes vasculares são colaterais e idioblastos contendo drusas estão distribuídos no parênquima foliar. Análise por CLAE demonstrou a presença de traços do alcalóide harmana (7) na fração alcalóidica, dentre os cinco principais padrões

analisados: harmana (7), harmina (8), harmalina (9), harmalol (10) e harmol (11) encontrados em *Passiflora* (Kurtz, 2001; Kurtz *et al.*, 2003).

Santos, em análise comparativa em CLAE das espécies *P. incarnata*, *P. alata* e *P. actinia*, sugeriu que o perfil cromatográfico de *P. actinia* tem maior semelhança com *P. incarnata* do que com *P. alata*. Com o fracionamento do extrato metanol-água, foi observado que a fração flavonoídica é constituída majoritariamente pela isovitexina (17), enquanto que a fração alcaloídica, praticamente isenta de flavonóides, não mostrou presença dos alcalóides β -carbolínicos clássicos e pode ser constituída por alcalóides quaternários (Santos, 2003).

Reginatto (2000) comparando por CCD sete extratos de espécies de *Passiflora*, identificou manchas com R_f semelhantes aos padrões dos flavonóides isoorientina (15) e isovitexina (17) em *P. actinia*. Não foram encontradas saponinas em *P. actinia* por análise em CCD nos extratos etanólicos (Reginatto *et al.*, 2001).

Utilizando método de extração em alta velocidade, solução aquosa de metanol a 20% como solvente e HPLC, foram identificados e quantificados para a espécie *P. actinia* os alcalóides harmol, harmana, harmalina e harmina nas quantidades de 0,04; 0,08; 0,08 e 0,16 ppm respectivamente (Abourashed *et al.*, 2003). Os flavonóides presentes em extrato metanol:água (4:1) de *P. actinia*, foram identificados e quantificados em HPLC como sendo shaftosídeo/isoshaftosídeo (0,08%) e isovitexina (0,16%) (Abourashed *et al.*, 2002).



Figura 2: Aspecto geral de *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae.

Os primeiros ensaios farmacológicos com a espécie *P. actinia* foram realizados utilizando a via intraperitoneal (*i. p.*) como forma de administração dos extratos. A administração do extrato bruto hidroalcoólico de *P. actinia* em camundongos, em doses inferiores a 1800 mg/kg, não resultou em toxicidade aparente. Através dos métodos LCE e CA, foi observado um efeito sedativo com o extrato hidroalcoólico bruto (100-300 mg/kg), extrato metanólico (300-600 mg/kg) e fração aquosa do extrato metanólico (100-300 mg/kg), sendo que apenas este último também apresentou seletiva atividade ansiolítica na dose de 30 mg/kg. Os efeitos sedativos puderam ser evidenciados por uma diminuição no número de entrada nos braços abertos e fechados no teste de LCE e uma diminuição na atividade motora como um todo, evidenciada pelo teste de CA (Santos, 2003; Santos *et al.*, 2006). Os animais tratados com os extratos e frações avaliadas em relação à atividade ansiolítica apresentaram uma postura anormal em

comparação com os animais controle. Esse dado indica a ocorrência de catalepsia em ratos, que é usado para prever a atividade tranqüilizante (Santos *et al.*, 2005).

Os extratos hidroalcoólicos (300 e 600 mg/kg) e metanólicos (100 e 300 mg/kg) de *P. actinia* resultaram em efeitos ansiolíticos em tratamento agudo *v. o.* Quando administrados primeiramente com flumazenil, um antagonista dos receptores benzodiazepínicos GABA_A, a atividade ansiolítica dos extratos metanólico e hidroalcoólico foi diminuída, sugerindo que os efeitos de atividade ansiolítica desses extratos possa se dar por ligação a esses receptores. Nas suas maiores doses, os extratos foram capazes de potencializar o sono induzido por pentobarbital (Lolli *et al.*, 2007).

Dar continuidade aos trabalhos já realizados buscando um melhor conhecimento da *P. actinia* que é facilmente cultivada na região Sul do Brasil e procurar determinar quais são o(s) seu(s) constituinte(s) químico(s) com potencial atividade ansiolítica e/ou sedativa, justificam a escolha da referida espécie.

OBJETIVOS

- Identificar e quantificar os constituintes químicos da *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae.
- Identificar os extratos e frações farmacologicamente ativas em relação ao poder sedativo e ansiolítico.
- Determinar metodologia em CLAE para separação de substâncias em *P. actinia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Para a realização das análises cromatográficas em CCD analítica e preparativa dos extratos e frações de *P. actinia* foram utilizadas placas pré-ativadas Merck com fase estacionária Kiesegel 60 (F₂₅₄). Foram utilizadas as fases móveis EtOAc:HCO₂H:H₂O (6:1:1); EtOAc:HCO₂H:H₂O (8:1:1); DCM:EtOH (1:1) e tolueno:EtOAc (1:1), observadas em câmara de luz de UV ondas longas (365 nm) e ondas curtas (254 nm) e solução de ácido fosfomolibdico 10% em EtOH, reagente de anisaldeído-sulfúrico e solução reagente de NEU (difenilboriloxietilamina 1% em EtOH), preparados segundo Wagner e Blatt (1996) foram usados como reveladores.

As colunas cromatográficas foram realizadas em Sílica Gel 60G 70-230 mesh (Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia) ou Amberlite XAD-16 (Aldrich).

As análises em CLAE foram realizadas em equipamento Varian, bomba Prostar 210 (série 02038), detector UV-VIS Prostar 320 (série 01453), módulo organizador, válvula rheodyne, Programa Workstation Star 6.0. Foi utilizada coluna Microsorb-MV 100 C-18 de 250 mm, tamanho de partícula de 5 µm e diâmetro interno de 4,6 mm. O *loop* foi de 20 µl. Os solventes utilizados em todos os procedimentos cromatográficos utilizando CLAE foram grau HPLC. A água utilizada foi purificada no sistema Puritech/Permutation PT0020, filtro de 0,2 µm, apresentando também alto grau de pureza. Para as amostras sólidas, foram preparadas soluções de concentração 1 mg/ml em líquido diluente MeOH/H₂O (1:1). Para as amostras líquidas, foram preparadas solução na

proporção 1:10 (extrato:líquido diluente). Antes de serem injetadas no equipamento de CLAE foram filtradas em membrana de celulose regenerada com poros de abertura 0,22 μm da millipore. Padrões de vitexina (0,1 mg/ml), isovitexina (0,1 mg/ml) e orientina (0,1 mg/ml) foram diluídos em MeOH.

Os extratos liofilizados foram realizados em equipamento Labconco freeze dryer 4,5. Os espectros de absorção no UV foram realizados em equipamento Shimadzu UV-1601. Espectrômetro Bruker 400 MHz, do Departamento de Química da UFPR foi utilizado na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN). Foram utilizados CDCl_3 (Aldrich), MeOD (Cambridge Isotope Laboratories, Ind.) e D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Ind.) como solventes.

Solventes e reagente foram purificados quando necessário por métodos padronizados (Armarego e Perrin, 1996).

Reação de acetilação

Para realização da reação de acetilação foram utilizados anidrido acético (10 ml/g de extrato) e piridina (5 ml/g de extrato). A solução reagente foi deixada por 12 h à temperatura ambiente e após este período o material evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida, com auxílio de tolueno para obtenção de mistura azeotrópica. O resíduo foi ressuspenso em CHCl_3 , lavado 2-3 vezes com solução de HCl 5% e 2-3 vezes com H_2O . A porção orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O material foi então filtrado através de óxido de alumínio Merck, atividade II-III padronizado segundo Brockmann, deativada com

$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (5 ml solução a 10% de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/100$ g de alumina) para posterior realização de procedimentos cromatográficos.

Separação cromatográfica em Sephadex LH-20

As colunas cromatográficas que foram utilizadas para separação em Sephadex LH-20 foram de três tamanhos. A primeira de 90 cm (65 cm de altura de fase estacionária) e 2 cm de diâmetro que foi chamada de SP_{maior} . A segunda de 80 cm (45 cm de altura de fase estacionária) e 1,5 cm de diâmetro e foi chamada de SP_{menor} . A terceira de 40 cm de altura (20 cm de altura de fase estacionária) e 2 cm de diâmetro e foi chamada de SP_{mini} . Todas foram empacotadas com MeOH após o Sephadex ter sido deixado em repouso com solvente por 3 h. O empacotamento foi realizado cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar que interferissem com o fluxo de fase móvel na coluna. Em todas as separações a fase móvel utilizada foi MeOH.

Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16

Foi utilizada a proporção de 1:10 (amostra:resina), sendo o extrato/fração solubilizado em H_2O . A eluição foi feita com H_2O , $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 5%, $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 10% e $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 20%.

Material botânico

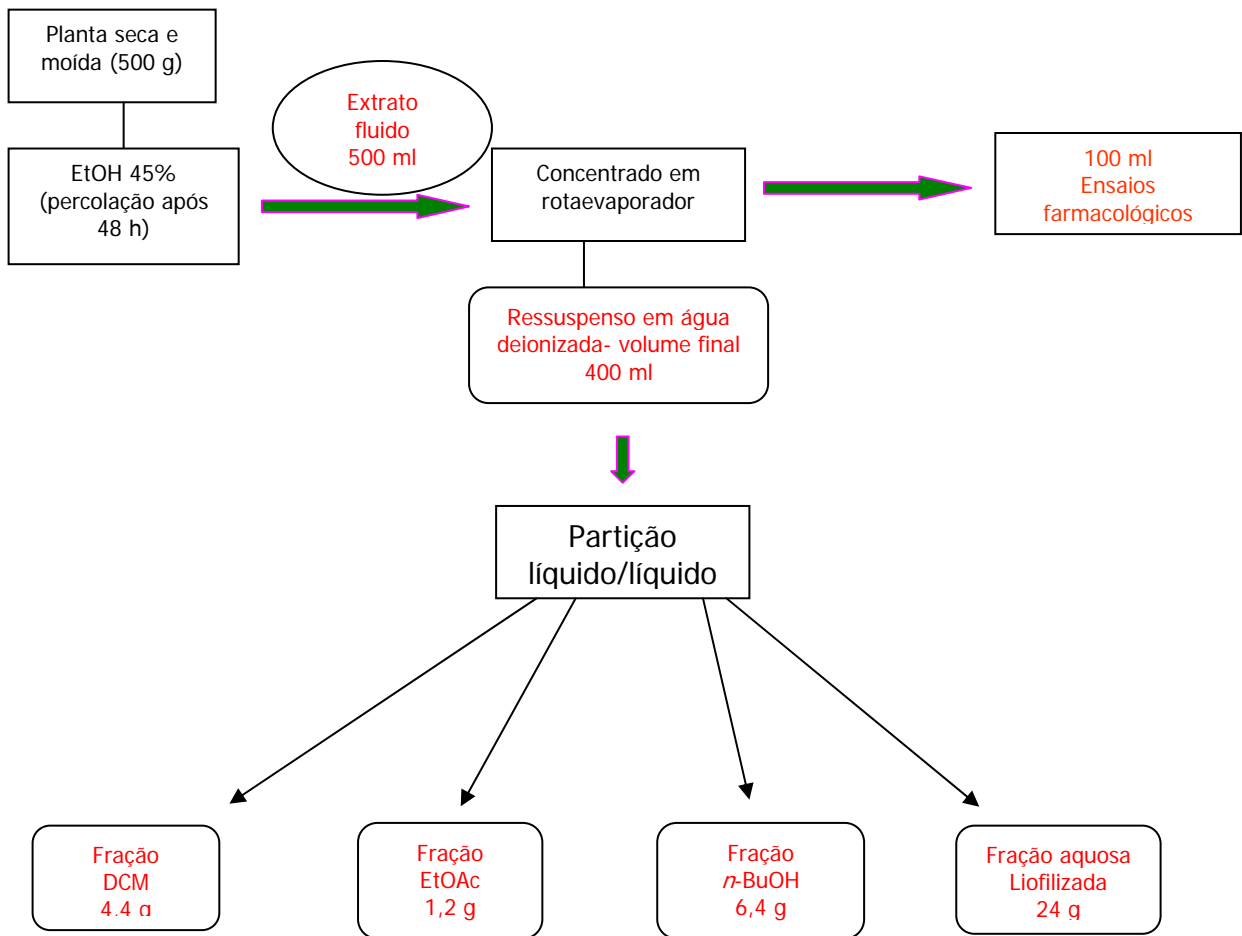
O material vegetal foi coletado na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em outubro de 2005 (20 kg). As folhas frescas

(9 kg) de *Passiflora actinia* Hook. foram estabilizadas por secagem em estufa a 45 °C (30% de rendimento) e pulverizadas, obtendo-se material seco (2,7 kg). O tamanho das partículas de pó foi padronizado em tamis de abertura 250 µm. A amostra coletada está registrada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob N° UCPB 30.831.

Preparo dos extratos

Extrato fluido e frações

O extrato fluido (500 ml) foi preparado segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 2.ed. utilizando como líquido extrator sol. de EtOH 45% (Newall *et al.*, 1996). Parte do extrato fluido (100 ml) foi guardado em geladeira, o restante foi concentrado em rotaevaporador, ressuspenso em água (volume final de 400 ml) e fracionado utilizando solventes de diversas polaridades (DCM, EtOAc, *n*-BuOH) em funil de separação (3x 100 ml) (Esquema 1). Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C, obtendo-se rendimento de 4,4 g para a fração DCM, 1,2 g para a EtOAc, 6,4 g para *n*-but e 24 g para a fração aquosa restante, a qual foi liofilizada. O extrato fluido (100 ml) foi utilizado para realização de ensaios farmacológicos em modelos de ansiedade (Lolli *et al.*, 2007).

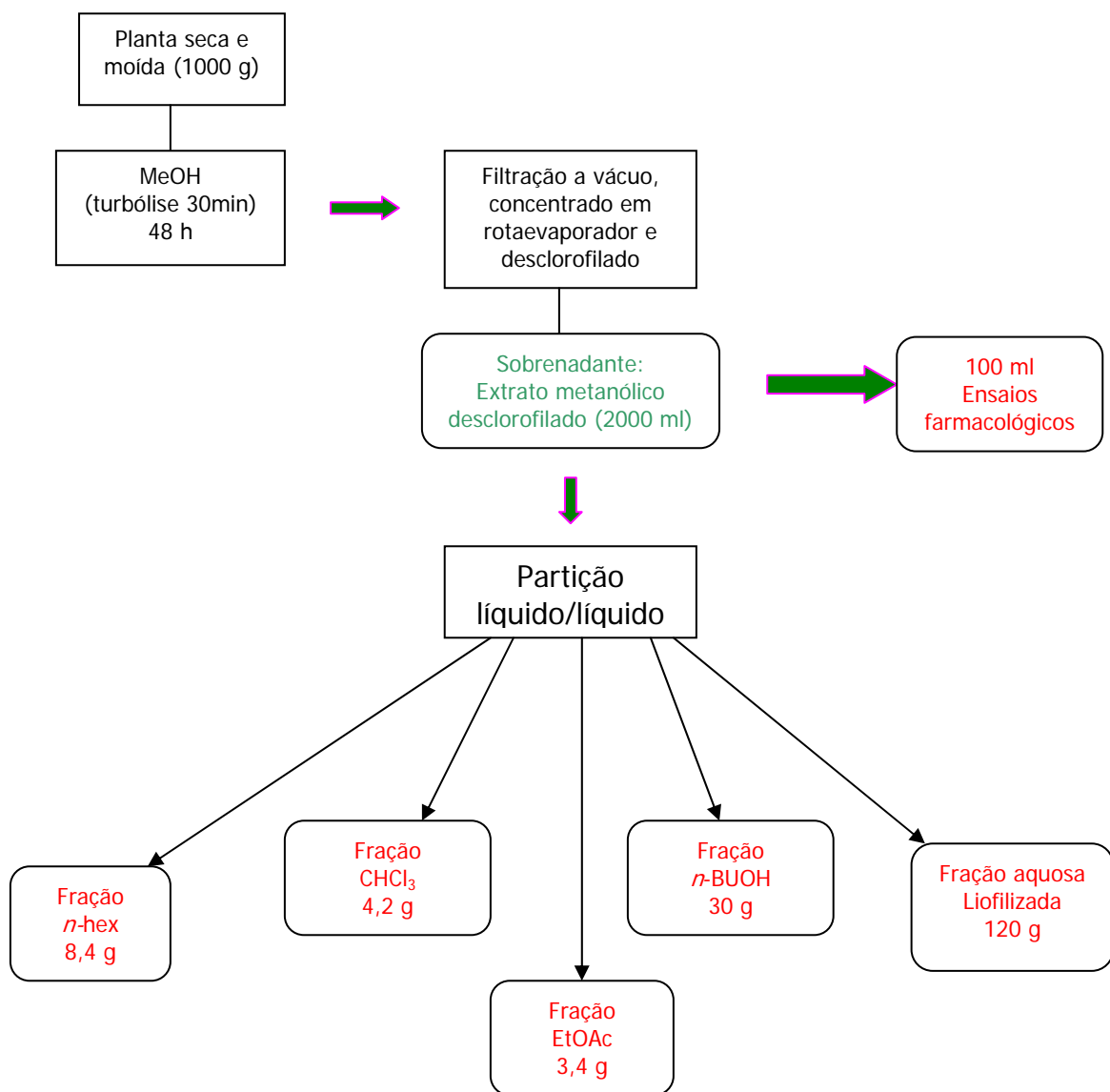


Esquema 2: Fluxograma do preparo do extrato fluido e fracionamento do extrato de *P. actinia*

Extrato metanólico e frações

O extrato metanólico foi obtido pela técnica de turbólise. Em equipamento apropriado, foi adicionado a droga vegetal (1 kg) e metanol (5x 2 l). Este material sofreu extração por 30 min e a cada 48 h, filtrado em sistema de filtração a vácuo. O MeOH foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C, obtendo-se um rendimento de 240 g de extrato/kg de folhas secas. O resíduo foi ressuspensa em água (1:8) e desclorofilado por agitação com água gelada por 8 h, seguido de filtração do material gorduroso. O filtrado foi chamado de extrato metanólico desclorofilado. Parte

do extrato metanólico desclorofilado (100 ml) foi guardado para realização de ensaios farmacológicos. O restante foi utilizado em fracionamento utilizando solventes (3x 300 ml) de diversas polaridades (*n*-hex, CHCl_3 , EtOAc e *n*-BuOH) em funil de separação (partição líquido/líquido), concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C obtendo-se as frações *n*-hex (8,4 g), CHCl_3 (4,2 g), EtOAc (3,4 g), *n*-BuOH (30 g). A fração aquosa foi liofilizada (120 g) (Esquema 2).



Esquema 3: Fluxograma de preparo do extrato metanólico e fracionamento de *P. actinia*

Técnica de CLAE

Para a avaliação do perfil cromatográfico dos extratos e frações de *Passiflora actinia* em CLAE foi necessário otimizar as condições cromatográficas, incluindo fase móvel e fluxo. A fase móvel aquosa escolhida para as separações analíticas foi uma mistura de solvente A (HCO₂H 2%) e solvente B (CH₃CN) (87:13) e fluxo de fase móvel de 1,2 ml/min.

Separação da fração *n*-BuOH

Isolamento da substância ACT₂₄

O material acetilado da fração *n*-BuOH do extrato metanólico desclorofilado (0,7 g) (Esquema 2) foi utilizado para isolar a substância ACT₂₄. Foram realizadas duas CC com Sílica Gel 60G. A primeira CC foi realizada utilizando Sílica Gel (20 g) em uma coluna de 25 cm de altura e diâmetro 2,5 cm. Sua eluição foi feita com ciclohexano, ciclohexano-DCM (1:1), DCM-CHCl₃ (1:1) CHCl₃ e CHCl₃-MeOH (9,9:0,1 - 9,8:0,2 - 9,7:0,3 - 9,6:0,4 - 9,5:0,5 - 9:1 - 8,5:1,5 - 4:1 - 3:1 - 7:3). Foram coletadas frações de 8 ml e após observação em CCD foram reunidas as semelhantes dando origem as frações mais apolares 1-85 (F1_{15/03}) e as frações mais polares 86-300 (F2_{15/03}). F1_{15/03} (570 mg) foi novamente submetida à cromatografia em coluna de Sílica Gel, desta vez em tamanho menor (20 cm) e de menor diâmetro (1,5 cm). As coletas foram realizadas de 100 em 100 ml. A fase móvel utilizada foi um gradiente de ciclohexano-DCM onde foi aumentando a concentração de DCM de 10 em 10%. As frações 12-16 apresentaram

uma mancha majoritária de R_f 0,54 em CCD quando utilizado eluente tolueno-DCM (3:1) e revelador ácido fosfomolibdico. Estas foram então agrupadas e submetidas à CCD preparativa Merck (20x20 cm) utilizando tolueno-DCM (1:1) como eluente. A substância isolada foi então chamada de ACT₂₄. A substância foi avaliada em experimentos de ¹H- e ¹³C- RMN utilizando CDCl₃ como solvente.

Fração SP-HPLC1

Parte da fração *n*-BuOH (2,5 g) (Esquema 2) foi utilizada para realização de separação em Sephadex utilizando a coluna SP_{maior}. Frações (147) de 4 ml foram coletadas com fluxo de 3 ml/min, onde, após comparação dos seus perfis cromatográficos foram reunidas em quatro subfrações e chamadas de SP₅/*n*-but (F_{1,2,3,4,5}). A fração SP₅/*n*-but F₃ (1,1 g) dessa coluna foi submetida a uma segunda cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 (SP_{menor}). Foram coletadas frações de 4 ml e as semelhantes foram reunidas e deram origem a seis subfrações chamadas de SP₆/F₃SP₅ (F_{1,2,3,4,5} e 6). As frações SP₅/*n*-but F₄ e SP₆/F₃ SP₅ F₅ que apresentavam perfil cromatográfico semelhante foram reunidas e foi chamada de fração SP-HPLC1 (690 mg). Essa fração foi ainda submetida à CC em Sephadex na coluna SP_{mini} sucessivas vezes, não obtendo-se boa separação. A fração SP₆/F₃ SP₅ F₆ (295 mg) apresentou em CCD, FM EtOAc-HCO₂H-H₂O (6:1:1), apenas uma substância quando revelada com anisaldeído sulfúrico. Experimentos em RMN foram realizados utilizando MeOD como solvente.

Separação da fração aquosa

Fracionamento da fração aquosa liofilizada

O fracionamento da fração aquosa liofilizada do extrato metanólico desclorofilada (Esquema 2) foi realizado em coluna a vácuo utilizando como fase estacionária Sílica Gel 60G para cromatografia em camada delgada. A amostra foi preparada solubilizando o extrato (5 g) em MeOH e posterior incorporação na própria sílica em separado. A coluna utilizada foi um funil de vidro sinterizado de 4 cm de diâmetro, tamanho de poro G3, altura de 7 cm acoplada a um kitasato. A fase móvel utilizada foi um gradiente de DCM em EtOH, iniciando-se com DCM 100% (100 ml), DCM:EtOH 10% (100 ml), e assim sucessivamente até chegar a EtOH 100%. Onze frações foram coletadas, chamadas de frações 1-11 da CV. Foram realizadas duas colunas a vácuo e foram denominadas de CV₂ e CV₃. A CV₂ deu origem a onze subfrações e as semelhantes reunidas após análise em CCD utilizando revelador anisaldeído sulfúrico em (1-8), (9-10) e 11. A CV₃ gerou onze frações as quais foram reunidas em 1, 2, 3, (4, 5, 6), (7, 8, 9) e (10,11).

Coluna CV₃ e subfrações

As subfrações (4, 5, 6) (680 mg) e (7, 8, 9) (1 g) da coluna CV₃ foram acetiladas separadamente e cada uma foi utilizada para separação em coluna cromatográfica. A fração ACT 4, 5,6 CV₃ (500 mg) foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel 60G como fase estacionária utilizando coluna de 20 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro. A fase móvel foi inicialmente tolueno e um aumento gradual de EtOAc. Foram coletadas

127 frações de 4 ml e reunidas em cinco subfrações, das quais da fração 1 (1-39) foi separada a substância ACT₄₃ que apresentava uma mancha em CCD. Análise em ¹H-RMN utilizando CDCl₃ como solvente mostrou que a amostra não estava pura, sendo difícil a identificação.

A fração ACT 7, 8, 9 CV₃ (770 mg) foi submetida à coluna cromatográfica nas mesmas condições que a fração ACT 4, 5, 6 CV₃. As frações semelhantes foram reunidas em sete subfrações. A fração (29-47) cristalizou, sendo que seus cristais após filtração em coluna de sílica foram recristalizados com CHCl₃ (30 mg). Análise em RMN foi realizada utilizando CDCl₃ como solvente, mas mostrou-se tratar-se de uma mistura, não sendo possível a sua identificação.

Coluna CV_{2, 3} (todas)

As frações ACT 7, 8, 9 CV₃ (1,0 g), ACT 10, 11 CV₃ (580 mg) e ACT 9, 10 CV₂ (620 mg) por apresentarem perfil cromatográfico em CCD semelhantes foram reunidas. O material (2,2 g) foi utilizado para realização de coluna cromatográfica utilizando Sílica Gel 60G como fase estacionária em uma coluna de 1,5 cm de diâmetro e 40 cm de altura e a eluição foi realizada inicialmente com tolueno com um aumento gradual de EtOAc. As frações coletadas (8 ml) foram analisadas em CCD (FM tolueno-EtOAc 1:1) e as amostras semelhantes foram reunidas. As primeiras frações (1-22) formaram um precipitado, o qual foi analisado em ¹H-, ¹³C-RMN.

Separação cromatográfica em Sephadex LH-20

A primeira coluna (SP_1) foi utilizando SP_{menor} e 2,5 g da fração aquosa. Foram coletadas frações de 50 ml utilizando MeOH como eluente. A fração F_3SP_1 (470 mg) foi submetida novamente a cromatografia em SP_{menor} . Foram coletadas 118 frações de 2 ml. As semelhantes foram reunidas e dessas sub-frações foram separadas duas que foram chamadas de $SP_4(F_3-SP_1)F_1$ e $SP_4(F_3-SP_1)F_2$.

Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16

As frações $SP_4(F_3-SP_1)F_1$ e $SP_4(F_3-SP_1)F_2$ foram reunidas (300 mg) e realizada separação em Amberlite. A eluição foi feita com H_2O , $H_2O:EtOH$ 5%, $H_2O:EtOH$ 10% e $H_2O:EtOH$ 20%. Uma mancha de coloração azul quando revelada com anisaldeído sulfúrico presente em quase todas as frações dessa separação, foi separada das demais substâncias por CCD preparativa utilizando $EtOAc-HCO_2H-H_2O$ (5:1:1) como fase móvel. Não foi possível a identificação em RMN da substância isolada (AMB-BLUE) devido a pouca quantidade do material obtido (12 mg).

Separação cromatográfica em resina Amberlite XAD-16/Sephadex

Foi realizada uma separação com a fração aquosa (10 g) (Esquema 2) em 100 g de Amberlite XAD-16 (coluna AMB-FLO), do qual foram obtidas cinquenta frações de 75 ml cada. O acompanhamento da coluna foi realizado por comparação dos perfis cromatográficos das frações e as semelhantes foram agrupadas, obtendo-se assim nove subfrações. A fração 1 (F_1) (7 g) apresentou uma substância de coloração rosa quando revelada com anisaldeído sulfúrico. Com o objetivo de isolar essa substância,

parte desse material (1 g) foi utilizado para separações em Sephadex (SP_{mini}), obtendo-se 33 frações de 4 ml da primeira coluna, das quais por agrupamento das semelhantes foram agrupadas em três subfrações. Uma dessas subfrações (F₃ 10-33) (0,3 g) foi submetida novamente à cromatografia em Sephadex, e foram recolhidas 39 frações de 4 ml. As frações de número 15-21 apresentavam perfis semelhantes, e quando agrupadas formaram cristais. Os cristais foram analisados em experimentos em equipamento de RMN utilizando D₂O como solvente.

Reação de hidrólise ácida

A fração F₁ da coluna AMB-FLO foi submetida à reação de hidrólise ácida utilizando HCl 1% e metodologia adaptada de (Weissenberg, 2001). Foi utilizada a proporção de 1:3:2:1 de fração-tolueno-H₂O-HCl conc. em refluxo por 6 h. A fração orgânica foi recolhida e a aquosa foi extraída 3x 6 ml com tolueno. As frações tolueno foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas em rotaevaporador dando origem à F₁ (AMB-FLO) hidrolizada a qual foi comparada em CCD com a F₁ sem hidrolizar e com o ácido *p*-cumárico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extrato fluido e metanólico desclorofilado

Os pesquisadores de química de produtos naturais normalmente preferem trabalhar com produtos de baixa e média polaridade. Esta preferência é justificada pela maior solubilidade dessas substâncias em solventes voláteis (p.e. < 100°C), fato que facilita a remoção destes após os processos de fracionamento e purificação, através das técnicas cromatográficas entre outras, ou mesmo após análises espectrométricas (Chaves *et al.*, 2000).

Os extratos e frações de *Passiflora actinia* Hooker foram estudados quimicamente e biomonitoradas em relação à atividade sedativa e ansiolítica em modelos animais. Nas frações bioativas espera-se encontrar a (s) substância (s) química (s) responsável (is) por esta atividade. Estudo realizado por Santos, (2003) encontrou atividade farmacológica nas frações mais polares, como *n*-BuOH e aquosa, sendo essas as frações de interesse no presente estudo.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a CLAE é a utilização de fases estacionárias com micropartículas esféricas, de preferência. Estas fases, por serem muito permeáveis, tornam necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel. A utilização destas novas fases estacionárias, associada ao

desenvolvimento da instrumentação, levou esta técnica a um melhor desempenho em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise (Cass e Degani, 2001).

A técnica de CLAE pode também ser útil para realizar o *fingerprint* de diversas espécies vegetais. Isso trás uma grande quantidade de informações, incluindo autenticidade da amostra, determinação de marcadores taxonômicos, identificação de constituintes padrões relacionados com a localidade da planta, suporte para estudos genéticos (espécies híbridas), diferenças entre espécies que possuem semelhanças anatômicas e atividades biológicas relacionadas ao perfil fitoquímico (Abourashed *et al.*, 2002).

O perfil cromatográfico dos extratos e das frações de *P. actinia* foi realizado em CLAE. Seguindo a metodologia proposta por Pereira *et al.* (2004), adaptações foram feitas para atender as condições existentes visto que a metodologia proposta utiliza o modo gradiente e o equipamento utilizado permite apenas o modo isocrático. Os extratos analisados foram o fluido e metanólico desclorofilado e os padrões vitexina (**16**) e isovitexina (**17**) foram utilizados para verificar sua presença nas folhas da planta.

A Tabela 1 sintetiza o que foi realizado nas diversas etapas de otimização da metodologia, sendo solvente A sol. aquosa HCO₂H 2% e solvente B CH₃CN. Em detalhe as modificações que foram realizadas entre uma etapa e outra. Para o extrato fluido o melhor sistema cromatográfico encontrado para separação analítica foi solvente A-solvente B (87:13) e fluxo de 1,2 ml/min (Figura 3).

Tabela 1. Etapas de otimização da metodologia de CLAE para extratos e frações de *P. actinia*.

Fase	Fase móvel (FM) solvente A:solvente B	Fluxo de FM
1	(80:20)	1ml/min
2	(80:20)	0,8ml/min
3	(85:15)	0,8ml/min
4	(85:15)	1,0ml/min
5	(87:13)	0,8ml/min
6	(87:13)	1,0ml/min
7	(87:13)	1,2ml/min

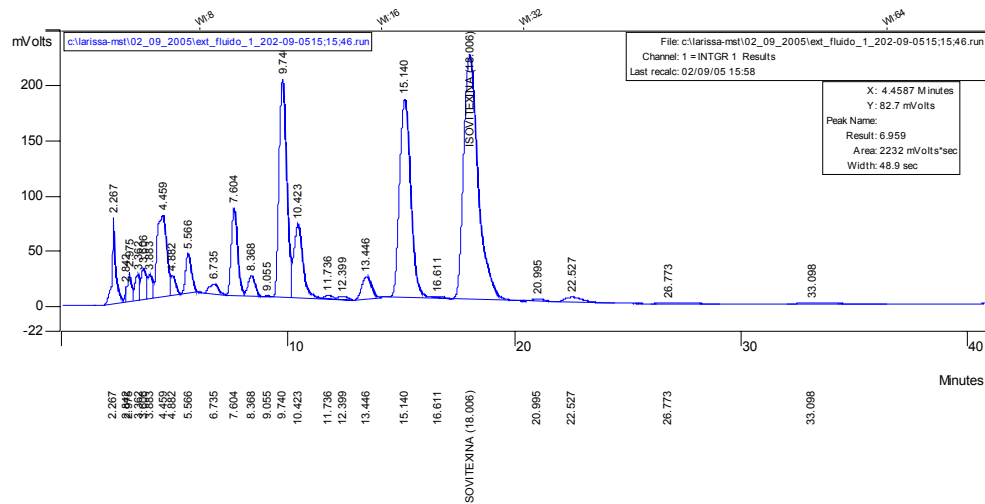


Figura 3: Cromatograma do extrato fluido de *P. actinia* obtido na sétima fase de otimização da metodologia em CLAE. FM: sol. aquosa HCO₂H 2%:CH₃CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm.

Após análise dos cromatogramas (Figura 3) confirmou-se que o flavonóide vitexina (16,8 min) não está presente na espécie em questão estudada, ou se presente sua quantidade é muito pequena (traços). Abourashed *et al.* (2002) em seu estudo (*fingerprint*) utilizando a técnica de CLAE em extratos de 115 espécies de *Passiflora*, sendo uma delas a *P. actinia*, relata a presença somente dos flavonóides

shaftosídeo/isoshaftosídeo e isovitexina para a espécie, não detectando também vitexina na *P. actinia*.

Por comparação do tempo de retenção dos picos dos padrões com os picos encontrados nos cromatogramas dos extratos verificou-se a presença de isovitexina ($t_r=18,189$) (Figura 4), o qual por adição de padrão confirmou-se a presença do flavonóide. Ao analisar o cromatograma (Figura 5) verifica-se que o pico da isovitexina diminuiu como todos os outros picos, em função do padrão adicionado estar em solução. Mesmo assim pode-se confirmar que o que aparece no cromatograma do extrato fluido é a isovitexina, pois nenhum outro pico aparece no cromatograma de adição de padrão (Figura 5).

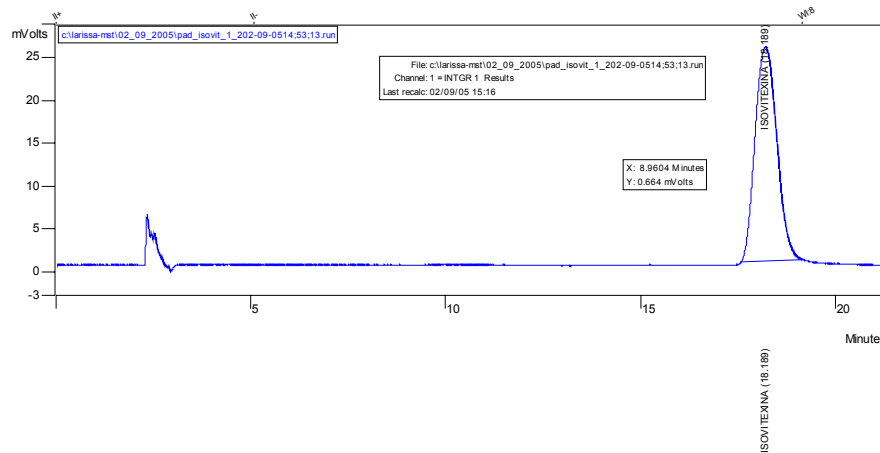


Figura 4: Cromatograma do padrão isovitexina em CLAE. FM: sol. aquosa HCO_2H 2%: CH_3CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm.

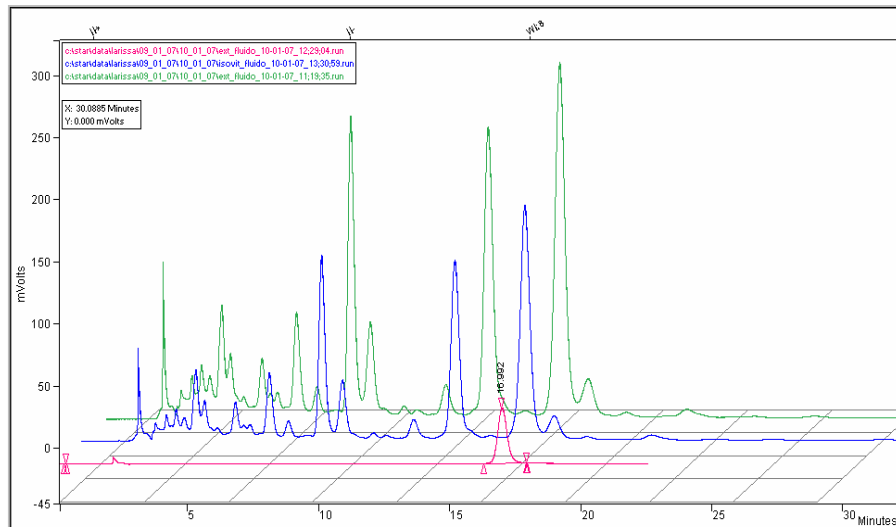


Figura 5: Cromatograma do extrato fluido de *P. actinia* (■), extrato fluido adicionado de padrão de isovitexina (■) e padrão isovitexina (■) em CLAE. FM- sol. aquosa HCO₂H 2%-CH₃CN 87:13, fluxo 1,2 ml /min e $\lambda=340$ nm.

Foi realizada análise em CLAE do extrato metanólico desclorofilado de *P. actinia* (Figura 6). Em comparação com o extrato fluido (Figura 3), ambos apresentam o mesmo perfil cromatográfico, confirmando-se que o solvente escolhido para a extração e fracionamento, extrai os mesmos marcadores químicos.

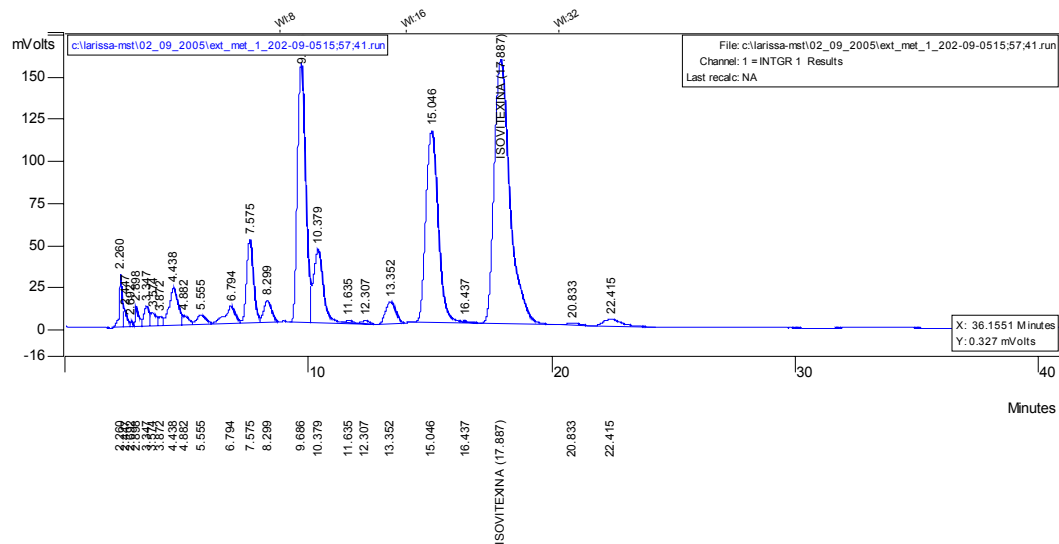


Figura 6: Cromatograma do extrato metanólico desclorofilado de *P. actinia* em CLAE. FM: sol. aquosa HCO₂H 2%-CH₃CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e $\lambda=340$ nm.

Os mesmos resultados foram observados para o extrato metanólico desclorofilado obtido por extração a quente em equipamento de Soxhlet (Santos, 2003). Isso demonstra que a temperatura utilizada na extração não interfere com a composição química, pelo menos em relação às substâncias flavonoídicas. Esse mesmo autor verificou em análise cromatográfica em CLAE dos extratos metanólicos desclorofilados de *P. actinia*, *P. alata* e *P. incarnata* uma maior similaridade da *P. actinia* com a espécie importada *P. incarnata* do que com *P. alata* (oficial no Brasil), sugerindo-se dessa forma, pelo menos em relação à ótica química, que poderia haver possibilidade da espécie *P. actinia* ser uma alternativa de substituição à espécie importada.

Fração *n*-BuOH

A fração *n*-BuOH é rica em flavonóides os quais podem ser observados quando se utiliza o revelador NEU (Figura 7).



Figura 7: CCD da fração *n*-BuOH e aquosa do extrato metanólico desclorofilado de *P. actinia*
FM: EtOAc-HCO₂H-H₂O (8:1:1), revelador: NEU

A varredura no UV da fração *n*-BuOH mostrou que ocorre absorção em 274 e 342 nm. Por essas razões o comprimento de onda escolhido para a técnica de CLAE foi 340 nm.

Os padrões utilizados para comparação de tempo de retenção foram a orientina (14), vitexina (16) e isovitexina (17). Por comparação de tempo de retenção e adição de padrão, o único flavonóide detectado para a fração foi isovitexina (Figura 9). Os tempos de retenção dos padrões foram de 11,22 min para orientina, 16,41 min para vitexina e 18,82 min para isovitexina (Villas-Bôas *et al.*, 2006).

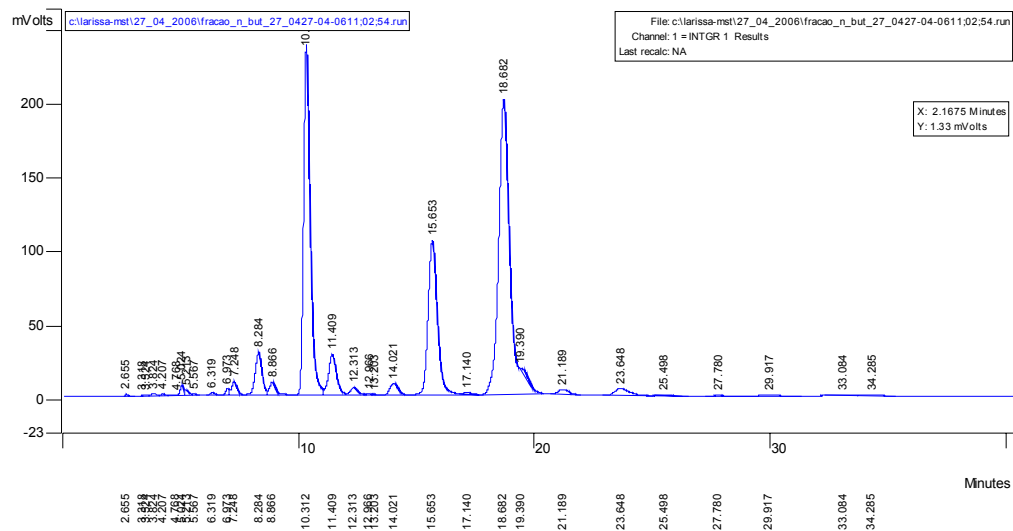


Figura 8: Perfil cromatográfico em CLAE da fração *n*-BuOH de *P. actinia*. FM: sol. aquosa HCO₂H 2%-CH₃CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e λ =340 nm.

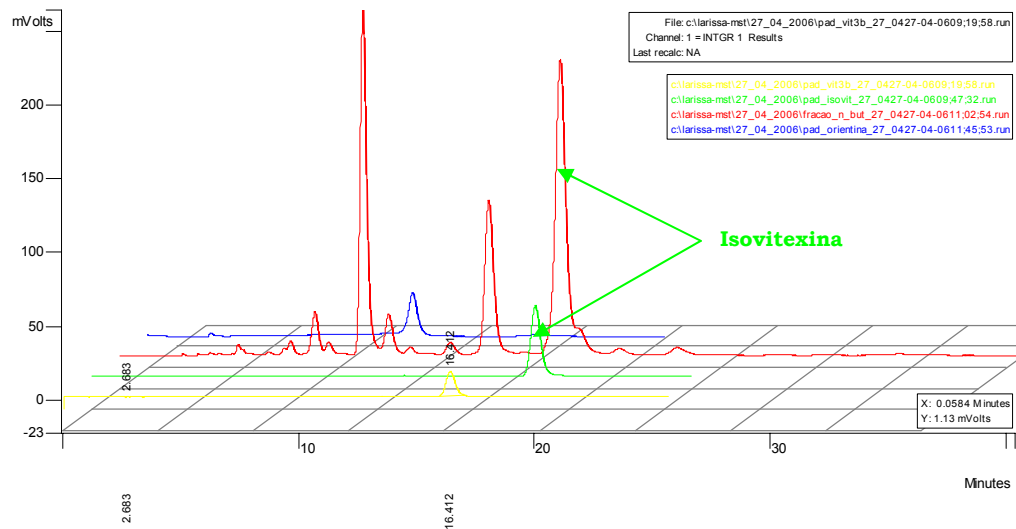


Figura 9: Perfil cromatográfico em CLAE da fração *n*-BuOH (■) e dos padrões vitexina (■) , isovitexina (■) e orientina (■) . FM: sol. aquosa HCO₂H 2%-CH₃CN 87:13, fluxo 1,2 ml/min e λ=340 nm.

O perfil cromatográfico da fração *n*-BuOH em CLAE pode ser observado na Figura 8, o qual é muito semelhante com o do extrato fluido e extrato metanólico desclorofilado (Figuras 3 e 6), justificando a tentativa de isolamento dos componentes químicos presentes nessa fração, uma vez que são semelhantes aos da espécie *P. incarnata*, uma das mais estudadas em relação às propriedades farmacológicas do gênero.

O processo de separação da fração *n*-BuOH se deu inicialmente em coluna de Sílica Gel 60G. A fração é solúvel em MeOH, mas é necessário muito solvente. Como a coluna foi empacotada com CHCl₃, ao tentar colocar este solvente na amostra ocorre a formação de precipitados, não sendo o procedimento adequado para este material. Para tentar solucionar o problema da solubilidade, parte da fração *n*-BuOH (1 g) foi submetida à reação de acetilação e 0,7 g foi utilizado para realização de separação em

coluna cromatográfica, do qual após duas purificações em coluna de sílica gel 60G foi separada a substância ACT₂₄. O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 10) apresentou dois sinais de duplo dubletos em região aromática, um multiplete bem definido em 4,2 ppm indicando a proximidade de um éster, além de sinais de metilas e metilenos em campo alto. Juntamente com outros dados espectrais, foi sugerida a estrutura **30** para esta substância. Esse produto, de estrutura simétrica e nunca identificada em nenhum outro produto natural, pode ser um artefato de solvente, embora os solventes utilizados tenham sido destilados e purificados antes do uso.

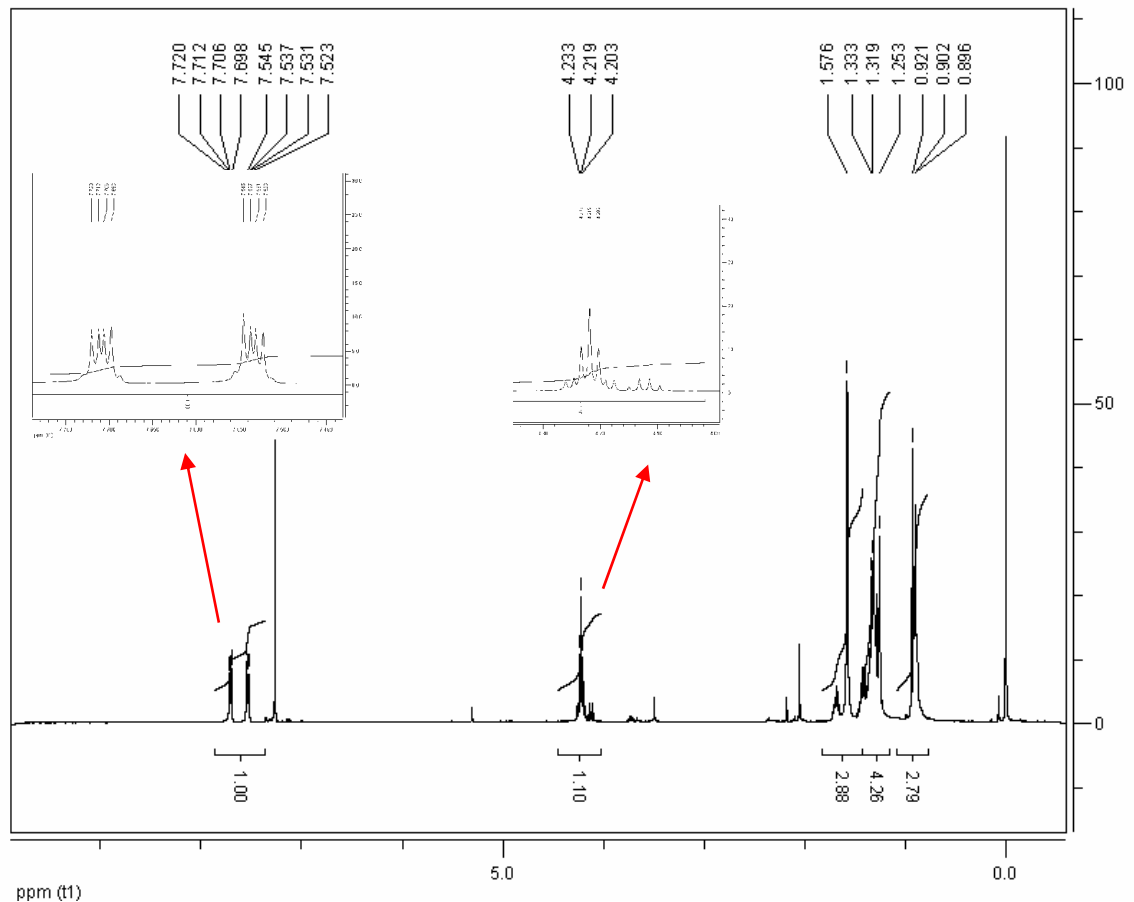
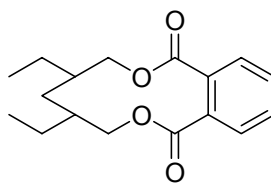


Figura 10: Espectro de ¹H- RMN (400 MHz, CDCl₃) da substância **30**

**30**

Como a amostra *n*-BuOH sem ser acetilada apresenta solubilidade em MeOH, e este solvente dissolve parte da sílica, foi discutida a possibilidade de utilizar colunas do tipo Sephadex, pela facilidade de utilizar solventes polares como MeOH e H₂O, nos quais as amostras de interesse são solúveis. As frações mais polares puderam ser separadas nesse tipo de fase estacionária, deixando de lado a necessidade de submeter às frações a reação de acetilação.

Sephadex LH-20 é formada por polímeros de dextrana e é utilizada nos processos de filtração em gel de produtos naturais. Vários pesquisadores tem obtido sucesso no isolamento de substâncias utilizando esse sistema de filtração por exclusão (Endale *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 1986; Woldemichael *et al.*, 2003).

Parte da fração *n*-BuOH (2,5 g) foi utilizada para realização de coluna em Sephadex utilizando a coluna SP_{maior}. As frações semelhantes reunidas foram submetidas à CC (SP_{menor}), as frações SP₅/*n*-BuOH F₄ e SP₆/F₃ SP₅ F₅ que apresentavam perfil cromatográfico semelhante em CCD foram reunidas e foi chamada de fração SP-HPLC1. A fração SP-HPLC1 apresenta apenas uma substância em CCD (Figura 11a). O espectro UV mostrou absorções em 210, 269 e 348 nm sugerindo-se a presença de flavonóides. O perfil cromatográfico em CLAE (Figura 11b) mostra a predominância de uma substância com t_r 32,639. O flavonóide isovitexina está

presente na amostra, em t_r 63,044, não sendo essa a substância em maior quantidade na fração.

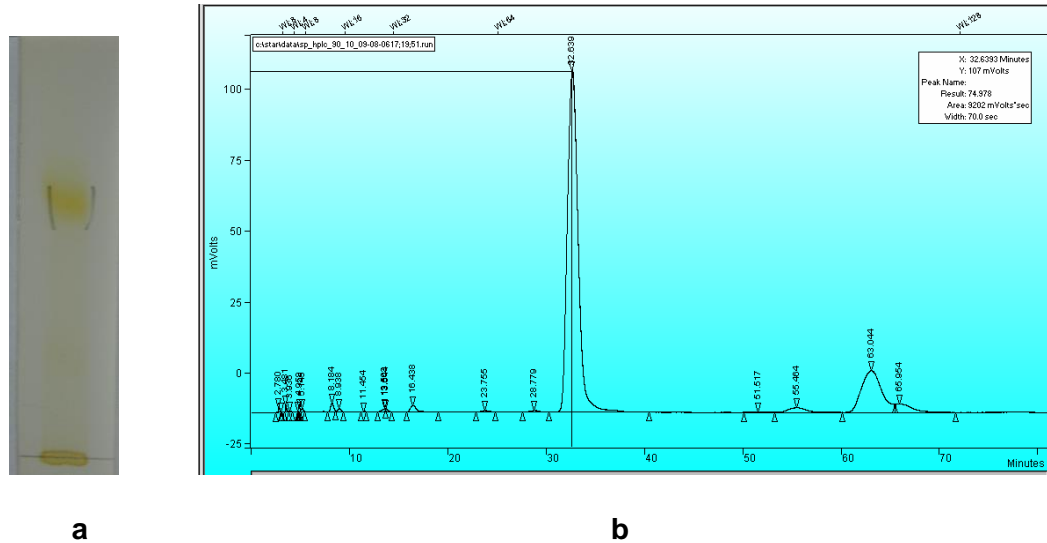


Figura 11: (a) Perfil Cromatográfico da fração SP-HPLC1 em CCD. FM: EtOAc-HCO₂H-H₂O (6:1:1), revelador NEU e (b) CLAE FM: sol. aquosa HCO₂H 2%-CH₃CN 90:10, fluxo 1,0 ml/min e $\lambda=340$ nm.

Parte da fração (30 mg) SP-HPLC1 foi submetida à análise em RMN, mas não pôde ser identificada devido a pouca quantidade de material. O restante do material foi submetido novamente a CC (SP_{mini}) com o objetivo de se isolar a substância em maior quantidade na fração. O que antes parecia uma fração com apenas uma substância (Figura 11a), após sucessivas colunas em Sephadex podem ter se decomposto, mostrando substâncias que não estão presentes na fração original (Figura 12). A extração com MeOH pode resultar na formação de metil derivados, não encontrados originalmente nas plantas (Oleszek e Bialy, 2006).

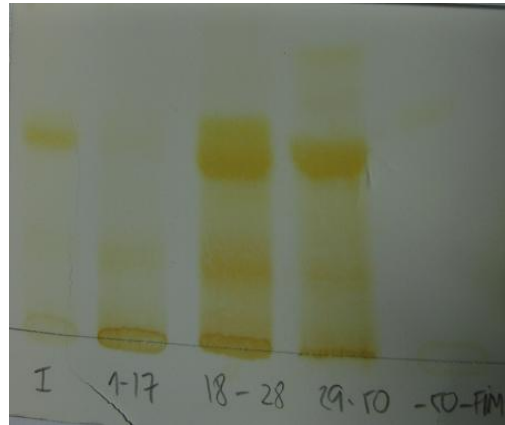


Figura 12: Perfil Cromatográfico em CCD da fração (I) e sub-frações da SP-HPLC1 (FM: EtOAc-HCO₂H-H₂O (6:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico).

A fração SP₆/F₃ SP₅ F₆ apresentou apenas uma mancha quando em CCD (EtOAc-HCO₂H-H₂O 6:1:1) com R_f de 0,66. A substância presente na fração, codificada por SP₆F₆50, foi analisada em experimentos de RMN (solvente MeOD).

Fração aquosa

A fração aquosa do extrato metanólico desclorofilado de *P. actinia* mostrou-se interessante, pois uma CCD geral utilizando revelador anisaldeído sulfúrico evidenciou a presença de possíveis saponinas na forma de manchas de coloração rósea. A literatura até o momento relatou saponinas para a espécie *P. alata*, *P. quadrangularis* e *P. edulis*, mas nunca para a espécie *P. actinia*. Quando aplicada a técnica de agitação em tubo, ocorre a formação de espuma, em pouca quantidade, mas persistente.

A primeira tentativa de separação da fração aquosa foi realizada em coluna à vácuo utilizando Sílica Gel 60G em um funil de vidro sinterizado (pag. 43). As frações

da coluna CV₃ (Figura 13), após análise do seu perfil cromatográfico foram separadas em 1, 2, 3, (4, 5, 6), (7, 8, 9), (10, 11). As frações 1, 2 e 3 foram guardadas para estudos posteriores. As frações 7, 8, 9 apresentaram uma macha vermelha em CCD bem polar quando revelada com anisalaldeído sulfúrico, sendo que a acetilação dessas frações foi realizada numa tentativa de isolar as possíveis substâncias triterpênicas.

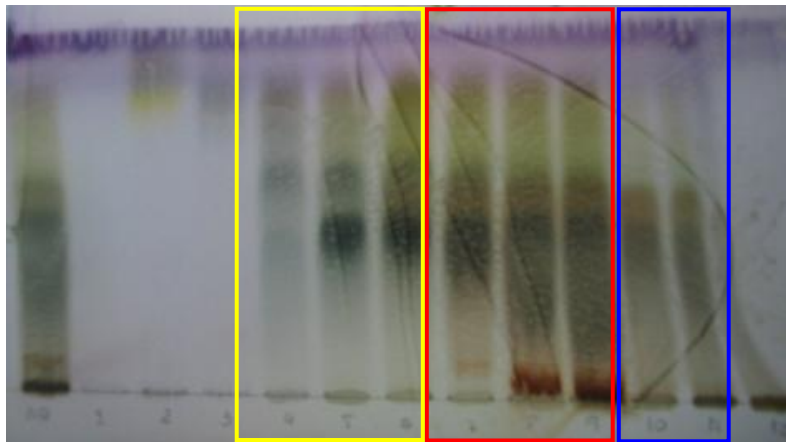


Figura 13: Fracionamento da fração aquosa do extrato metanólico desclorofilado em coluna à vácuo (CV₃), FM: DCM-EtOH (1:1), revelador anisalaldeído sulfúrico. Frações 4, 5, 6 (amarelo), 7, 8, 9 (vermelho) e 10, 11 (azul).

Após análise em CCD e reação de acetilação, separações em coluna de Sílica Gel 60G das frações semelhantes foram realizadas (Figura 14 e 15).

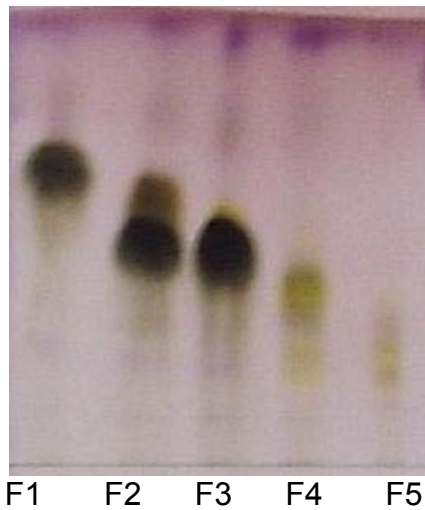


Figura 14: Resultado da coluna ACT 4, 5, 6 CV₃. FM: tolueno-EtOAc (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.

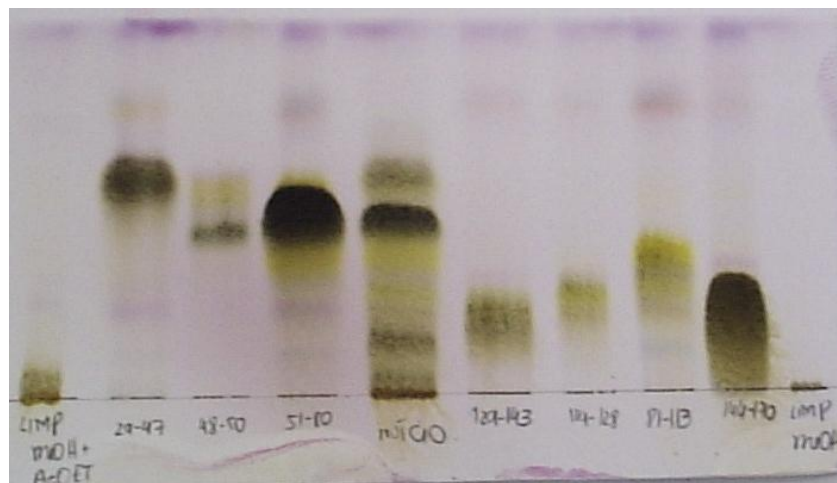


Figura 15: Resultado da coluna ACT 7, 8, 9 CV₃ (material de partida, frações e material de limpeza da coluna). FM: tolueno-EtOAc (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico

A F1 da coluna ACT 4, 5, 6 CV₃ (Figura 14) formou cristais e a substância presente em maior quantidade foi chamada de ACT₄₃. O mesmo ocorreu com a fração 29-47 que continha a substância ACT₄₆ da coluna ACT 7, 8, 9 da CV₃ (Figura 15).

Uma varredura em UV foi realizada com as frações que contêm as substâncias ACT₄₃ e ACT₄₆ e os espectros mostraram que ambas absorvem no mesmo comprimento de onda (273 e 225 nm) sugerindo serem a mesma substância. Os espectros de ¹³C- e ¹H-RMN das frações que continham as substâncias ACT₄₃ e ACT₄₆ apresentou diversos sinais demonstrando que as substâncias estavam impuras, não sendo possível a sua identificação.

O espectro de ¹H-RMN de ACT₄₃ (Figura 16) apresentou sinais característicos de acetatos em 2,0 ppm, série de sinais entre 4 e 6 ppm, um sinal de dupla ligação em 6,2 ppm, indicando tratar-se possivelmente de uma substância glicosilada.

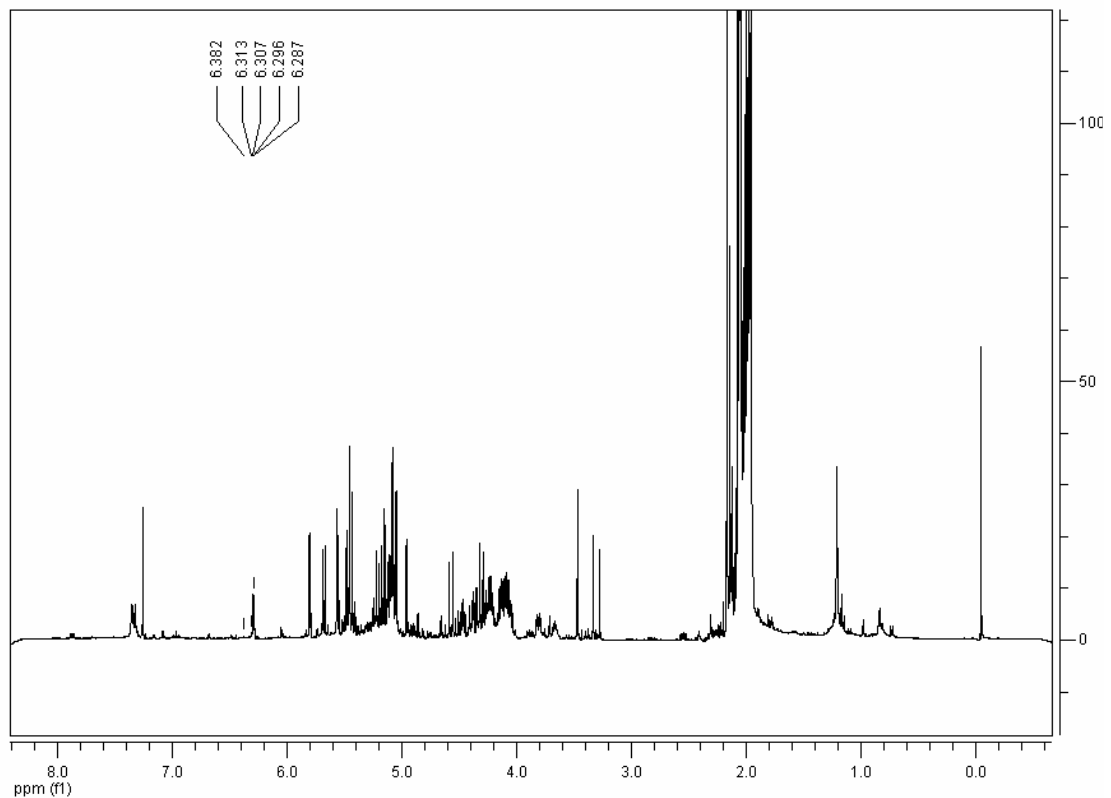


Figura 16: Espectro de ¹H- RMN (400 MHz, CDCl₃) da substância ACT₄₃

Uma coluna foi realizada com as frações ACT 7, 8, 9 CV₃, ACT 10, 11 CV₃ e ACT 9, 10 CV₂, chamada coluna CV_{2, 3} (todas). As primeiras frações (1-22) da coluna CV_{2, 3} (todas) formaram um precipitado, o qual foi analisado em ¹H-RMN e ¹³C-RMN.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 17) apresentou um sinal singlete em 2,09 ppm para três hidrogênios e um sinal singlete em 2,08 ppm, referente a seis hidrogênios, indicando a presença de três acetatos. Outros sinais importantes apareceram em δ 4,15 como duplo dubleto com constantes de acoplamento de 12 e 5,8 Hz e integração para dois hidrogênios e também um duplo dubleto em δ 4,29, também com integração para dois hidrogênios e $J = a$ 12 e 4,3 Hz. Um quinteto em δ 5,24 para um hidrogênio, $J = 4,3$ demonstra um acoplamento com o sinal em δ 4,29, confirmado pelo espectro de COSY (Figura 18). Nenhum outro sinal no espectro apresentou qualquer possibilidade de correlação entre os sinais citados, sugerindo ser uma substância de baixo peso molecular. O espectro de HMQC apresentou correlações próprias entre os sinais dos hidrogênios do radical acetila com sinais em 20,7 e 20,9 ppm, como também sinais em 170,7 e 170,2, próprios para a presença de três carbonilas, confirmando a presença dos três grupos acetatos. Um sinal em 62,1 ppm apresentou correlação com os sinais em δ 4,29 e 4,15, demonstrando tratar-se de hidrogênios geminais (Williams e Fleming, 1995), sendo que o sinal do hidrogênio em δ 5,24 apresentou correlação com o sinal em 62,3 ppm do espectro de ¹³C-RMN. A posição dos três sinais de carbono em torno de 60 ppm indica tratar-se de ésteres, o que corrobora com os sinais de grupos acetilas. Dessa forma, resta caracterizar a substância como sendo o tri-acetato de glicerol (Figura 19), uma

substância que provavelmente exista em plantas desde sua origem há 200 milhões de anos (Gerber *et al.*, 1988; Khorun *et al.*, 2006).

A presença de glicerol em produtos naturais é bem conhecida em insetos e animais como crioprotetores (Li *et al.*, 2003). Plantas possuem células especializadas que confinam e protegem tecidos. Esta proteção é necessária para defender as plantas de patógenos e evitar sua desidratação. As folhas são protegidas pela epiderme principalmente pelo seu conteúdo em biopolímeros, p.ex. cutina na epiderme e suberina na periderme (Graca *et al.*, 2002). Suberina, conforme demonstrado por Graca e Pereira (1997) e Moire *et al.* (1999) possui glicerol em quantidade suficiente para esterificar a maior parte dos grupos carboxilas presentes em sua estrutura, o que sugere justificar a presença desta substância nas folhas de *P. actinia*. Gerber (1988) desenvolveu um procedimento por HPLC para quantificar a presença de glicerol em vegetais, demonstrando que em anaerobiose, as plantas apresentam maior quantidade dessa substância (Gerber *et al.*, 1988).

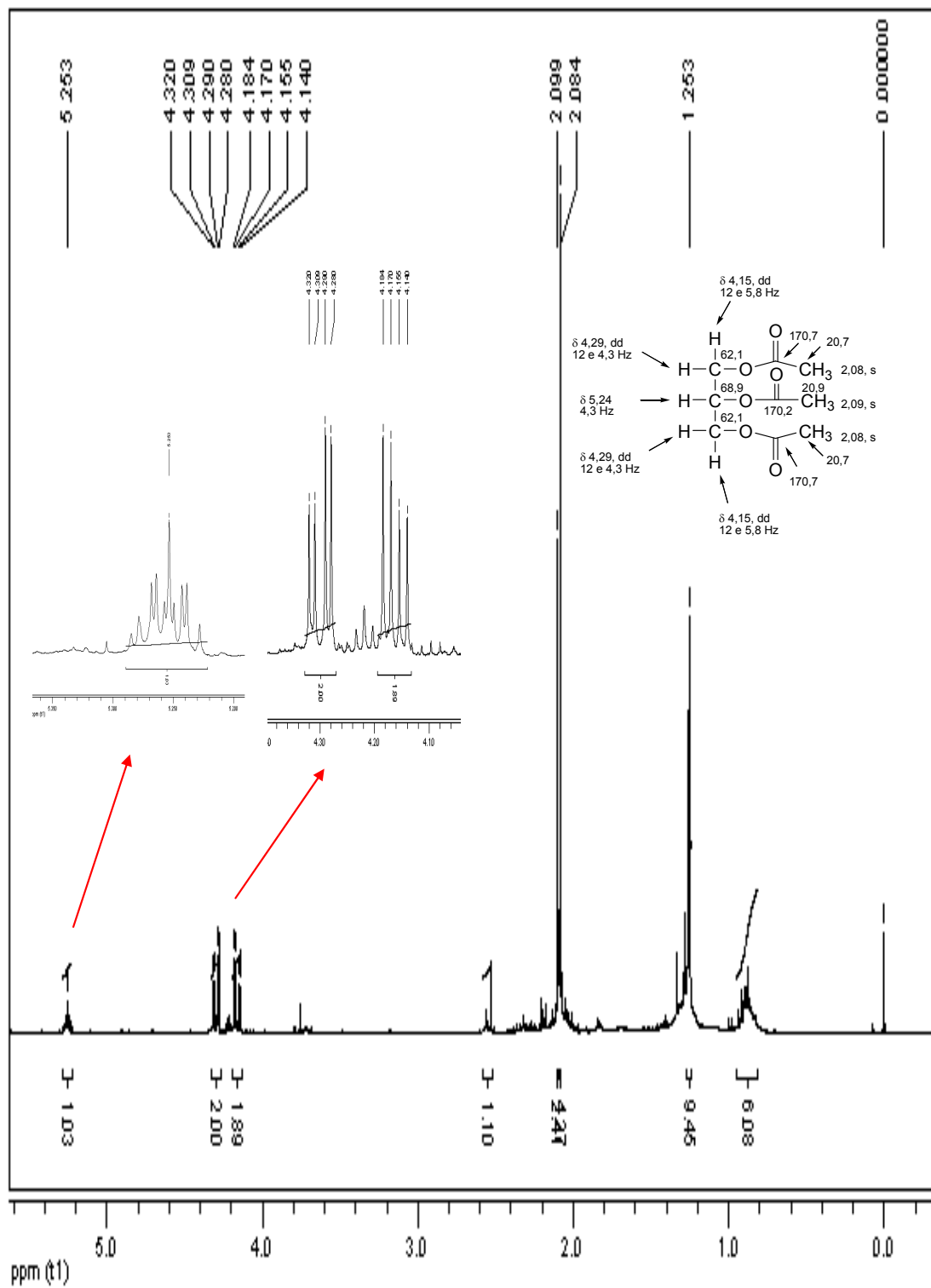


Figura 17: Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) do glicerol acetilado

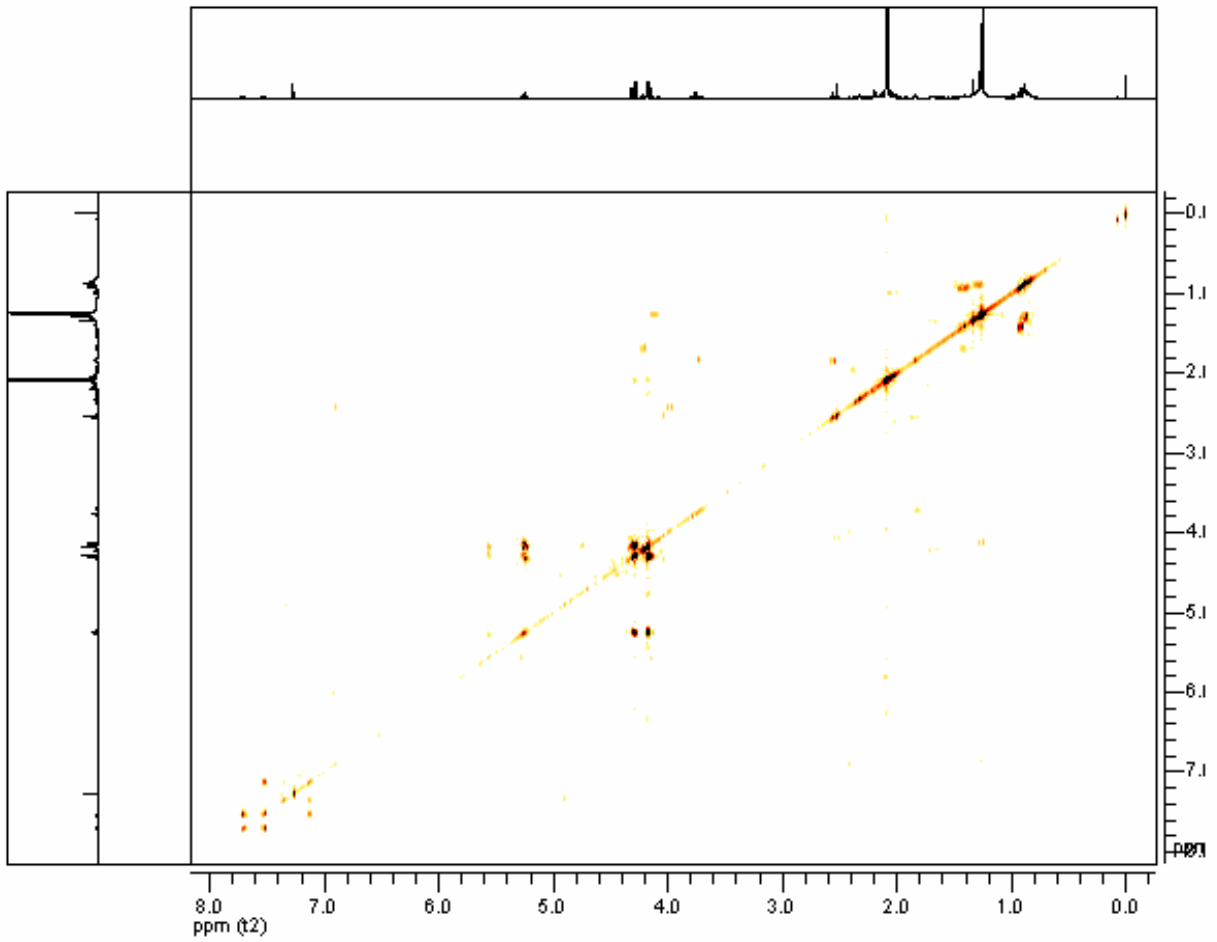


Figura 18: Espectro de COSY (400 MHz, CDCl_3) do glicerol acetilado

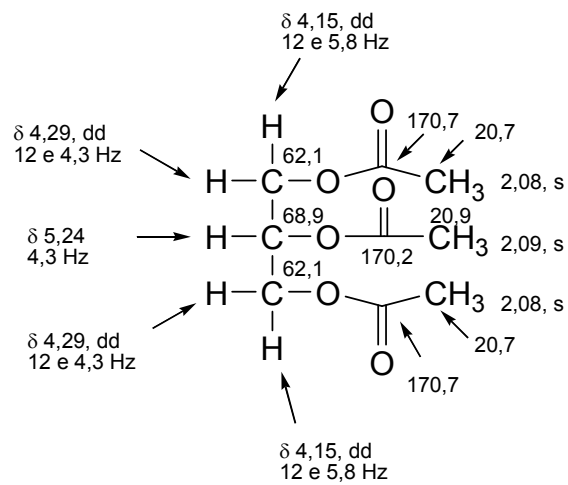


Figura 19: Substância tri-acetato de glicerol

A fração aquosa (2,5 g) também foi fracionada utilizando colunas Sephadex LH-20. Foram realizadas separações cromatográficas diversas (página 45) com o objetivo de ir separando ao máximo as substâncias presentes na fração. Na primeira coluna realizada, foram reunidas as frações semelhantes, mas como a separação não foi muito efetiva, apenas uma das frações foi utilizada (F_3) e as demais foram guardadas para posteriormente fazer outra coluna. A fração F_3 (Figura 20) foi chamada de F_3SP_1 . Essa fração apresentou, quando submetida a CCD e revelada com anisaldeído sulfúrico, uma mancha vermelha, o que sugere a presença de glicosídeos triterpênicos, possíveis saponinas.

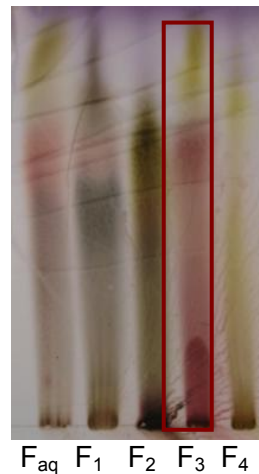


Figura 20: CCD da fração aquosa e suas frações da SP1. Em destaque a F_3 de coloração avermelhada. FM: DCM-EtOH (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.

A fração F_3SP_1 foi submetida novamente a cromatografia em SP_{menor} e foram separadas subfrações $SP_4(F_3-SP_1)F_1$ e $SP_4(F_3-SP_1)F_2$. Ambas apresentaram manchas de coloração rosa (Figura 21). Foram reunidas as frações para posterior separação.

Como a separação da fração F_3SP_1 em Sephadex não foi eficiente, foi feita uma tentativa de fracionamento em resina Amberlite XAD-16.

A grande maioria dos artigos onde se fala do isolamento e identificação de substâncias polares (saponinas) fala também da utilização de resinas iônicas do tipo Amberlite, sugerindo a utilização primeiramente de resinas do tipo Amberlite, seguido por purificações em Sephadex. A resina muito utilizada para separação das substâncias polares contidos em extratos de plantas são as do tipo Amberlite XAD-16. Essas resinas são úteis na separação de substâncias polares hidro e álcool solúveis. Quando se elui a coluna com água, as substâncias fenólicas ficam retidas na coluna, enquanto as demais são eluidas sem nenhuma interação, sendo interessante na separação de glicosil flavonóides e saponinas.

A coluna em Amberlite XAD-16 da fração F_3SP_1 resultou em uma separação mais efetiva (Figura 22).

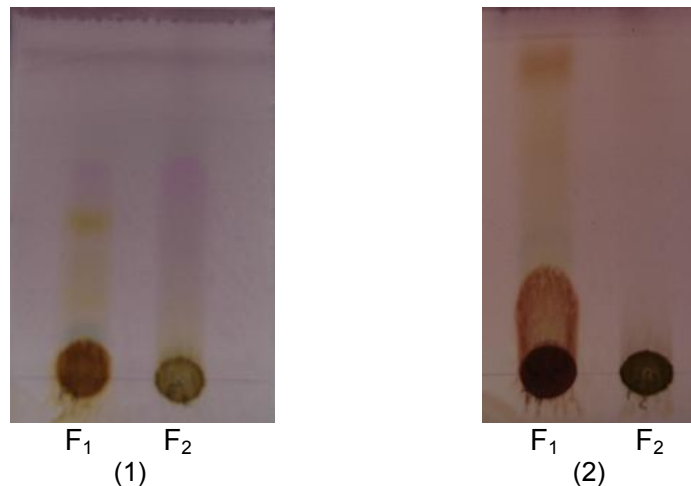


Figura 21: Frações $SP_4(F_3-SP_1)F_1$ e $SP_4(F_3-SP_1)F_2$ nas seguintes fases móveis: (1) AcOEt-HCO₂H-H₂O (6:1:1) e (2) DCM-EtOH (1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.



Figura 22: Coluna Amberlite XAD-16 fração $SP_4(F_3-SP_1)F_1F_2$ FM: AcOEt-HCO₂H-H₂O (6:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.

A mancha azul, que não apresenta fluorescência em ondas longas, foi obtida em pequena quantidade (12 mg) após isolamento por CCD preparativa, sendo que não foi possível a sua identificação por RMN uma vez que a amostra estava muito diluída.

Numa tentativa de verificar se a separação poderia ser melhor se fosse utilizada a resina Amberlite XAD-16 como primeira opção de separação, foi realizada uma separação com a fração aquosa (coluna AMB-FLO) (Figura 23).

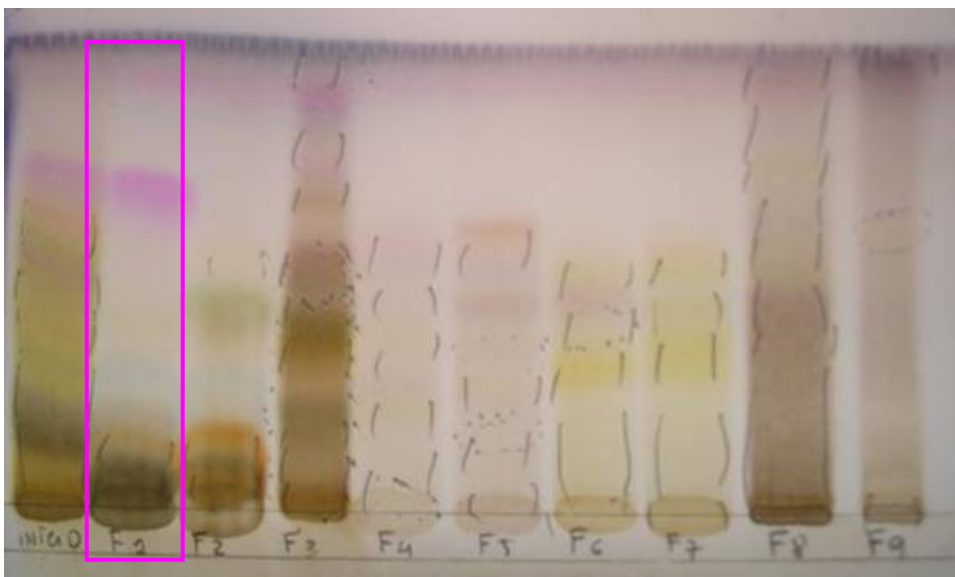
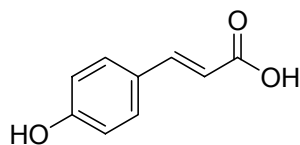


Figura 23: Coluna AMB-FLO da fração aquosa. Em destaque a fração F_1 . FM: AcOEt-HCO₂H-H₂O (5:1:1), revelador anisaldeído sulfúrico.

A fração 1 (F_1) apresentou uma mancha rósea, com possível perfil de uma aglicona de saponina. Ácido *p*-cumárico revela com coloração rosa com anisaldeído sulfúrico, semelhante à mancha da F_1 na Figura 23. CCD do ácido *p*-cumárico em comparação com a fração F_1 mostrou R_f de 0,9 e 0,7 para a mancha vermelha da fração F_1 , ambas com coloração igual. Para verificar se a mancha rosa presente na F_1 apresenta alguma correlação com o ácido *p*-cumárico (**31**), possivelmente um éster, foi realizada hidrólise com HCl 1% e 36%. Os resultados em CCD obtidos mostraram que não há nenhuma correlação da mancha rosa obtida com o ácido *p*-cumárico.



31

Com o objetivo de isolar essa substância rósea, foram realizadas separações em Sephadex da F1 sem hidrolizar utilizando MeOH como eluente. Da primeira coluna em Sephadex foram obtidas 33 frações de 4 ml, das quais por agrupamento das semelhantes foram agrupadas em três subfrações. Uma dessas subfrações foi submetida novamente a cromatografia em Sephadex, e foram recolhidas 39 frações de 4 ml. As frações de número 15-21 apresentavam perfis semelhantes, e quando agrupadas formaram cristais na forma de prismas. Os cristais foram solúveis somente em D₂O, e insolúveis em qualquer outro solvente. O espectro de ¹H-RMN (Figura 24) mostrou dois duplos dubletos em 6,5 ppm, um sinal possivelmente para um grupo metoxila em 3,2 ppm, além dos sinais do solvente. Apesar da substância estar cristalizada, por RMN não foi possível a sua identificação, mas, por ser um cristal com formas bem definidas espera-se conseguir elucidar a sua estrutura através de experimentos utilizando experimentos de Raio-X.

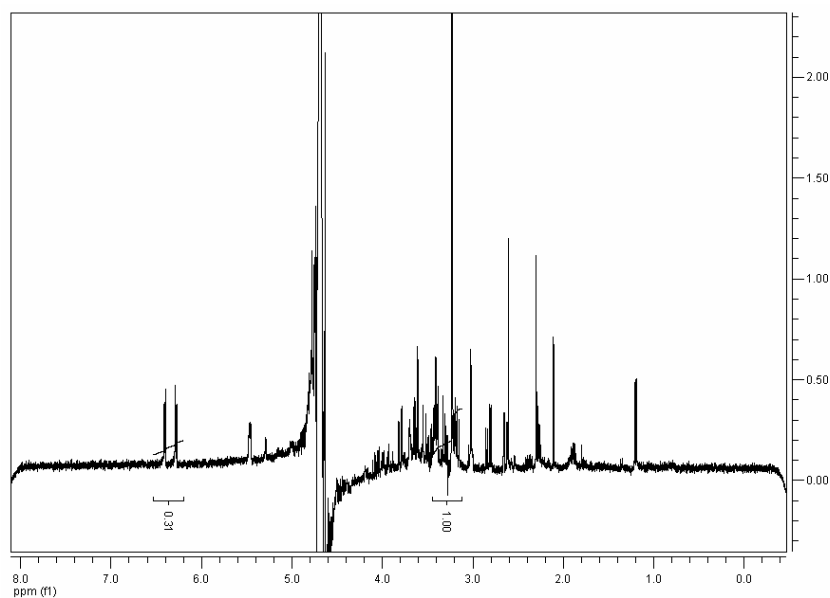


Figura 24: Espectro de ¹H- RMN (400 MHz, D₂O) dos cristais (F₁)

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Em função da dificuldade de isolar substâncias polares pelos procedimentos adotados, como alternativa, pretende-se utilizar para as subfrações de SP-HPLC1 o método de separação em CLAE semi-preparativa para isolar a substância que aparece em maior quantidade (maior pico no tempo de retenção de 32 min). A fase móvel escolhida é HCO₂H 2% e CH₃CN (90:10) e fluxo 1,0 ml/min. Essa fase móvel foi testada em CLAE analítica e mostrou-se apropriada para a separação. A substância que aparece em tempo de retenção 63 min é a isovitexina, sendo que sua purificação também poderá ser realizada pela mesma técnica e obter através de análise por RMN a confirmação definitiva da presença desse flavonóide em *P. actinia*.

Encontrou-se grande dificuldade em trabalhar com as frações polares e sílica, sendo que utilizar Amberlite e Sephadex, nessa ordem, está se mostrando muito útil na separação da fração aquosa ao invés de Sephadex antes de Amberlite. As outras subfrações da separação Amberlite/Sephadex poderão ser fracionadas posteriormente em Sephadex para tentar separar outras substâncias polares que possuem similaridade em CCD com saponinas.

Ao mesmo tempo, a utilização de MeOH em coluna de Sephadex pode ter gerado substâncias de decomposição que não estavam presentes na amostra. O solvente utilizado nas análises de RMN foi MeOD sugerindo a ocorrência de alguma interferência do solvente em função dos resultados obtidos em ambos os experimentos, o que deverá ser investigado posteriormente.

O biomonitoramento pode ser útil no desenvolvimento desse trabalho, sendo que as frações semi-purificadas serão utilizadas para a realização de experimentos farmacológicos em modelos de ansiedade para verificar se existe alguma correlação dessas substâncias com a atividade já observada para os extratos brutos e frações polares. A substância responsável pela atividade ansiolítica e sedativa do maracujá ainda é uma incógnita, sugerindo-se ser um grupo de substâncias, e não somente uma substância isolada a responsável pelos seus efeitos.

REFERÊNCIAS

Abourashed, E. A., Vanderplank, J. e Khan, I. A.: High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. *Pharmaceutical Biology* **41** (2): 100-106, 2003.

Abourashed, E. A., Vanderplank, J. R. e Khan, I. A.: High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharmaceutical Biology* **40** (2): 81-91, 2002.

Alonso, J. R.: Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas, ISIS, Buenos Aires, 1998.

Armarego, W. L. F., Perrin, D. D.: Purification of Laboratory Chemicals, Butterworth Heinemann, Auckland, 1996.

Andersen, L., Adsersen, A. e Jaroszewski, J. W.: Cyanogenesis of *Passiflora foetida*. *Phytochemistry* **47** (6): 1049-1050, 1998.

Aoyagi, N., Kimura, R. e Murata, T.: *P. incarnata* dry extracts. I. Isolation of maltol and Pharmacological action of maltol and ethyl maltol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **22**: 1008-1013, 1974.

Barroso, G. M.: Sistemática de angiosperma do Brasil, Editora Universitária de São Paulo, Viçosa, 1978.

Bokstaller, S. e Schmidt, P. C.: A comparative study on the content of passionflower flavonoids and sesquiterpenes from valerian roots extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. *Pharmazie* **52** (7): 552-557, 1997.

Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Martinelli, E. M. e Mustich, G.: Passiflorine, a new glycoside from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry* **14**: 2661-2665, 1975.

Borrelli, E., Pinto, L., Izzo, A. A., Mascolo, N., Capasso, F., Mercati, V., Toja, E. e Autore, G.: Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. *Phytoterapy Research* **10**: S104-6, 1996.

Butler, M. S.: The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products* **67**: 2141-2153, 2004.

Camargo, M. T. L. A.: Etnofarmacobotânica: conceituação e metodologia de pesquisa, Humanitas/FFLCH/USP: Terceira margem, São Paulo, 2003.

- Carlini, E. A.: Plants and the central nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **75** (3): 501-12, 2003.
- Carlo, G. D., Mascolo, N., Izzo, A. A. e Capasso, F.: Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs (Minireview). *Life Sciences* **65** (4): 337-53, 1999.
- Cass, H.: Herbs for the nervous system: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. *Seminars in integrative medicine* **2**: 82-88, 2004.
- Cass, Q. B. e Degani, A. L. G.: Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação, EdUFSCar, São Carlos, 2001.
- Chassagne, D. e Crouzet, J.: A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. *Phytochemistry* **49** (3): 757-759, 1998.
- Chassagne, D., Crouzet, J., Bayonove, C. L. e Baumes, R. L.: Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible *Passiflora* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (7): 2685-2689, 1997.
- Chassagne, D., Crouzet, J. C., Bayonove, C. L. e Baumes, R. L.: Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44** (12): 3817-3820, 1996.
- Chaves, M. H., Freitas, A., Roque, N. F. e Cavaleiro, A. J.: Separação e identificação de constituintes químicos polares dos galhos de *Porcelia macrocarpa*. *Química nova* **23** (3), 2000.
- Coleta, M., Campos, M. G., Cotrim, M. D. e Cunha, A. P. d.: Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry* **34** Suppl 1: S20-1, 2001.
- Cordell, G. A.: Introduction to alkaloids: A biogenetic approach, John Wiley and sons, New York, 1981.
- Cronquist, A.: An integrated system of classification of flowering plants, Columbia University Press, New York USA, 1981.
- Da-Silva, R. A. D.: Farmacopéia dos Estados unidos do Brasil, Companhia Editora Nacional, São Paulo, 1926.
- Dhawan, K., Dhawan, S. e Chhabra, S.: Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora*

incarnata Linneaus: A non-habit forming anxiolytic. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **6** (2): 215-222, 2003a.

Dhawan, K., Dhawan, S. e Sharma, A.: *Passiflora*: a review update. Journal of Ethnopharmacology **94** (1): 1-23, 2004.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Anti anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. Journal of Ethnopharmacology **78** (2-3): 165-170, 2001a.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. Fitoterapia **72** (8): 922-926, 2001b.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. Fitoterapia **72** (6): 698-702, 2001c.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Reversal of cannabinoids ($\Delta(9)$ -THC) by the benzoflavone moiety from methanol extract of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice: a possible therapy for cannabinoid addiction. Journal of Pharmacy and Pharmacology **54** (6): 875-881, 2002a.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. Journal of Ethnopharmacology **81** (2): 239-244, 2002b.

Dhawan, K., Kumar, S. e Sharma, A.: Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* Linn. in mice. Phytotherapy Research **17** (4): 401-403, 2003b.

Dhawan, K. e Sharma, A.: Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. Fitoterapia **73** (5): 397-399, 2002.

Doyama, J. T., Rodrigues, H. G., Novelli, E. L., Cereda, E. e Vilegas, W.: Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. Journal of Ethnopharmacology **96** (3): 371-4, 2005.

Elizabetsky, E. e Costa-Campos, L.: The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. Evidence based complementary and alternative medicine **3** (1): 39-48, 2006.

Endale, A., Wray, V., Murillo, R., Schmidt, P. C. e Merfort, I.: Hopane-type saponins from the seeds of *glinus lotoides*. Journal of Natural Products **68**: 443-446, 2005.

Farmacopéia: Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (F. Bras. II), Indústria Gráfica Siqueira S.A., São Paulo, 1959.

Farmacopéia: Farmacopéia Brasileira (F. Bras. III), Organização Andrei Editora S.A., São Paulo, 1977.

Ferro, D.: Fitoterapia : Conceitos clínicos, Editora Atheneu, São Paulo, 2006.

Francisco, I. A. e Pinotti, M. H. P.: Cyanogenic glycosides in plants. Brazilian Archives of Biology and Technology **43** (5): 487-492, 2000.

Freitas, P. C. D.: Estudo Farmacognóstico comparativo de espécies Brasileiras do Gênero *Passiflora* L., Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

Gavasheli, N. M., Moniava, I. I. e Eristavi, L. I.: Aminoacids from *Passiflora incarnata*, Cultivated in Georgian SSR. Khimiya Prirodnykh Soedinenii **10** (2): 266-266, 1974.

Geiger, H. e Markham, K. R.: The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. Zeitschrift Fur Naturforschung C- a Journal of Biosciences **41** (9-10): 949-950, 1986.

Gerber, D. W., Byerrum, R. U., Gee, R. W. e Tolbert, N. E.: Glycerol Concentrations in Crop Plants. Plant Science **56** (1): 31-38, 1988.

Giavina-Bianchi, P. F., Castro, F. F. M., Machado, M. L. S. e Duarte, A. J. S.: Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. Annals of Allergy Asthma & Immunology **79** (5): 449-454, 1997.

Graca, J. e Pereira, H.: Cork suberin: a glyceryl based polyester. Holzforschung **51**: 225-234, 1997.

Graca, J., Schreiber, L., Rodrigues, J. e Pereira, H.: Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. Phytochemistry **61** (2): 205-215, 2002.

Guimarães, F. S.: Medicamentos hipnóticos. Em Fundamentos de Psicofarmacologia, ed. by F. G. Graeff and F. S. Guimarães, pp. 161-174, Atheneu, São Paulo, 1999.

Handley, S. L. e Mithani, S.: Effects of alpha adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear motivated behavior. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology **327** (1): 1-5, 1984.

Harborne, J. B.: The flavonoids: advances in research since 1980, Chapman & Hall, London, 1988.

Harvey, A. L.: Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? Trends in pharmacological sciences **20**: 196-198, 1999.

Ichimura, T., Yamanaka, A., Ichiba, T., Toyokawa, T., Kamada, Y., Tamamura, T. e Maruyama, S.: Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. Bioscience Biotechnology and Biochemistry **70** (3): 718-721, 2006.

Jaroszewski, J. W., Olafsdottir, E. S., Wellendorph, P., Christensen, J., Franzyk, H., Somanadhan, B., Budnik, B. A., Jorgensen, L. B. e Clausen, V.: Natural cyclopentanoid cyanohydrin glycosides, part 23. Cyanohydrin glycosides of *Passiflora*: distribution pattern, a saturated cyclopentane derivative from *P. guatemalensis*, and formation of pseudocyanogenic alpha-hydroxyamides as isolation artefacts. Phytochemistry **59** (5): 501-511, 2002.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. e Stevens, P. F.: Plant systematics- A phylogenetic approach, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA, 1999.

Khorun, L. V., Zakharov, V. G. e Sokolov, D. D.: Quantitative estimation of the dynamics of adventive flora (by the example of the Tula region). Zhurnal Obshchei Biologii **67** (4): 298-310, 2006.

Kidoy, L., Nygard, A. M., Andersen, O. M., Pedersen, A. T., Aksnes, D. W. e Kiremire, B. T.: Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. Journal of food composition and analysis **10**: 49-54, 1997.

Kimura, R., Matsui, S., Ito, S., Aimoto, T. e Murata, T.: Studies on *Passiflora incarnata* dry extract .2. Central depressant effects of maltol analogs in mice. Chemical & Pharmaceutical Bulletin **28** (9): 2570-2579, 1980.

Kumar, S. e Sharma, A.: Apigenin: The anxiolytic constituent of *Turnera aphrodisiaca*. Pharmaceutical Biology **44** (2): 84-90, 2006.

Kurtz, S. M. T. F.: Maracujá: Farmacognose das folhas de *Passiflora actinia* Hooker e estudo preliminar de formulação para incorporar a tintura de *Passiflora alata* Dryander, Passifloraceae. Em Farmacognosia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

Kurtz, S. M. T. F., Santos, C. A. M., Duarte, M. R. e Sato, M. E. O.: Morfoanatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. Acta Farmaceutica Bonaerense **22** (2): 105-112, 2003.

- Li, N. G., L.Osakovskii, V. e Ivanova, S. S.: Chemical composition and cryoprotective activity of ethanol extract from winter caterpillars *Aporia crataegi* L. Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja / Rossijskaja akademiia nauk **5**: 547-52, 2003.
- Li, Q. M., Heuvel, H. V. D., Delorenzo, O., Corthout, J., Pieters, L. A. C., Vlietinck, A. J. e Claeys, M.: Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). Journal of Chromatography: Biomedical Applications **562** (1-2): 435-446, 1991.
- Loggia, R. D., Tubaro, A. e Redaelli, C.: Evaluation of the activity on the mouse CNS of several plant extracts and a combination of them. Rivista di neurologia **51** (5): 297-310, 1981.
- Löhdefin, J. e Kating, H.: Zur Frage des Vorkommens von Harmanalkaloiden in *Passiflora incarnata* Planta Medica **25** (2): 101-104, 1974.
- Lolli, L. F., Sato, C. M., Romanini, C. V., Villas-Bôas, L. B., Santos, C. A. M. e Oliveira, R. M. W.: Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. Journal of Ethnopharmacology, 2007.
- Lorenz, A. P.: Relações evolutivas entre *Passiflora actinia* Hooker e *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae). In Departamento de Genética e Biologia Molecular, pp. 95, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- Lutomski, J.: Qualitative and quantitative chromatographic investigation of alkaloids of *Passiflora incarnata*. Biul. Inst. Roslin Lecznicych **5**: 181-198, 1959.
- Marchart, E., Krenn, L. e Kopp, B.: Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. Planta Medica **69** (5): 452-456, 2003.
- Mareck, U., Herrmann, K., Galensa, R. e Wray, V.: The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. Phytochemistry **30** (10): 3486-3487, 1991.
- Medina, J. H., Paladini, A. C., Wolfman, C., Stein, L. L. d., Calvo, D., Diaz, L. E. e Peña, C.: Chrysin, a naturally occurring monoflavonoid, recognises benzodiazepine receptors and possesses anticonvulsant properties. Biochemical Pharmacology **40** (2227-2232), 1990.

Menghini, A. e Mancini, L. A.: TLC determination of flavonoid accumulation in clonal populations of *Passiflora incarnata* L. Pharmacological Research Communications **20** (5): 113-6, 1988.

Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R. E. e Ryser, U.: Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. Journal of plant physiology **119** (3): 1137-46, 1999.

Montanher, A. B., Zucolotto, S. M., Schenkel, E. P. e Fröde, T. S.: Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model Journal of Ethnopharmacology **109** (2): 281-88, 2006.

Moraes, M. L. L.: Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L. Em Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

Muller, S. D., Vasconcelos, S. B., Coelho, M. e Biavatti, M. W.: LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **37** (2): 399-403, 2005.

Newall, C. A., Anderson, L. A. e Phillipson, J. D.: Herbal medicines. A guide for health care professionals, The Pharmaceutical Press, Cambridge, 1996.

Nodari, R. O. e Guerra, M. P.: Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento, ed. por C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, e P. R. Petrovick, pp. 11-24, Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2003.

Oga, S., Freitas, P. C. D. D., Silva, A. C. G. D. e Hanada, S.: Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. Planta Medica **50** (4): 303-306, 1984.

Oleszek, W., e Bialy, Z.: Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005). Journal of Chromatography A **1112** (1-2): 78-91, 2006.

Orsini, F., Pelizzoni, F., Ricca, G. e Verotta, L.: Triterpene Glycosides Related to Quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*. Phytochemistry **26** (4): 1101-1105, 1987.

Orsini, F., Pelizzoni, F. e Verotta, L.: Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangularis*. Phytochemistry **25** (1): 191-193, 1986.

Paladini, A. C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C. e Medina, J. H.: Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent

anxiolytic compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51** (5): 519-526, 1999.

Paris, F. d., Petry, R. D., Reginatto, F. H., Gosmann, G., Quevedo, J., Salgueiro, J. B., Kapczinski, F., Ortega, G. G. e Schenkel, E. P.: Pharmacochemical study of aqueous extracts os *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **21** (1): 5-8, 2002.

Pastene, E., Montes, M. e Vega, M.: New HPTLC method for quantitative analysis of flavonoids of *Passiflora coerulea* L. *Journal of Planar Chromatography* **10** (5): 362-367, 1997.

Pereira, C. A. M. e Vilegas, J. H. Y.: Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s **3** (1): 1-12, 2000.

Pereira, C. A. M., Yariwake, J. H., Lancas, F. M., Wauters, J. N., Tits, M. e Angenot, L.: A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemical Analysis* **15** (4): 241-248, 2004.

Pereira, C. A. M., Yariwake, J. H. e McCullagh, M.: Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochemical Analysis* **16**: 295-301, 2005.

Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. e Perrin, D. R.: *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, 1966.

Perry, N. B., Albertson, G. D., Blunt, J. W., Cole, A. L. J., Munro, M. H. G. e Walker, J. R. L.: Antibiotic compounds from New-Zealand plants. IV. 4-hydroxy-2-cyclopentenone - an antipseudomonas and cytotoxic component from *Passiflora tetrandra*. *Planta Medica* **57** (2): 129-131, 1991.

Petry, R. D., Reginatto, F., de-Paris, F., Gosmann, G., Salgueiro, J. B., Quevedo, J., Kapczinski, F., Ortega, G. G. e Schenkel, E. P.: Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytotherapy Research* **15** (2): 162-164, 2001.

Petry, R. D., Souza, K. C. B. d., Bassani, V. L., Petrovick, P. R. e Ortega, G. G.: Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcóolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). *Revista Brasileira de Farmácia* **79** (1/2): 7-10, 1998.

Phillipson, J. D.: 50 years of medicinal plant research - Every progress in methodology is a progress in science. *Planta Medica* **69** (6): 491-495, 2003.

Pietta, P., Manera, E. e Ceva, P.: Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. *Journal of Chromatography* **357** (1): 233-238, 1986.

Pietta, P. G., Mauri, P. L., Manera, E., Ceva, P. L. e Rava, A.: An Improved determination of flavonoids in medicinal plant extracts. *Chromatographia* **27** (9-10): 509-512, 1989.

Poethke, W., Schwarz, C. e Gerlach, H.: Ueber die Inhaltsstoffe von *Passiflora bryonioides*. *Planta Medica* **18** (4): 303-314, 1970.

Polunin, M. e Robbins, C.: *A farmácia natural: Guia de medicamentos naturais*, Dorling Kindersley, Londres, 1992.

Prabhakar, M. C., Bano, H., Kumar, I., Shamsi, M. A. e Khan, M. S. Y.: Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Medica* **43** (4): 396-403, 1981.

Quercia, V., Turchetto, L., Pierini, N., Cuozzo, V. e Percaccio, G.: Identification and determination of vitexin and isovitexin in *Passiflora incarnata* extracts. *Journal of Chromatography* **161** (NOV): 396-402, 1978.

Raffaelli, A., Moneti, G., Mercati, V. e Toja, E.: Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *Journal of Chromatography A* **777** (1): 223-231, 1997.

Rahman, K., Krenn, L., Kopp, B., SchubertZsilavec, M., Mayer, K. K. e Kubelka, W.: Isoscoparin-2"-O-glucoside from *Passiflora incarnata*. *Phytochemistry* **45** (5): 1093-1094, 1997.

Rang, H. P., Dale, M. M. e Ritter, J. M.: Drogas ansiolíticas e hipnóticas. *Em Farmacologia*, pp. 442-450, Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2001.

Rates, S. M. K.: Plants as source of drugs. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* **39**: 603-613, 2001.

Reginatto, F. H., De-Paris, F., Petry, R. D., Quevedo, J., Ortega, G. G., Gosmann, G. e Schenkel, E. P.: Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. *Phytotherapy Research* **20** (5): 348-351, 2006.

Reginatto, F. H., Gosmann, G., Schripsema, J. e Schenkel, E. P.: Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. *Phytochemical Analysis* **15** (3): 195-197, 2004.

Reginatto, F. H., Kauffmann, C., Schripsema, J., Guillaume, D., Gosmann, G. e Schenkel, E. P.: Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12** (1): 32-36, 2001.

Reginatto, F. R.: Saponinas em *Passiflora alata* Dryander, Faculdade de Farmácia: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

Rehwald, A., Meier, B. e Sticher, O.: Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **69**: 153-158, 1994.

Rehwald, A., Sticher, O. e Meier, B.: Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* **6** (2): 96-100, 1995.

Royce, J. R.: On the construct vality of open-field measures. *Psychological Bulletin* **84**: 1098-1106, 1977.

Santos, K. C.: Atividades sedativa e ansiolítica dos extratos de *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. *Em* Departamento de Farmácia-Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pp. 77, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

Santos, K. C., Kurtz, S. M. T. F., Muller, S. D., Biavatti, M. W., Oliveira, R. M. W. e Santos, C. A. M.: Sedative an ansiolytic affects os methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49** (4): 565-573, 2006.

Santos, K. C., Santos, C. A. e Oliveira, R. M. d.: *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **100** (3): 306-9, 2005.

Seigler, D. S.: Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compouds. *Phytochemistry* **14**: 9-29, 1975.

Seigler, D. S., Spencer, K. C., Statler, W. S., Conn, E. E. e Dunn, J. E.: Tetracyllin B and epitetracyllin B sulfates - novel cyanogenic glucosides from *Passiflora caerulea* and *Passiflora alata caerulea*. *Phytochemistry* **21** (9): 2277-2285, 1982.

Shinomiya, K., Inoue, T., Utsu, Y., Tokunaga, S., Masuoka, T., Ohmori, A. e Kamei, C.: Hypnotic activities of chamomile and *Passiflora* extracts in sleep disturbed rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28** (5): 808-810, 2005.

Simões, C. M. O. e Schenkel, E. P.: A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **12** (1): 27-32, 2002.

Souza, M. P.: Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, Edições UFC/Laboratório de Produtos naturais, Fortaleza, 1991.

Spencer, K. C. e Seigler, D. S.: Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **31** (4): 794-6, 1983.

Spencer, K. C. e Seigler, D. S.: Gynocardin from *Passiflora*. *Planta Medica* **50** (4): 356-357, 1984.

Speroni, E., Billi, R., Perellino, N. C. e Minghetti, A.: Role of chrysin in sedative effects os *Passiflora incarnata* L. *Phytotherapy Research* **10**: S98-S100, 1996.

Speroni, E. e Minghetti, A.: Neuro pharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. *Planta Medica* **54** (6): 488-491, 1988.

Srivastava, V., Negi, A. S., Kumar, J. K., Gupta, M. M. e Khanuja, S. P. S.: Plant based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13** (21): 5892-5908, 2005.

Ulubelen, A., Oksuz, S., Mabry, T. J., Dellamonica, G. e Chopin, J.: C-Glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *Passiflora alata*, *Passiflora ambigua* and *Adenia mannii*. *Journal of Natural Products* **45** (6): 783-783, 1982.

Vale, N. B. e Leite, J. R.: Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura* **35** (1): 11-24, 1983.

Villas-Bôas, L. B., Sanches, M. C. R., Oliveira, R. M. M. W. e Santos, C. A. M.: Estudo cromatográfico da fração *n*-butanol das folhas do extrato hidroalcoólico de *Passiflora actinia* Hooker. *In V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Medicinais*, Hotel Bourbon, Joinville-SC, 8-12 de maio, p. 172.

Wagner, H. e Bladt, S.: Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas, Springer, Heidelberg- Germany, 1996.

Weissenberg, M.: Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochemistry* **58** (3): 501-508, 2001.

Wichtl, M.: Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis, Medpharm scientific publishers, Boca Raton, 2004.

Williams, D. H. e Fleming, E.: Spectroscopic methods in organic chemistry, McGraw-Hill, London, 1995.

Woldemichael, G. M., Montenegro, G. e Timmermann, B. N.: Triterpenoidal lupin saponins from the chilean legume *Lupinus oreophilus* Phil. . Phytochemistry **63**: 853-857, 2003.

Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquiero, I., Paladini, A. C. e Medina, J. H.: Anxiolytic properties of 6,3'- dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. European Journal of Pharmacology **318**: 23-30, 1996.

Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. e Medina, J. H.: Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand Isolated from *Passiflora coerulea*. Pharmacology Biochemistry and Behavior **47** (1): 1-4, 1994.

Yoshikawa, K., Katsuta, S., Mizumori, J. e Arihara, S.: Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. Journal of Natural Products **63** (9): 1229-1234, 2000a.

Yoshikawa, K., Katsuta, S., Mizumori, J. e Arihara, S.: New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. Journal of Natural Products **63** (10): 1377-1380, 2000b.

Zanoli, P., Avallone, R. e Baraldi, M.: Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. Fitoterapia **71**: S117-S123, 2000.

Zuanazzi, J. A. S. e Montanha, J. A.: Flavonóides. *Em Farmacognosia: da planta ao medicamento*, ed. por C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, e P. R. Petrovick, pp. 489-516, Editora UFSC/Editora UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, 2003.