

KELY CRISTINA DOS SANTOS

**ATIVIDADES SEDATIVA E ANSIOLÍTICA DOS EXTRATOS  
DE *Passiflora actinia* Hooker, PASSIFLORACEAE**

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

Orientador:

Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rúbia Maria M. Weffort de Oliveira

CURITIBA

2003



## PARECER

A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a dissertação de mestrado "ATIVIDADE SEDATIVA E ANSIOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *PASSIFLORA ACTINIA* HOOKER, PASSIFLORACEAE", de autoria da pós-graduanda KELY CRISTINA SANTOS, composta pelos Professores: Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos (Orientador/Presidente), Tit. Eloir Paulo Schenkel (Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC) e Dr. Roberto Pontarolo (Universidade Federal do Paraná - UFPR).

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 9,0, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

Curitiba, 31 de março de 2003.

Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Prof. Tit. Eloir Paulo Schenkel

Prof. Dr. Roberto Pontarolo

## NOTA BIOGRÁFICA

---

A autora graduou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná em 1997. Neste mesmo ano atuou como Farmacêutica *trainee*, na Farmácia de Manipulação Biostore – O Boticário. Posteriormente, entre 1998 e 1999 trabalhou como farmacêutica responsável na Nandafarma LTDA e simultaneamente frequentou o curso de especialização em Farmácia Homeopática, pela Fundação de Estudos Médicos Homeopáticos do Paraná. Em 1999 iniciou suas atividades no Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa - LCQPq, onde atuou na implantação, coordenação e desenvolvimento de técnicas de análises físico-químicas para insumos farmacêuticos, medicamentos, fitoterápicos e cosméticos. No ano de 2001 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, medicamentos e correlatos, onde desenvolveu um trabalho de pesquisa da atividade sedativa e ansiolítica dos extratos de *Passiflora actinia* Hooker, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

# DEDICATÓRIA

---

*Aos meus pais: Raul e Ivone  
e à minha irmã Danielly.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela sua dedicação e amor ao ensino e à pesquisa, que vêm sendo essenciais no desenvolvimento deste e de muitos outros trabalhos.

À Profª Drª Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira por seu empenho e seriedade demonstrados em todas as etapas do trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, em especial às professoras Drª Mayumi Elisa Otsuka Sato e Drª Márcia do Rocio Duarte.

À Profª Drª Maique Weber Biavatti, pela indispensável cooperação na obtenção e interpretação dos cromatogramas em CLAE.

Às amigas Fabíola Barbieri Holetz e Dora Barbieri, pela inestimável amizade e hospitalidade com que me acolheram durante os experimentos em Maringá.

À Stella Maris Tessaro Figura Kurtz, amiga e incentivadora, com quem divido a responsabilidade em iniciar os primeiros estudos sobre *Passiflora actinia* Hooker.

Às Senhoras Maria do Rocio Baldon dos Reis e Soledalva Caruso de Oliveria, pelo indispensável auxílio técnico prestado durante as experimentações.

Aos colegas Simony (UNIVALI) e Nilton (UEM), que colaboraram na elaboração deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia, Lilian, Patrícia, Jane, Éverson, Wesley, Cáthia, Mayra, Larissa, Vanessa e Carina pela alegre convivência. Lembrem-se que no fim, tudo dá certo e se não deu certo é porque ainda não chegou o fim.

# EPÍGRAFE

---

*“Estamos mais perto de Deus quando fazemos  
perguntas, do que quando pensamos  
que temos as respostas”*

Abraham Heschel  
(1907-1972)

# SUMÁRIO

---

NOTA BIOGRÁFICA.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
EPÍGRAFE .....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURA .....	viii
ESQUEMAS.....	xi
ABREVIATURAS – SÍMBOLOS – FÓRMULAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações botânicas .....	4
1.2. Considerações químicas .....	5
1.3. Considerações farmacológicas.....	10
1.4. Objetivos .....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
2.1. Material botânico .....	16
2.2. Métodos gerais.....	16
2.2.1. Pesquisa de flavonóides .....	16
2.2.2. Pesquisa de alcalóides.....	16
2.2.3. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	17
2.2.4. Doseamento de flavonóides totais.....	17
2.2.5. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	19
2.3. Análise química de <i>Passiflora actinia</i> .....	20
2.3.1. <i>Preparo dos extratos</i> .....	20
2.3.2. <i>Eliminação da clorofila do extrato metanólico (E3)</i> .....	21
2.3.3. <i>Preparo do extrato metanol-n-hexano (E3H)</i> .....	22

2.3.4. Preparo do extrato metanol-clorofórmio (E3C) .....	22
2.3.5. Preparo do extrato metanol-água (E3A) .....	22
2.3.6. Cromatografia de adsorção em coluna de E3A .....	23
2.4. Observação dos efeitos agudos com doses elevadas .....	23
2.5. Estudo das propriedades ansiolítica e sedativa .....	24
2.5.1. Animais .....	24
2.5.2. Tratamentos .....	24
2.5.3. Testes comportamentais .....	25
2.5.4. Análise estatística dos resultados .....	26
2.6. Medida da catalepsia .....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
3.1. Análise comparativa em CLAE dos perfis flavonoídicos dos extratos de <i>P. incarnata</i> , <i>P. actinia</i> e <i>P. alata</i> .....	29
3.2. Observação dos efeitos tóxicos agudos com doses elevadas do extrato hidroalcoólico de <i>P. actinia</i> .....	31
3.3. Avaliação do modelo experimental Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	32
3.4. Atividade sedativa – ansiolítica do extrato hidroalcoólico de <i>P. actinia</i> (EHB) .....	34
3.5. Pesquisa da atividade dos extratos e frações de <i>Passiflora actinia</i> .....	36
3.5.1. Separação dos compostos do extrato E3 por partição e análise dos extratos metanol-n-hexano (E3H) e metanol-clorofórmio (E3C) .....	46
3.5.2. Análise e fracionamento do extrato metanol-água (E3A) .....	52
3.5.3. Pesquisa da atividade das frações derivadas do extrato metanol-água (E3A) .....	56
3.6. Medida da catalepsia .....	64
4. CONCLUSÕES .....	69
5. REFERÊNCIAS .....	71

## LISTA DE FIGURAS

---

1. Aspecto geral da <i>Passiflora actinia</i> Hooker, evidenciando seu hábito escandente..	05
2. Perfil cromatográfico em CLAE dos extratos metanólicos desclorofilados de <i>P. actinia</i> (a), <i>P. incarnata</i> (b) e <i>P. alata</i> (c) .....	30
3. Efeito da administração de diazepam (1 mg/kg) comparado com o controle fbb (60% propilenoglicol + 2% álcool benzílico em água destilada) .....	33
4. Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg) em camundongos testados no LCE por 5min.....	35
5. Efeito sedativo da administração do EHB de <i>Passiflora actinia</i> (30,100 e 300mg/kg) em camundongos testados no CA por 5min.....	36
6. Curva dose-resposta mostrando o efeito ansiolítico através da média de tempo (em segundos) gastos pelos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.....	38
7. Cromatogramas dos padrões vitexina e isovitexina (a') do extrato E3 de <i>P. actinia</i> (b'). Espectros UV dos padrões vitexina e isovitexina (c') e de E3 (d'). Sistema eluente para flavonóides .....	40
8. Cromatograma e espectro UV do extrato E3 de <i>P. actinia</i> em sistema eluente para alcalóides.....	41
9. Cromatograma e espectro UV do extrato E3 de <i>P. actinia</i> em sistema eluente para alcalóides.....	41
10. Efeito da administração de E3 de <i>P. actinia</i> (100, 300 e 600mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos avaliados no LCE.....	44
11. Efeitos da administração de E3 de <i>P. actinia</i> (100, 300 e 600mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos avaliados no CA. As colunas representam as médias e as o EPM de 10-12 animais .....	45
12. Efeitos da administração do extrato metanol- <i>n</i> -hexano (E3H) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10) avaliados no LCE.....	48
13. Efeito da administração do extrato metanol- <i>n</i> -hexano (E3H) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10) avaliados no CA.....	49

14. Efeitos da administração do extrato metanol-clorofórmio (E3C) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10) avaliados no LCE.....	50
15. Efeito da administração do extrato metanol-clorofórmio (E3C) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10) avaliados no CA.....	51
16. Perfis cromatográficos em CLAE de E3A nos sistemas eluentes para flavonóides (1) e alcalóides (2), respectivamente.....	52
17. Efeitos da administração do extrato metanol-água (E3A) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10-12) avaliados no LCE.....	54
18. Ação do extrato metanol-água (E3A) de <i>P. actinia</i> (30, 100 e 300mg/kg, <i>i.p.</i> ) em camundongos (n=10) avaliados no CA.....	55
19. Perfil cromatográfico (A) e espectro UV (B) de fa.E3A no sistema eluente para flavonóide.....	58
20. Perfil cromatográfico (C) e espectro UV (D) de fa.E3A no sistema eluente para alcalóides.....	58
21. Efeito da administração <i>i.p.</i> das frações “alcalóide” (fa.E3A) e “alcalóide”-flavonóide (fm.E3A) de <i>P. actinia</i> nas doses de 10, 30 e 100mg/kg em camundongos avaliados no LCE por 5min.....	59
22. Efeitos da administração <i>i.p.</i> das frações “alcalóide” (fa.E3A) e “alcalóide”-flavonóide (fm.E3A) de <i>P. actinia</i> nas doses de 10, 30 e 100mg/kg em camundongos avaliados no CA por 5min. As colunas representam as médias e as barras o E.P.M. de 10-12 animais. *p<0,05 e **p<0,001.....	60
23. Cromatograma (E) e espectro UV (F) da fração flavonóide- ff.E3A obtidos no sistema eluente para flavonóides.....	61
24. Efeito da administração <i>i.p.</i> da fração flavonóide- ff.E3A de <i>P. actinia</i> (10, 30 e 100mg/kg) em camundongos avaliados no LCE por 5min.....	62
25. Efeito da administração <i>i.p.</i> da fração flavonóide - ff.E3A de <i>P. actinia</i> (10, 30 e 100mg/kg) em camundongos avaliados no CA por 5min. *p<0,05.....	63
26. Atividade cataléptica do haloperidol (1mg/kg) comparado com o controle salina (n=10; **p<0,001).....	65
27. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> de extrato hidroalcoólico de <i>P. actinia</i> (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=10; **p<0.001).....	66

28. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> de extrato metanólico de <i>P. actinia</i> (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min.(n=8-9; *p<0.05) .....	66
29. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> de extrato metanol-água de <i>P. actinia</i> (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min (n=9-10; *p<0,05) .....	67
30. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> da fração “alcalóide” (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min (n=8-9; *p<0.05).....	67
31. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> da fração flavonóide (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min (n=8; *p<0.05; **p<0,001) .....	67
32. Medida da catalepsia em camundongos após a administração <i>i.p.</i> da fração “alcalóide”-flavonóide (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min (n=8-9; **p<0.001).....	68

## ESQUEMAS

---

1. Fluxograma da extração e fracionamento das folhas de <i>P. actinia</i> .....	21
2. Extração fracionada em Soxhlet das folhas secas e estabilizadas de <i>P. actinia</i> .....	39
3. Eliminação da clorofila e separação por particionamento do extrato metanólico (E3).....	47
4. Fracionamento em coluna de adsorção do extrato E3A de <i>P. actinia</i> .....	56

## **ABREVIATURAS – SÍMBOLOS - FÓRMULAS**

---

°C	grau Celsius
%	porcentagem
μ	micra
μm	micrômetro
μl	microlitro
a.C.	antes de Cristo
AcOEt	acetato de etila
AlCl <sub>3</sub>	cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de múltipla variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZD	benzodiazepínico
CA	campo aberto
CCD	cromatografia em camada delgada
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	ácido acético
conc.	concentrado
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
DL <sub>50</sub>	dose letal 50%
DMSO	dimetilsulfóxido
DZ	diazepam

E1	extrato em éter de petróleo
E2	extrato clorofórmico
E3	extrato metanólico
E3.filt	filtrado de E3
E4	extrato aquoso
E3H	extrato metanol- <i>n</i> -hexano
E3C	extrato metanol-clorofórmio
E3A	extrato metanol-água
EHB	extrato hidroalcoólico bruto
EBF	entradas nos braços fechados
EBA	entradas nos braços abertos
EPM	erro padrão da média
EtOH	etanol
fa.E3A	fração alcalóide de E3A
ff.E3A	fração flavonóide de E3A
fm.E3A	fração flavonóide – alcalóide de E3A
Farm. Bras. I	Farmacopéia Brasileira 1ª edição
Farm. Bras. II	Farmacopéia Brasileira 2ª edição
F. Bras. III	Farmacopéia Brasileira 3ª edição
F. Bras. IV	Farmacopéia Brasileira 4ª edição
g	grama
h	hora
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
H <sub>2</sub> O	água

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
kg	kilograma
LAPAM	Laboratório de Produção e Análise de Medicamentos
LCE	labirinto em cruz elevado
MeOH	metanol
Mg	magnésio
mAU	miliampére
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
m/v	massa/volume
NH <sub>4</sub> OH	hidróxido de amônio
n°	número
nm	nanômetro
PEG	polietilenoglicol
<i>p.o.</i>	<i>per os</i>
PM	peso molecular
ppm	parte por milhão
R <sub>f</sub>	relação de frente
séc.	século
SNC	Sistema nervoso central
SO <sub>2</sub>	dióxido de enxofre

TBA	tempo nos braços abertos
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNIVALI	Universidade do Vale de Itajaí
v/v	volume/volume

## RESUMO

---

Diversas espécies de *Passiflora* são tradicionalmente utilizadas como drogas ansiolíticas e/ou hipnótico-sedativas. *Passiflora actinia* Hooker, conhecida popularmente por maracujá, é uma espécie vegetal nativa da região Sul do Brasil, não existindo estudos sobre seu potencial terapêutico. A análise comparativa em CLAE das espécies *P. incarnata*, *P. alata* e *P. actinia* sugere que o perfil cromatográfico de *P. actinia* tem maior semelhança com *P. incarnata* do que com *P. alata*. A administração do extrato bruto hidroalcoólico de *P. actinia* em camundongos, em doses inferiores a 1.800mg/kg, não resultou em toxicidade aparente. Através dos métodos labirinto em cruz elevado e campo aberto, foi observado um efeito sedativo com o extrato hidroalcoólico bruto, extrato metanólico e sub-extrato metanol-água, sendo que apenas este último também apresentou atividade ansiolítica na dose de 30mg/kg. Com o fracionamento do extrato metanol-água, foi observado que a fração flavonoídica é constituída majoritariamente pela isovitexina, enquanto que a fração alcaloídica, praticamente isenta de flavonóides, não mostrou presença dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos clássicos e pode ser constituída por alcalóides quaternários. Ambas frações mostraram atividade sedativa em camundongos submetidos aos mesmos modelos experimentais. Todos os extratos e frações com atividade sedativa, apresentaram atividade de catalepsia em camundongos.

## ABSTRACT

---

*Passiflora* species are traditionally used as anxiolytic drugs and/or hypnotic/sedatives. *Passiflora actinia* Hooker, popularly known as maracujá, is a native species from Southern Brazil with no studies about its therapeutic potential. HPLC comparative analysis of the species *P. incarnata*, *P. alata* and *P. actinia* has suggested a closer chromatographic profile between *P. actinia* and *P. incarnata*. Administration of the crude hydroalcoholic extract of *P. actinia* in mice, in doses below 1800mg/kg, did not show aparent toxicity. Using the Plus Maze Elevated and Open Field methods, a sedative effect was observed for the crude hydroalcoholic, methanolic and methanol-water extracts. Moreover, the latter has also shown an anxiolytic activity at the dose of 30mg/kg. Fractionation of the extract methanol-water showed that the flavonoid fraction is composed mainly of isovitexin while the alkaloid fraction, with very low flavonoid content. It did not show the presence of the classics  $\beta$ -carbolic alkaloids and it is possible that this fraction is constituted by quaternary alkaloids. Both fractions presented sedative activity on the two experimental models. Moreover, all extracts and fractions with sedative activity, showed also cataleptic activity in mice.

# 1. INTRODUÇÃO

---

*Que o teu alimento seja o teu medicamento e  
que o teu medicamento seja o teu alimento”*  
(Hipócrates, 460-377 a.C.)

Desde os tempos mais remotos, o homem primitivo ao procurar vegetais para o seu sustento, foi descobrindo plantas com ação tóxica ou curativa. Dessa forma, não se sabe a data precisa do início da utilização das plantas para fins medicinais, pois a sua história se entrelaça diretamente à própria história da humanidade, acumulando um conhecimento de milhares de anos.

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. Para a obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços tecnológicos atuais, ainda é restrita. Esse fato possibilita que os compostos químicos presentes nas plantas possam vir a se tornar fármacos em potencial para as mais diferentes moléstias (Nodari *et al.*, 2000).

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 *et al.*, 2002).

Dentre as várias plantas com atividade farmacológica conhecida, destacam-se algumas espécies do gênero *Passiflora*, conhecido popularmente no Brasil como

maracujá, cujas partes aéreas são tradicionalmente empregadas por suas propriedades sedativa, antiespasmódica e ansiolítica (Zuanazzi, 2000).

Desde a introdução em 1867 das fohas de *Passiflora* na medicina clássica (Freitas, 1985), *Passiflora incarnata* tem sido a espécie de maracujá que mais foi estudada em termos dos seus princípios ativos e ações farmacológicas, as quais têm sido parcialmente confirmadas por experiências em animais (Speroni *et al.*, 1988; Soulimani *et al.*, 1997). Esta espécie também é oficializada em diversas farmacopéias estrangeiras (Office, 1993; Suisse, 1995).

*P. incarnata* L. é nativa dos Estados Unidos, onde é muito cultivada e conhecida como *wild passion flower* ou como “maracujá-vermelho” (Souza *et al.*, 1997). Essa espécie cresce preferencialmente em solos secos e pobres (Soulimani *et al.*, 1997).

Recentemente a Resolução-RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, incorporou *P. incarnata* L. como uma das espécies, para as quais não serão necessários estudos complementares toxicológicos, pré-clínicos e clínicos para a obtenção de registro de medicamentos, em função da grande disponibilidade de acesso aos estudos sobre essa espécie (ANVISA, 2000), embora até hoje não existam resultados conclusivos que indiquem qual(is) do(s) constituinte(s) químico(s) presente(s) nas folhas de maracujá promovam esta ação (Dhawan *et al.*, 2001a). Entretanto, essa espécie não possui grande difusão no Brasil, o que pode estar relacionado ao fato de não se adaptar bem ao clima brasileiro e seu fruto possuir sabor amargo (Moraes, 1995), o que leva à necessidade de importação de partes aéreas de *P. incarnata* L. para a produção de medicamento fitoterápico segundo a RDC nº17 (ANVISA, 2000).

A espécie de maracujá oficializada pelas três primeiras edições da Farmacopéia Brasileira é *Passiflora alata* Dryander (Da-Silva, 1926; Farmacopéia, 1959;

Farmacopéia, 1977); indicando as folhas como parte utilizada. Apesar dessa espécie ainda ser pouco estudada (Oga *et al.*, 1984), a mesma tem sido substituída por outras espécies, como a *Passiflora edulis* Sims, cujos frutos são utilizados principalmente como alimento, sendo porém escassos os trabalhos que comprovem o uso desta como hipnótico-sedativo (Pereira *et al.*, 2000).

Entre as inúmeras espécies de *Passiflora* nativas do Brasil, encontra-se no Estado do Paraná *Passiflora actinia* Hooker, espécie onde poucos estudos químicos e farmacológicos foram realizados até o presente. Em 2000, Reginatto comparando por cromatografia em camada delgada, sete extratos de espécies de *Passiflora*, identificou manchas com  $R_f$  semelhante aos padrões dos flavonóides isoorientina e isovitexina em *P. actinia*. Em 2001, Kurtz demonstrou a presença de traços do alcalóide harmana na mesma espécie.

O fato da referida espécie não possuir estudos farmacológicos que justifiquem uma possível atividade psicofarmacológica, a facilidade de seu cultivo na região Sul do Brasil e a necessidade de estudos farmacológicos adicionais para as espécies de *Passiflora* nativas do Brasil, elegeu-se *P. actinia* Hook. como objeto deste estudo, através da avaliação de uma possível atividade ansiolítica e/ou sedativa, bem como dos constituintes químicos que possam justificar essa ação em potencial.

## 1.1. Considerações botânicas

### Posição sistemática da espécie:

#### Segundo Engler (Joly, 1998):

Divisão: Angiospermae (Anthophyta)

Classe: Dicotyledoneae

Subclasse: Archichlamydeae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae

Gênero: *Passiflora*

Espécie: *Passiflora actinia* Hooker

#### Segundo Cronquist (1988):

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Dilleniidae

Ordem: Violales

Família: Passifloraceae

Gênero: *Passiflora*

Espécie: *Passiflora actinia* Hooker

### Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae compreende cerca de vinte gêneros e seiscentas espécies, distribuindo-se principalmente nas Américas e na África (Barroso, 1978; Joly, 1998). 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).

O gênero predominante nessa família é o *Passiflora*, representado por aproximadamente oitenta espécies, cujo nome 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. Por essa razão, esses vegetais são conhecidos na Europa e América do Norte como flor-da-paixão (Barroso, 1978; Freitas, 1985).



**Figura 1:** Aspecto geral da *Passiflora actinia* Hooker, evidenciando seu hábito escandente.

## 1.2. Considerações químicas

Apesar das atividades farmacológicas de *Passiflora* serem relatadas desde o séc XVII, somente a partir do séc XIX, estudos farmacológicos que comprovam essas ações começaram a surgir (Hoehne, 1939).

Os estudos referentes à composição química de diversas espécies de *Passiflora* evidenciam principalmente os alcalóides e os flavonóides. Entretanto, outras substâncias como saponinas, glicosídeos cianogênicos, esteróides, lignanas, ácidos graxos, maltol, aminoácidos e taninos, também são citados freqüentemente na literatura (Alonso, 1998; Reginatto, 2000; Zuanazzi, 2000; Reginatto *et al.*, 2001).

Os alcalóides já encontrados no gênero *Passiflora* são do tipo indólico simples, derivados do sistema  $\beta$ -carbolina. Conhecidos como  $\beta$ -carbolinas ou alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, na formação desses compostos, a triptamina é condensada com o acetato e como característica em comum apresentam um anel adicional de seis membros (Cordell, 1981; Dewick, 1997). Vários alcalóides indólicos possuem atividade biológica

comprovada (Cordell, 1981), sendo geralmente essa ação mediada pela sua interação com um ou mais receptores específicos.

Muitos dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos são substituídos em C-1 por um grupo metila, sendo esse composto a partir de então conhecido como harmana (Cordell, 1981).

Fellows *et al.* (1938) foram os primeiros autores a pesquisarem alcalóides em *P. incarnata*., porém o extrato clorofórmico da mesma, frente aos reativos gerais para alcalóides (Mayer e Wagner), não apresentou reação positiva.

Entre 1954-1956, Neu citado por Souza (1997), isolou o alcalóide harmana a partir de partes aéreas *P. incarnata* e posteriormente detectou a mesma substância em *P. edulis* e *P. quadrangularis*.

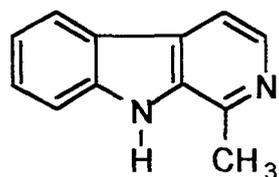
Estudos realizados com *P. incarnata* durante a década de 1960 detectaram, através de análises cromatográficas e espectroscópicas, os alcalóides harmana (1), harmina (2), harmol (3), harmalina (4) e harmalol (5) (Lutomski, 1959; Lutomski, 1960; Lutomski, 1967; Bennati *et al.*, 1968; Lutomski *et al.*, 1968; Bennati, 1971).

Rehwald *et al.* (1995) desenvolveram uma metodologia analítica para a detecção de alcalóides em *P. incarnata* que consistia na extração, purificação, concentração e posterior análise em CLAE da fração alcaloídica. Essa técnica foi sensível à detecção de harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol, porém em quinze amostras comerciais analisadas, somente uma apresentou traços de harmana.

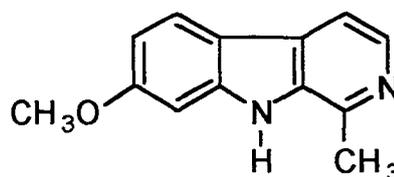
Dhawan *et al.* (2001a) consideraram os flavonóides como o maior grupo de constituintes já pesquisados no gênero *Passiflora*.

Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Essa forma conjugada, também conhecida por glicosídios, pode ser formada pela ligação de um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise

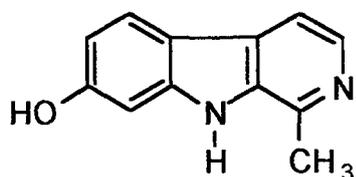
ácida (*O*-glicosídeo). Outra forma de conjugação de açúcares ao núcleo flavônico é por meio de ligação açúcar-genina entre carbonos C-1 (anomérico) do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonóide (*C*-glicosídeo). Quando o metabólito encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo também denominado de forma livre (Zuanazzi, 2000).



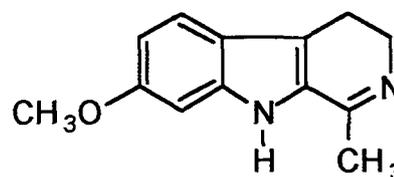
1



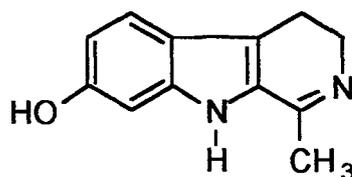
2



3



4



5

As atividades biológicas dos flavonóides no Reino Vegetal não são acidentais. Não atuam somente como pigmentos coloridos de flores, mas também como inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas, defesa contra exposição à radiação ultravioleta, agente quelante de metais nocivos para os vegetais e agentes redutores. Essa classe de compostos também está envolvida na fotossensibilização e transferências de energia, morfogênese e determinação sexual, níveis de respiração e fotossíntese, ação

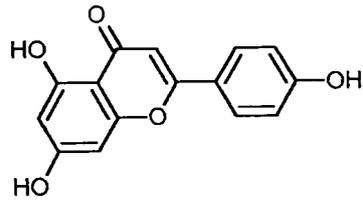
de hormônios e reguladores de crescimento, expressão e comportamento de genes (Carlo *et al.*, 1999).

Vários estudos relatam a presença dos seguintes flavonóides em *P. incarnata*: C-glicosil schaftosídeo, isoschaftosídeo, isovitexina-2'-O-glucopiranosídeo, orientina, isoorientina, isoorientina-2'-O-glucopiranosídeo, swertisina, isoscoparin-2''-O-glucosídeo, quercetina e kaempferol (Proliac *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1991; Rahman *et al.*, 1997).

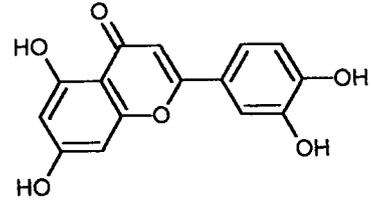
Em folhas de *P. sexflora*, McCormick *et al.* (1982) encontraram seis di-C-glicosilflavonas: lucenina-2, carlinosídeo, isoviolantina, schaftosídeo, vicenina-1 e isoschaftosídeo, e seis mono-C-glicosilflavonas: orientina, isoorientina, isoswertiajaponina, vitexina, swertiajaponina e isoswertisina. Em adição, luteonina-7-O-glucosídeo, luteonina e uma aurona (sufulrentina), também foram identificadas.

Ulubelen *et al.* (1982) pesquisaram três espécies de *Passiflora* e relataram a presença dos seguintes compostos: C-glicosídeo isovitexina, 2''-xilosilvitexina, luteolina-7-O-glicosídeo e uma mistura de vicenina-2, schaftosídeo e isoschaftosídeo em folhas de *P. pittieri*. A partir de *P. alata*, os autores obtiveram 2''-xilosilvitexina, vitexina, isovitexina e orientina. Saponarina foi somente encontrada em *P. ambigua*.

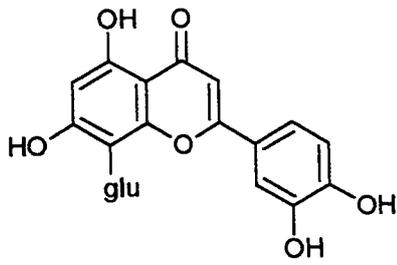
Os estudos em relação aos flavonóides de *Passiflora* relatam que são derivados da apigenina (6) e luteolina (7) (Geiger *et al.*, 1986). Alguns flavonóides, detectados com maior frequência no gênero *Passiflora* são os seguintes: orientina (8), homoorientina (9), isovitexina (10), vitexina (11), schaftosídeo (12) e swertisina (13) (Pereira *et al.*, 2000).



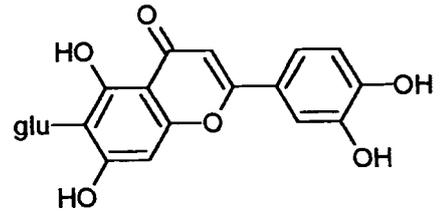
(6)



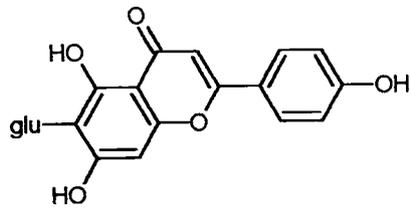
(7)



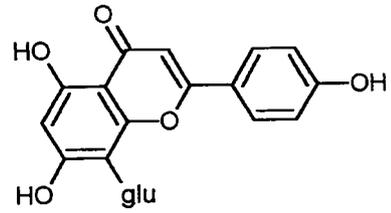
(7)



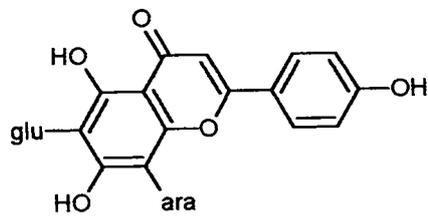
(9)



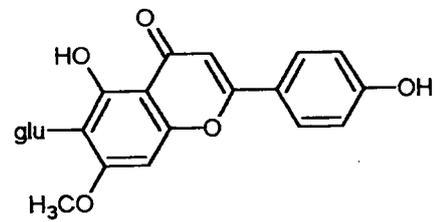
(10)



(11)



(12)



(13)

### 1.3. Considerações farmacológicas

A ansiedade é um estado emocional desconfortável semelhante ao medo, porém com a fonte de perigo incerta ou desconhecida. Quando a ansiedade atinge níveis patológicos, passa a ser considerada transtorno psiquiátrico e como tal, torna-se objeto de tratamento psicológico e/ou farmacológico. A palavra ansiolítico tem sentido figurado, pois literalmente significa “o que decompõe a ansiedade”. Passou a ser largamente empregada a partir da década de 1970 para designar medicamentos usados para o tratamento da ansiedade patológica (Graeff, 1993; Graeff, 1999).

A atividade sedativa pode ser definida pela redução da atividade locomotora e diminuição do nível de vigiância, útil para aliviar estados de excitação excessiva. Já o efeito hipnótico é o de induzir e manter o sono por certa duração (Guimarães, 1999).

Na medicina tradicional, a classe de drogas mais utilizadas como ansiolíticas e sedativas são os compostos benzodiazepínicos (BZD). Entretanto os BZD, além dessas ações, também promovem uma série de efeitos indesejados, como hipnose, relaxamento muscular, amnésia anterógrada, prejuízo do desempenho psicomotor, dependência, incompatibilidade com álcool e tolerância (Graeff, 1999). Devido a esses fatores, faz-se necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas, capazes de produzir uma ação ansiolítica e/ou sedativa desprovida desses efeitos.

Inúmeras drogas vegetais, como *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Hypericum perforatum* L., vêm sendo usadas na medicina popular devido a suas propriedades “tranquilizantes” (Coleta *et al.*, 2001). Entre estas, o gênero *Passiflora* é mundialmente conhecido por suas propriedades terapêuticas sobre o Sistema Nervoso Central, fato que vem sendo cientificamente comprovado desde meados do séc. XX (Ruggy *et al.*, 1940; Lutomski *et al.*, 1975; Loggia *et al.*, 1981).

Em 1940, Ruggy *et al* trabalhando com um derivado obtido do extrato fluido de *P. incarnata* L., observaram a diminuição da pressão sanguínea e da contração da musculatura lisa do intestino e do útero em mamíferos. Em 2000, Shi *et al.* observaram um efeito vaso-relaxante similar, trabalhando com o alcalóide harmana, isolado de *Pegamum harmala* L.

Alguns alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, como a harmina, possuem acentuada atividade alucinógena, bem como promove tremores quando aplicadas intracerebralmente em ratos (Cordell, 1981; Schripsema *et al.*, 2000). A capacidade de ligação dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos aos receptores benzodiazepínicos em ratos foi apresentada por Rommelspacher *et al.* (1980), sendo a harmana e a norharmana os mais potentes inibidores destes. Posteriormente em 1996, Peppinkhuizen *et al.* demonstraram que em altas doses, o alcalóide norharmana ligava-se aos receptores benzodiazepínicos, bem como inibia a atividade da enzima monoaminoxidase B (MAO-B). Experimentalmente o mesmo alcalóide induziu sedação e relaxamento da musculatura lisa.

A atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *P. incarnata* foi sugerida por Borreli *et al* (1996) ao verificar que este inibia significativamente a formação de granulomas induzidos em ratos (75 a 500mg/kg, *p.o.*), porém sem se ter conhecimento dos mediadores endógenos envolvidos, bem como do grupo de constituintes químicos presentes no extrato, responsável por essa ação.

Em 1974, foi relatado que os derivados da pirona (maltol e etil maltol), isolados a partir de *P. incarnata* L., causavam efeitos depressores em camundongos como: potencialização do sono induzido por hexobarbital, ação anticonvulsivante em altas doses e diminuição da atividade locomotora em doses relativamente baixas (1/10 da DL<sub>50</sub>) (Aoyagi *et al.*, 1974). Posteriormente, verificou-se que dois análogos maltol

obtidos por síntese (ácidos 2-butil e 2-isobutilpiromecônico) apresentavam um efeito anticonvulsivo mais potente que o maltol (Kimura *et al.*, 1980).

Entretanto, Soulimani *et al.* (1997) demonstraram que o maltol isolado, misturas de maltol e harmana e misturas de compostos flavonoídicos e maltol não apresentavam variação dos parâmetros comportamentais e diminuição da atividade locomotora mesmo em doses elevadas.

Esses mesmos autores confirmaram a atividade ansiolítica de *P. incarnata* L. no extrato hidroalcoólico (400mg/kg, *i.p.*) e a atividade sedativa da mesma a partir do extrato aquoso (400 e 800mg/kg, *i.p.*) em camundongos, caracterizando as atividades observadas dependente do solvente.

Em estudo químico-farmacológico, Lutomski *et al.* (1960) alertaram para a importância da presença do complexo alcalóide-flavonoíde na *P. incarnata*, para a obtenção de um melhor efeito farmacológico. Os mesmos autores ainda observam que esse complexo está presente no extrato etanólico.

O extrato aquoso (20 e 40mg/kg, via *i.p.*) de *P. edulis* f. *flavicarpa* Deneger, promoveu a depressão do SNC em camundongos, em abordagem farmacológica realizada por Vale *et al.* (1983). Neste estudo, os autores observaram indícios de que o princípio ativo responsável pela ação observada fosse de natureza protéica ou alguma molécula associada a proteínas.

Trabalhando com extrato fluído e evaporado obtido a partir de folhas de *P. alata*, contendo princípios flavonoídicos e alcaloídicos, Oga *et al.* (1984) relataram que o mesmo promoveu redução da atividade locomotora, prolongamento do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico e aumento no tempo de latência das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (doses de 75 e 159mg/kg, via *i.p.*).

Ao trabalhar com frações obtidas a partir do extrato fluido de *P. incarnata*, Speroni *et al.* (1988) obtiveram resultados semelhantes aos citados anteriormente, bem como que o aumento do limiar nociceptivo em ratos (160mg/kg, via *i.p.*). Esse resultado permitiu aos autores assegurarem que o extrato de *P. incarnata* possui uma complexa atividade sobre o SNC.

Utilizando o modelo experimental da ansiedade labirinto em cruz elevado (LCE), Wolfman *et al.* (1994) testaram a atividade do flavonóide crisina (1mg/kg, via *i.p.*) isolado de *P. coerulea* e concluíram que esse composto possivelmente se trata de um agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos (BZD), pois apresentou um decréscimo da ansiedade sem manifestações de atividade sedativa.

Ao contrário dessa observação, Zanolli *et al.* (2000), ao administrar os flavonóides crisina e apigenina obtidos respectivamente a partir de *P. incarnata* e *Matricaria chamomilla*, verificaram que ambos produziram uma redução da atividade locomotora espontânea em ratos (sedação) na dose de 25mg/kg (via *i.p.*). Na dosagem de 1mg/kg (via *i.p.*), somente a crisina produziu atividade ansiolítica no modelo de ansiedade claro-escuro. Entretanto, o efeito observado não pode ser atribuído aos receptores BZD, visto que estes se encontravam bloqueados por injeção do antagonista benzodiazepínico flumazenil.

Um estudo comparativo sobre atividade ansiolítica no LCE dos extratos hidroalcoólicos das espécies *P. alata* e *P. edulis* foi realizado por Petry *et al.* (2001). Ambos extratos, pela via intraperitoneal em ratos (100 e 150mg/kg), demonstraram atividade, apesar de o extrato de *P. edulis* ser mais efetivo em doses menores (50mg/kg). Trabalhando com o extrato aquoso dessas mesmas espécies, De-Paris *et al.* (2002) recentemente obtiveram resultados semelhantes, além de demonstrar que a composição flavonoídica de *P. edulis* é mais complexa do que a *P. alata*.

Em um estudo clínico duplo-cego, o extrato de *P. incarnata* foi comparado ao Oxazepam no tratamento do distúrbio de ansiedade generalizada. Os resultados sugeriram que o extrato foi tão efetivo quanto a droga controle no tratamento dessa patologia, bem como possuiu a vantagem adicional de apresentar baixo índice de reações adversas (Akhondzadeh *et al.*, 2001).

A partir de 2001, Dhawan *et al.* começaram a publicar uma série de experimentos em relação ao gênero *Passiflora*, dentre os quais um estudo comparativo da atividade biológica de extratos metanólicos igualmente obtidos de *P. incarnata* e *P. edulis*. A dose oral de 125mg/kg (via *p.o.*) do extrato metanólico das partes aéreas de *P. incarnata* apresentou significativa atividade ansiolítica em camundongos no modelo LCE, enquanto que *P. edulis* não apresentou atividade significativa em nenhuma das doses testadas (Dhawan *et al.*, 2001c). O posterior fracionamento do extrato metanólico de *P. incarnata*, possibilitou o isolamento uma substância benzoflavônica (BZF), o qual apresentou uma atividade ansiolítica expressiva (10mg/kg, *p.o.*) similar ao efeito exibido pelo dizepam (2mg/kg, *p.o.*) em camundongos submetidos ao LCE (Dhawan *et al.*, 2001a).

Esses mesmos autores analisaram extratos obtidos de diferentes órgãos vegetais de *P. incarnata* e observaram que o extrato metanólico das raízes dessa espécie não apresentava significativa atividade ansiolítica em relação aos demais órgãos vegetais (Dhawan *et al.*, 2001b). O extrato metanólico das folhas de *P. incarnata* apresentou atividade ansiolítica, propriedades anti-tussígenas (Dhawan *et al.*, 2002b) contra tosse induzida por SO<sub>2</sub> e propriedades afrodisíacas na dose de 100mg/kg em animais de laboratório (Dhawan *et al.*, 2002a) citado em Dhawan *et al.*, (2002c).

## 1.4. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a viabilidade de utilização da espécie *Passiflora actinia* Hooker, como fonte alternativa à espécie importada *P. incarnata* ou à espécie oficial *P. alata*., por meio de:

- Avaliação da atividade ansiolítica e sedativa e dos efeitos tóxicos agudos do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. actinia*;
- Análise da composição qualitativa dos flavonóides e alcalóides  $\beta$ -carbolínicos presentes na mesma;
- Identificação do(s) grupo(s) de constituinte(s), presente(s) em diferentes extratos e frações, responsável(is) pela ação observada nos modelos experimentais utilizados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1. Material botânico

A coleta das partes aéreas de *Passiflora actinia* Hooker foi realizada na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná (UFPR), entre os dias 24 de outubro a 6 de novembro de 2001.

As folhas frescas de *P. actinia* (23,85kg) foram devidamente estabilizadas por secagem em estufa à temperatura de 45°C e pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se 34,8% de material seco. A amostra coletada está registrada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob N° UCPB 30.831.

### 2.2. Métodos gerais

#### 2.2.1. Pesquisa de flavonóides

Os extratos e frações (100mg) foram aquecidos em solução de EtOH a 70% (10ml) por 2min. Em seguida foi realizada a reação de Shinoda, transferindo-se para um tubo de ensaio o extrato hidroalcoólico (5ml). Adicionou-se limalha de Mg (200mg) e HCl concentrado (1ml). Parte desse extrato foi tratado em folha de papel de filtro com solução de cloreto de alumínio 5% e visualizado sob luz UV.

#### 2.2.2. Pesquisa de alcalóides

Os extratos/frações (100mg) foram suspensos em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% (20ml). Em seguida a solução foi fervida e filtrada, sendo posteriormente alcalinizada com amônia diluída até pH 10-12. Procedeu-se à extração com clorofórmio e sendo a seguir a camada orgânica decantada para uma cápsula de porcelana, onde o extrato foi

evaporado em banho-maria até a secura. O resíduo foi então dissolvido em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% (5ml), e adicionados soluções dos reativos gerais de alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand).

### **2.2.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As cromatografias em camada delgada analítica foram feitas em placas pré-ativadas Merck com fase estacionária Kieselgel 60 (F<sub>254</sub>) e observadas em câmara de luz de UV ondas longas (365nm) e ondas curtas (254nm). Em seguida, essas foram reveladas utilizando solução de Dragendorff acético seguidas de aquecimento a 100°C (verificação de alcalóides). A solução reagente de NEU (solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 1% com solução etanólica de PEG 4000 a 5%) seguida de aquecimento a 100°C e irradiação por UV - 365nm, permitiu a observação de flavonóides (Wagner *et al.*, 1996).

As fases móveis utilizadas foram: *n*-hexano/tolueno/AcOEt (4:2:1); *n*-hexano/tolueno/AcOEt (8:2:1); AcOEt /H<sub>2</sub>O/HCO<sub>2</sub>H/CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (100:26:11:11); AcOEt /H<sub>2</sub>O/ HCO<sub>2</sub>H /CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (50:26:11:11).

### **2.2.4. Doseamento de flavonóides totais (Suisse, 1995)**

A dosagem de flavonóides totais expressos em hiperosídeos foi realizada para as folhas e o extrato hidroalcoólico da droga vegetal em estudo. Em um balão de fundo redondo foi colocada a droga em análise (600mg), juntamente com solução de hexametenotetramina a 0,5% (1ml), acetona (20ml) e solução de HCl a 25% (2ml). O balão foi levado a ebulição sob refluxo por 30min. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada através algodão hidrófilo para um balão volumétrico de 100ml. Ao balão contendo o resíduo foi adicionada acetona (20ml) e novamente levado ao refluxo por

10min. A seguir a mistura foi resfriada e filtrada para o mesmo balão volumétrico. Essa etapa foi repetida novamente e o volume do balão volumétrico foi completado para 100ml com acetona. Foram transferidos 20ml dessa solução para um funil de separação, ao qual foi adicionado H<sub>2</sub>O deionizada (20ml) e extraídos com AcOEt (4 x 10ml). Os extratos orgânicos obtidos foram reunidos em outro funil de separação e as impurezas extraídas com H<sub>2</sub>O deionizada (2 x 50ml). O extrato orgânico foi colocado em um balão volumétrico de 50ml e completado com AcOEt até a marca do menisco.

**Solução a ser doseada:** uma alíquota de 10ml da solução obtida, foi transferida para um balão volumétrico de 25ml, ao qual foi adicionado 1ml do reativo de AlCl<sub>3</sub> (20g/100ml em solução de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 5% em MeOH v/v). O volume foi então completado para 25ml com solução de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H a 5% em MeOH.

**Solução de compensação:** em um balão volumétrico de 25ml, foi colocado uma alíquota de 10ml da solução primeiramente obtida e o volume final foi completado com solução de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 5% em metanol. Após um período de 30min, foi realizada a leitura da absorvância a 422nm em aparelho espectrofotômetro Shimadzu UV 1601. A determinação do conteúdo total de flavonóides de cada amostra analisada foi determinada pela fórmula:

$$\text{Teor \% flavonóides} = A \times 1,25/M$$

Onde:  $A$  = absorvância a 422nm  
 $M$  = massa da amostra em gramas

Os resultados do conteúdo de flavonóides foram expressos tendo o hiperosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, PM 464,4) como substância de referência. As análises de doseamento foram realizadas em triplicata.

### **2.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

- **Instrumentação:**

As análises dos extratos foram realizadas utilizando o cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU LC-10; coluna C18 (Phenomenex), Luna 5 $\mu$  C18 (Dimensão 250 x 4,60mm), termostaticado a 30°C; detector SPD – M10A VP,  $\lambda$ = 350nm ou varredura de espectro *Photodiodearray* (240-400nm); *loop* de injeção: 20 $\mu$ l; Bomba: LC 10 VP; Sistema de dados: Class VP.

- **Condições cromatográficas para pesquisa de flavonóides C-glicosilados:**

Foi utilizada, como condição analítica, a fase móvel composta pela solução eluente A (H<sub>2</sub>O – EtOH: 100:0,5 - pH 2,88) grau CLAE, filtrada em membrana de celulose regenerada 0,4  $\mu$ m, eluente B (CH<sub>3</sub>OH) com grau CLAE e pelo eluente C (acetonitrila) com grau CLAE. O gradiente de eluição utilizado foi de zero a 20min 10% de B e 10% de C em A; de 20 a 30min 15% de B e 15% de C em A; de 30 a 35min 20% de B e 20% de C em A; e de 35 a 40min 25% de B e 25% de C em A. Foi estabelecido um fluxo de 1ml/min, à temperatura de 30°C e volume de injeção da amostra de 20 $\mu$ l.

- **Condições cromatográficas para pesquisa de alcalóides  $\beta$ -carbolicos:**

Foi utilizada como condição analítica a fase móvel composta pela solução eluente A (tampão fosfato monobásico de sódio 56 %), eluente B (MeOH 32 %) com grau CLAE e pelo eluente C (acetonitrila 12%) grau CLAE. Todos os eluentes foram posteriormente filtrados em membrana de celulose regenerada 0,45 $\mu$ m. O gradiente de eluição utilizado foi de zero a 5min 32% de B e 12% de C em A; de 5 a 20min 40% de B e 20% de C em A; de 20 a 30min 32% de B e 12% de C em A. Foi estabelecido um fluxo de 1ml/min, à temperatura de 30°C e volume de injeção da amostra de 20 $\mu$ l.

- ***Preparo da amostras:***

As amostras para análise em CLAE foram inicialmente filtradas com carvão ativado e diluídas em metanol 80% na proporção 1:1000, sendo submetidas posteriormente a mais um sistema de filtração utilizando uma membrana de celulose regenerada marca Schleicher & Schuell com poros de abertura 0,45µm.

- ***Padrões:***

A identificação de compostos por CLAE foi realizada por meio de comparação dos cromatogramas das amostras em análise, com os cromatogramas dos padrões comerciais Fluka de alcalóides β-carbólicos: harmana, harmina, harmalina, harmalol, harmol e amostras autênticas de flavonóides: isovitexina, vitexina, orientina, rutina e swertisina (cedidas pela Profª Maique Weber Biavatti, UNIVALI).

- ***Curva de calibração para o doseamento de isovitexina em CLAE:***

Cerca de 2mg da substância referência, isovitexina foi exatamente pesada e dissolvida em uma solução de MeOH-H<sub>2</sub>O na proporção de 1:1. A solução foi a seguir transferida para balão volumétrico de 100ml completando-se o volume com solução de MeOH na proporção de 1:1 (solução mãe). Aliquotas da solução-mãe foram diluídas com uma mistura MeOH-H<sub>2</sub>O na proporção de 1:1, obtendo-se soluções contendo isovitexina, nas seguintes proporções: 4,0; 8,0; 12,0; 16,0; 20,0µg/mL. As soluções foram filtradas através de filtro de membrana celulose e injetadas no cromatógrafo.

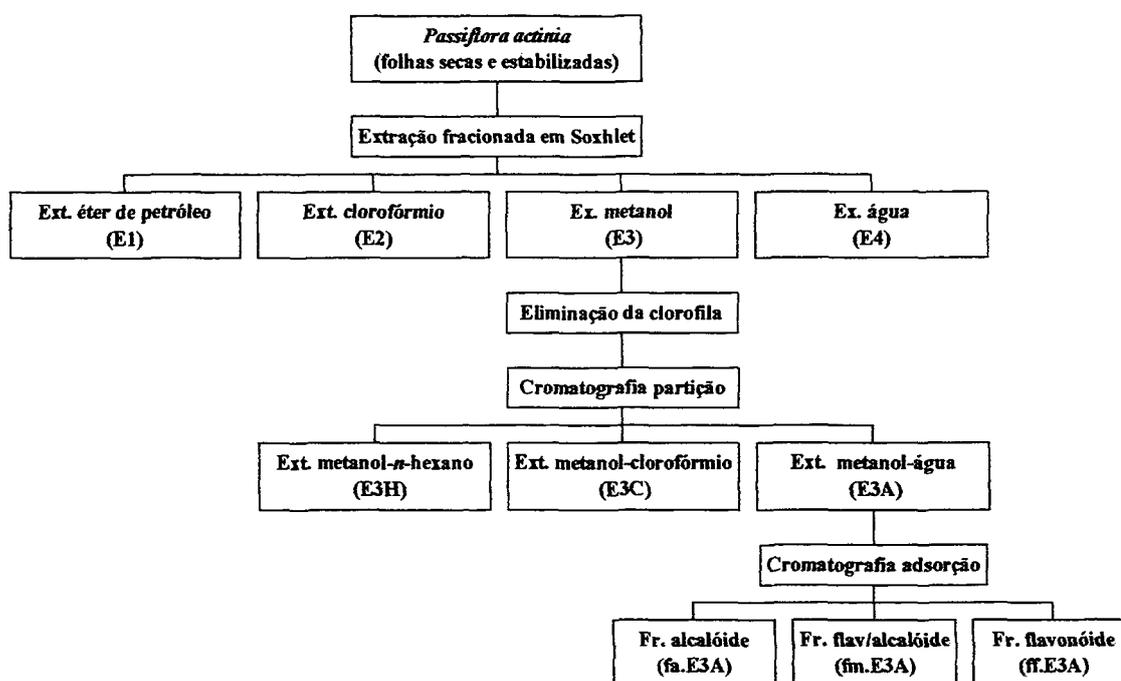
## **2.3. Análise química de *Passiflora actinia***

### **2.3.1. *Preparo dos extratos***

O extrato hidroalcoólico bruto de *P. actinia*, foi produzido de acordo com a metodologia proposta pela Farm. Bras. I para o preparo de tintura de *Passiflora alata* (Da-Silva, 1926).

Para a extração dos compostos químicos foi eleito o método de extração por aparelho de Soxhlet, de modo a proporcionar uma extração fracionada, para obtenção de compostos de polaridade crescente, conforme metodologia utilizada por Dhawan *et al.* (2001a), sumarizada no Esquema 1.

Folhas secas e pulverizadas de *P. actinia* (750g) foram extraídas sucessivamente até a exaustão com os solventes: éter de petróleo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH e H<sub>2</sub>O deionizada, os quais foram identificados respectivamente da seguinte maneira: E1; E2; E3 e E4. Os solventes foram evaporados em rotavapor sob vácuo, pesados e conservados em refrigerador a 4°C.



**Esquema 1.** Fluxograma da extração e fracionamento das folhas de *P. actinia*.

### **2.3.2. Eliminação da clorofila do extrato metanólico (E3)**

O extrato metanólico (100g) foi suspenso em água deionizada (1000ml) e deixado sob agitação mecânica constante em banho de gelo por 8h. Após esse período, a suspensão foi colocada em refrigerador a 4°C por 12h, quando ocorreu a deposição do material lipossolúvel nas laterais e fundo do recipiente. Posteriormente, o material foi

filtrado em funil de Büchner através de papel e o resíduo, desprezado. Cerca de 800ml de filtrado (E3-filt) obtido foi armazenado em refrigerador a 4°C.

### ***2.3.3 Preparo do extrato metanol-n-hexano (E3H)***

O filtrado (E3-filt) obtido (800ml) foi transferido para um funil de separação e extraído com *n*-hexano (4 x 300ml). As fases orgânicas reunidas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50°C. O material obtido foi transferido para recipiente de vidro com tampa, pesado, identificado como extrato metanol-*n*-hexano (E3H), e armazenado em refrigerador a 4°C.

### ***2.3.4. Preparo do extrato metanol-clorofórmio (E3C)***

A fase aquosa (650ml) resultante da extração de E3H foi submetida à extração com clorofórmio (4 x 300ml). As camadas orgânicas foram reunidas no balão de vidro de fundo redondo com rolha esmerilhada e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50°C. O material obtido foi transferido para recipiente de vidro com tampa, pesado, identificado como extrato metanol-clorofórmio (E3C) e armazenado em refrigerador a 4°C.

### ***2.3.5. Preparo do extrato metanol-água (E3A)***

Após a extração das fases clorofórmicas, a fase aquosa (500ml) foi transferida para balão de vidro e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida na temperatura de 50°C, usando EtOH de modo a obter uma mistura azeotrópica. O material obtido foi acondicionado em recipiente de vidro, pesado, identificado como extrato E3A e armazenado em refrigerador a 4°C.

### **2.3.6. Cromatografia de adsorção em coluna de E3A**

O extrato E3A (20g) foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna, usando como fase estacionária óxido de alumínio 90 Merck (70-230 mesh), atividade II-III e padronizado para análise de adsorção cromatográfica segundo Brockmann (200g). Seguiu-se a seguinte ordem de eluição de solventes: CHCl<sub>3</sub>; CHCl<sub>3</sub>/MeOH (99:1); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:2); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (7:3); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1); CHCl<sub>3</sub>/MeOH (3:7); MeOH; MeOH/H<sub>2</sub>O(1:1); MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7); H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O alcalinizada com NH<sub>4</sub>OH até pH 9,5. Desse fracionamento foram obtidas dezessete frações brutas, sendo que as frações 3-6 apresentaram manchas marrom-avermelhadas similares em CCD, quando reveladas com Dragendorff acético. As frações reunidas foram identificadas como fração “alcalóide” (fa.E3A), evaporadas, pesadas e armazenadas em refrigerador. As frações 7-13 apresentaram perfil cromatográfico semelhante, quando reveladas com solução de Dragendorff acético e solução reagente de NEU. Essas frações foram reunidas, identificadas como fração “alcalóide”-flavonóide (fm.E3A), pesadas evaporadas e armazenadas em refrigerador. As frações 14-16 apresentaram manchas amarelas similares em CCD quando reveladas com solução reagente de NEU e observadas sob luz UV ondas longas 365nm, sendo então reunidas, identificadas por fração flavonóide (ff.E3A), evaporadas, pesadas e armazenadas em refrigerador a 4°C.

### **2.4. Observação dos efeitos agudos com doses elevadas**

Após um período de 12h em ambiente escuro e com privados de alimentação, camundongos receberam injeções (*i.p.*) de extrato hidroalcoólico de *Passiflora actinia*, em doses progressivamente aumentadas, para a determinação da toxicidade aguda. Foram empregadas as doses de 100, 300, 600, 900, 1200 e 1800mg/kg (n=10/dose).

Observações quanto à presença de micção, defecação, exoftalmia, *grooming* excessivo, salivação excessiva, ptose palpebral, perda do reflexo postural, ataxia, tremores, convulsões e morte foram realizadas nos tempos de 5, 15 e 30min e 1, 2, 4 e 24h após as administrações. Em seguida, os animais foram observados duas vezes ao dia, durante sete dias, período este que tinham livre acesso à água e comida.

## **2.5. Estudo das propriedades ansiolítica e sedativa**

### **2.5.1. Animais**

Foram utilizados camundongos albinos, variedade *Swiss*, machos e adultos (30-45g), provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais foram mantidos em uma sala equipada com ciclo de iluminação 12h claro - 12h escuro (luz às 6h00min), à temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com alimentação e água à vontade. Os experimentos foram executados com os cuidados necessários para minimizar o sofrimento animal, segundo norma internacional.

### **2.5.2. Tratamentos**

Os extratos: hidroalcoólico (30, 100, 300mg/kg), metanólico (100, 300 e 600mg/kg) e metanol-água (30, 100 e 300mg/kg); e as frações: “alcalóide” (10, 30 e 100mg/kg), e “alcalóide”-flavonóide (10, 30 e 100mg/kg) foram diluídos em solução estéril de salina. Os extratos: metanol-*n*-hexano (30, 100 e 300mg/kg) e metanol-clorofórmio (30, 100 e 300mg/kg) e a fração flavonóide (10, 30 e 100mg/kg) foram suspensos em solução salina com DMSO a 2% (veículo). O diazepam (1mg/kg), diluído em solução apropriada (60% PEG e 20% álcool benzílico em água destilada), para ser utilizado como controle positivo do teste do Labirinto em cruz elevado.

### 2.5.3. Testes comportamentais

- **Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O LCE consistiu de um equipamento, feito de madeira, elevado 100cm do solo, com dois braços abertos (24 x 8cm), sem paredes laterais, cruzados perpendicularmente por dois braços de mesma dimensão, fechados por paredes laterais de 20cm de altura. Em adição, uma pequena parede de acrílico de 1mm de altura foi acoplada ao redor dos braços abertos do equipamento, para evitar a queda dos animais. O LCE foi desenvolvido por Handley *et al.* (1984), com base em observações de que ratos apresentam aversão por espaços abertos e elevados (Montgomery, 1955). Esse modelo experimental foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente como um modelo que pode detectar efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas por meio da análise de índices obtidos com o comportamento exploratório dos roedores (Lister, 1987; Pellow *et al.*, 1986). Para cada extrato testado os animais utilizados foram divididos do seguinte modo: grupo controle (tratado com solução de salina ou veículo) e de três a quatro grupos tratados com diferentes concentrações do extrato ou fração em análise, para a confecção das curvas dose-efeito. Trinta minutos após receberem injeção intraperitoneal do extrato ou da salina/veículo respectivo, os animais foram submetidos ao teste LCE por um período de 5min, onde tiveram seus comportamentos avaliados. Após cada sessão do teste, o aparato era higienizado com solução de EtOH a 70%.

As seguintes medidas foram tomadas: número de entradas e tempo despendido nos braços abertos, número de entradas e tempo despendido nos braços fechados. Com esses resultados, foram calculados os índices: Porcentagem de entradas nos braços abertos =  $\text{entradas nos braços abertos} \div (\text{entradas nos braços abertos} + \text{entradas nos$

braços fechados) x 100 e Porcentagem de tempo nos braços abertos = tempo nos braços abertos ÷ (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x 100.

- ***Teste do Campo Aberto (CA)***

Imediatamente após a exposição ao LCE, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e avaliados por um período de 5min. Após cada sessão do teste, o aparato foi higienizado com solução de EtOH 70%. O campo aberto consistiu de uma caixa de madeira (45 x 45 x 30cm) dividida em doze quadrantes iguais de 13cm<sup>2</sup>. Durante o período de avaliação, foi permitido que o camundongo explorasse livremente o espaço, sendo os seguintes comportamentos registrados: 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).

#### ***2.5.4. Análise estatística dos resultados***

Os resultados obtidos com as amostras testadas foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey.

O teste “t” de Student foi utilizado na análise dos valores comparativos obtidos entre a droga padrão (haloperidol/dizepam) com o seu controle (salina/veículo).

## **2.6. Medida da catalepsia**

A catalepsia foi avaliada 30 e 60min após a administração de salina ou veículo (controle) ou droga, de acordo com o procedimento descrito por Sandberg *et al.* (1980; 1984). Cada animal teve suas patas dianteiras delicadamente colocadas sobre bastões de vidros (0,5cm de diâmetro) suspensos 4,5cm por de uma base de apoio. O tempo em que o animal permaneceu em posição imóvel foi registrado dentro de um intervalo de 5min (Zarindast, 1993), sendo que durante esse intervalo, três tentativas foram realizadas. A postura de imobilidade normalmente não ocorre em animais normais ou controle.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Vários estudos referentes às diferentes espécies de *Passiflora* têm-lhes atribuído, atividades psicotrópicas (Soulimani *et al.*, 1997; Speroni *et al.*, 1988; Wolfman *et al.*, 1994). Dentre as muitas espécies de maracujás nativas do Brasil, *Passiflora actinia* Hooker destaca-se por crescer abundantemente nos estados da região Sul (Cervi, 1981) e por praticamente não existirem estudos farmacológicos e químicos a seu respeito.

A espécie de maracujá presente na F. Bras. III é *Passiflora alata* Dryander, enquanto que a espécie oficial indicada na Resolução - RDC n.º 17 da ANVISA (ANVISA, 2000) é *Passiflora incarnata* Linneaus, pelo fato desta ser a espécie que apresenta uma quantidade substancial de estudos que justifiquem sua atividade terapêutica.

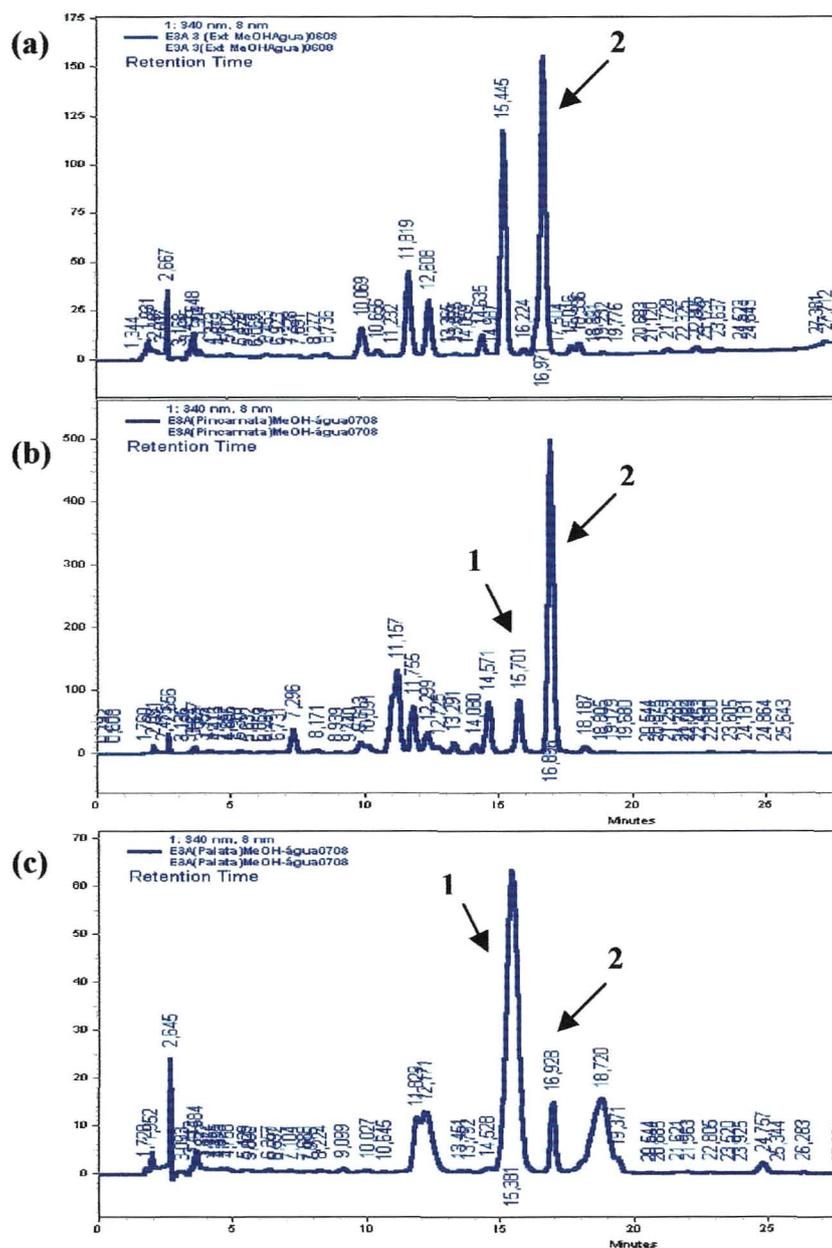
Em 2001, estudo realizado por Kurtz neste Programa de Pós-graduação demonstrou a presença de traços do alcalóide  $\beta$ -carbolínico harmana na fração alcaloídica de um extrato obtido a frio de *P. actinia* e ausência dos outros alcalóides do mesmo núcleo citados na literatura como sendo constituintes de *Passiflora incarnata* (Bennati, 1971; Lutomski, 1959). Neste trabalho não foram realizados estudos a respeito dos componentes flavonoídicos dessa espécie.

### **3.1. Análise comparativa em CLAE dos perfis flavonoídicos dos extratos de *P. incarnata*, *P. actinia* e *P. alata***

Com o objetivo de verificar a viabilidade da espécie local, inicialmente, procedeu-se a um estudo do perfil cromatográfico para flavonóides das três espécies (*P. incarnata*, *P. actinia* e *P. alata*) em CLAE.

Os flavonóides são considerados por alguns autores como sendo o maior grupo de constituinte presente no gênero *Passiflora* (Dhawan *et al.*, 2001a), sendo em grande parte C-glicosilados e com polaridade elevada. Essa característica possibilita uma eficiente separação e análise por meio de CLAE em coluna de fase reversa (Moraes, 1995).

Na análise cromatográfica em CLAE dos extratos metanólicos desclorofilados das espécies mencionadas nas mesmas condições, observou-se que o extrato da *P. incarnata* apresenta um perfil flavonoídico mais semelhante ao extrato de *P. actinia* do que ao extrato de *P. alata*, conforme pode ser observado na Figura 2.



(16,97min). Não foi constatada a presença de orientina, swertisina e rutina em nenhum dos extratos analisados.

Rehwalde *et al.* (1994) observaram que isovitexina é um dos flavonóides que apresenta concentração mais expressiva em amostras de *P. incarnata*. A identificação da isovitexina feita por meio da comparação dos tempos de retenção de picos e dos espectros UV foi considerada, pelos autores, uma forma segura de identificação de compostos quando são usados padrões adequados.

Além do fato de a isovitexina ser o componente majoritário em *P. actinia* e em *P. incarnata*, também foi observada a presença de picos em tempos de retenção e espectros de UV similares nas mesmas. A semelhança entre essas duas espécies também se faz presente na maior variedade de flavonóides observados em seus respectivos cromatogramas, quando esses são comparados ao cromatograma de *P. alata*.

Dessa forma, o estudo preliminar dos três extratos demonstrou, sob a ótica química, que poderia haver a possibilidade da espécie *P. actinia* ser uma alternativa de substituição à espécie importada, devido à semelhança dos perfis cromatográficos apresentados pelas mesmas.

### **3.2. Observação dos efeitos tóxicos agudos com doses elevadas do extrato hidroalcoólico de *P. actinia***

A toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de *P. actinia* (EHB), administrado pela via intraperitoneal, em camundongos foi baixa. Não houve morte ou qualquer outro sinal de toxicidade com as doses empregadas, inferiores a 1800mg/kg, enquanto que Speroni *et al.* (1988), relataram que o extrato aquoso liofilizado de *P. incarnata* (administração *i.p.* em camundongos) não apresentou toxicidade aguda até doses que corresponderam à metade da empregada em *P. actinia*. Apenas com a administração das

doses mais altas do EHB (1200 e 1800mg/kg), os animais apresentaram contorções abdominais e distensão das patas posteriores logo após a administração do extrato, indicando um possível efeito irritativo local. Nenhuma alteração comportamental importante foi detectada com os tratamentos empregados.

Comparado com dados similares verificados para outras espécies de *Passiflora* nativas do Brasil, sugere-se que o extrato hidroalcoólico de *P. actinia* possui uma toxicidade inferior ao extrato aquoso de *P. edulis* – DL<sub>50</sub> 1000mg/kg (Vale *et al.*, 1983), e o extrato líquido liofilizado de *P. alata*, que apresentou a DL<sub>50</sub> estimada em 456mg/kg (Oga *et al.*, 1984). Nesses dois trabalhos foram utilizados camundongos e a via utilizada foi a intraperitoneal.

### **3.3. Avaliação do modelo experimental Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

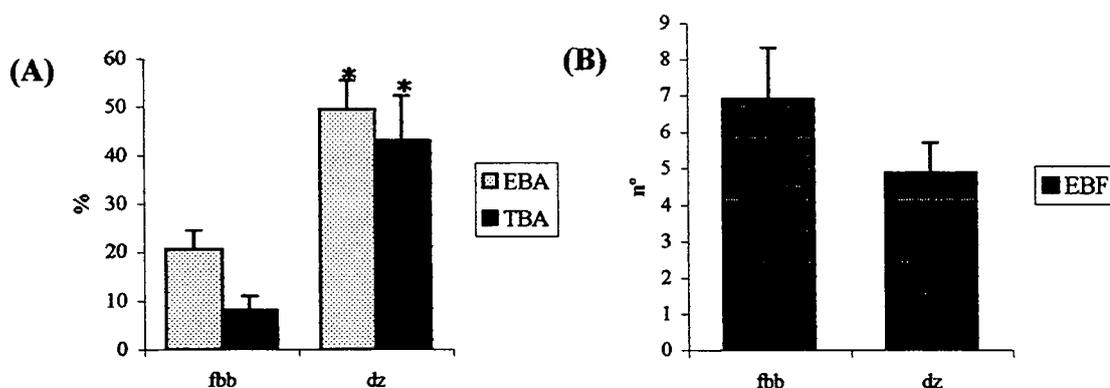
Uma série de estudos recentes vem utilizando o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) para a detecção de efeitos ansiolíticos de várias espécies de *Passiflora* em roedores (De-Paris *et al.*, 2002; Dhawan *et al.*, 2001a; Dhawan *et al.*, 2001c; Petry *et al.*, 2001)

Estudos iniciais de validação farmacológica, utilizando roedores, no modelo LCE mostraram que drogas que aliviam a ansiedade no homem, sobretudo BZD, aumentavam significativamente o número ou porcentagem de entradas nos braços abertos, bem como o tempo de permanência neles. Em contraste, não havia alteração do número de entradas nos braços fechados (Graeff, 1999).

Neste trabalho, a padronização das condições de ensaio no modelo foi realizada mediante a administração em camundongos, por via intraperitoneal de 1mg/kg de diazepam (DZ), um BZD, e seu veículo (fbb) composto por: 60% propilenoglicol + 2%

álcool benzílico em água destilada. Na Figura 3 pode-se observar o efeito ansiolítico do diazepam no LCE. No gráfico A, as colunas abertas representam a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), enquanto as colunas fechadas representam a porcentagem de tempo despendido nesses mesmos braços (%TBA). Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo que recebeu o veículo (fbb). No gráfico B as colunas representam o número de entradas nos braços fechados ( $n^{\circ}$ EBF), o qual não sofre alterações com a administração do diazepam. Esse resultado pode ser interpretado como um efeito ansiolítico seletivo, pois é desacompanhado de um efeito depressor sobre a atividade locomotora geral.

O efeito ansiolítico foi observado através do aumento da porcentagem de entradas ( $p < 0,05$ ) e tempo ( $p < 0,05$ ) despendidos nos braços abertos.



- $n^{\circ}$ EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*:  $p < 0,05$
- dz: diazepam
- fbb: veículo/control

**Figura 3:** Efeito da administração de diazepam (1mg/kg) comparado com o controle fbb (60% propilenoglicol + 2% álcool benzílico em água destilada). Os animais receberam os tratamentos (*i.p.*) 30min antes de serem submetidos ao LCE por 5min. As colunas representam as médias e as barras sobre as colunas, os EPM ( $n=10$ ).

A detecção do efeito sedativo de drogas pode ser observada em animais de laboratório pela diminuição da atividade locomotora espontânea (Graeff, 1999).

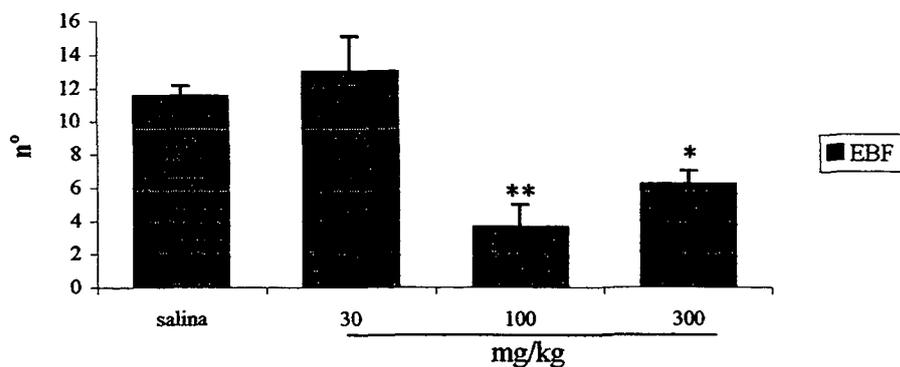
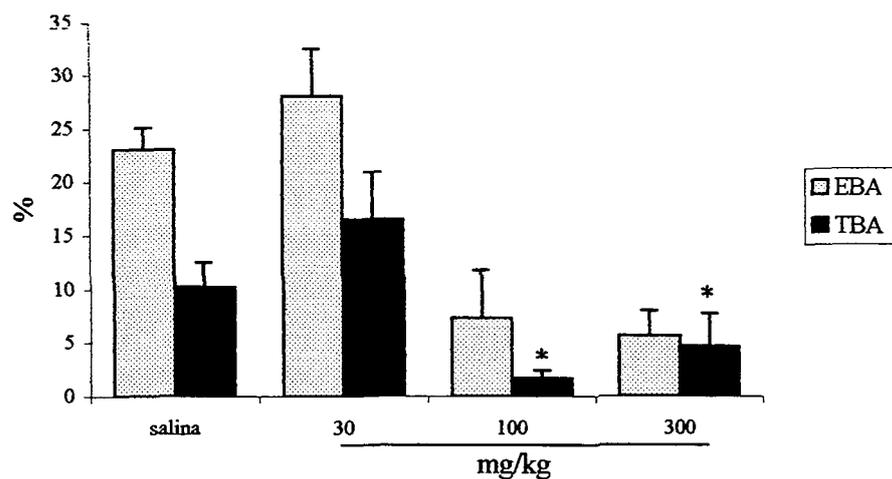
### **3.4. Atividade sedativa – ansiolítica do extrato hidroalcoólico de *P. actinia***

A avaliação das atividades sedativa e ansiolítica do extrato hidroalcoólico de *P. actinia* foram realizadas nos modelos Labirinto em cruz elevado (LCE) e Campo aberto (CA).

Ao submeter um grupo de camundongos ao tratamento agudo com extrato hidroalcoólico bruto (EHB) com as doses de 100 e 300mg/kg (*i.p.*), verificou-se uma diminuição significativa da porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{3,38}= 10,18$ ;  $p<0.05$ ) durante o período de 5min de avaliação no teste do LCE. Embora esse resultado possa ser usualmente interpretado como um efeito ansiogênico, essas mesmas doses também reduziram significativamente o número de entradas nos braços fechados ( $F_{3,38}=12,3$ ;  $p<0.05$ ), o que mostra na verdade, uma diminuição da atividade locomotora geral, o que pode ser interpretado como atividade sedativa (Figura 4).

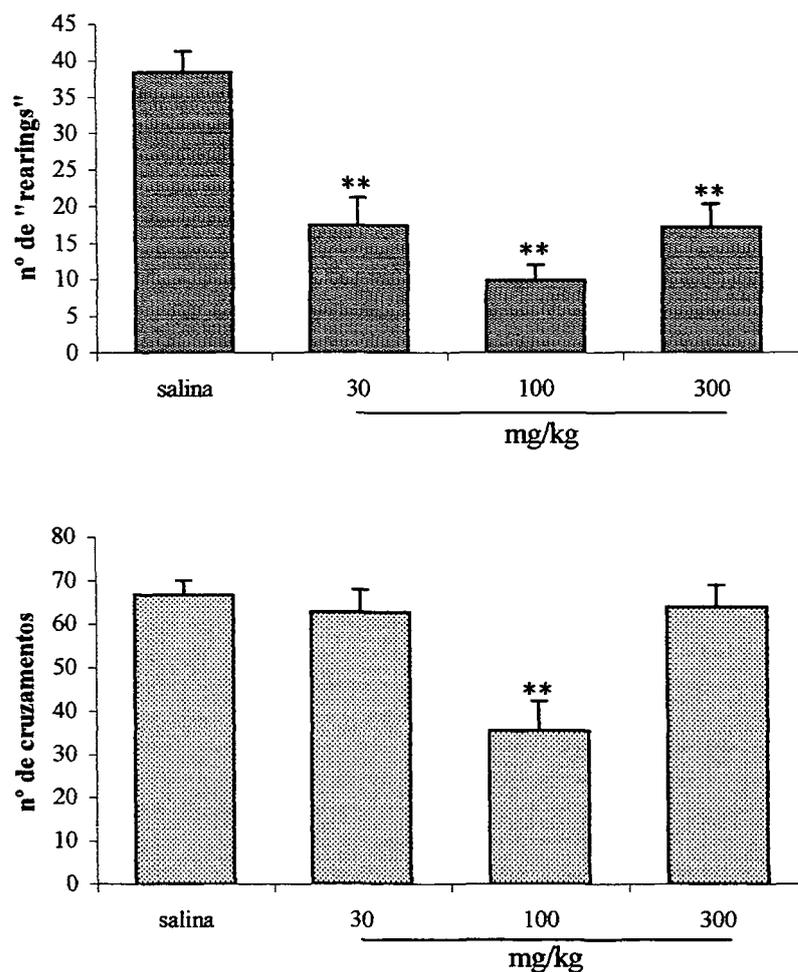
Apesar de não ter sido estatisticamente significante, o tratamento com o extrato hidroalcoólico a 30mg/kg resultou numa tendência a ação ansiolítica, observada pelo aumento da frequência de entradas e tempo despendidos nos braços abertos sem alteração no número de entradas nos braços fechados. Esse resultado sugere que provavelmente o intervalo entre a dose ansiolítica e a dose sedativa seja bastante estreito.

O efeito sedativo dessas doses do extrato hidroalcoólico também foi confirmado pela diminuição significativa do número de *rearings* (100 e 300mg/kg  $F_{3,38}=7,8$ ;  $p<0,001$ ) e cruzamentos (100mg/kg,  $F_{3,38}=8,33$ ;  $p<0,001$ ) no teste do CA (Figura 5).



- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*: p<0,05, \*\*p<0,001

**Figura 4:** Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico (EHB) de *Passiflora actinia* (30, 100 e 300mg/kg) em camundongos testados no LCE por 5min.



• \*:  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

**Figura 5:** Efeito sedativo da administração do EHB de *Passiflora actinia* (30,100 e 300mg/kg) em camundongos testados no CA por 5min.

### 3.5. Pesquisa da atividade dos extratos e frações de *Passiflora actinia*

Ultimamente, vários trabalhos têm relacionado à atividade ansiolítica de algumas espécies de *Passiflora* com a concentração e presença de flavonóides (Petry *et al.*, 1998; Dhawan *et al.*, 2001a; De Paris *et al.*, 2002). Após serem observadas a presença de flavonóides e a atividade sedativa no extrato hidroalcoólico de *P. actinia*, uma determinação quantitativa dos flavonóides na droga vegetal e no extrato

hidroalcoólico da espécie em estudo pareceu apropriada, visando uma comparação com *Passiflora incarnata*. Inicialmente, optou-se pela metodologia espectrofotométrica proposta para flavonóides totais expressos em hiperosídios na monografia de *P. incarnata* da Farmacopéia Helvética (Suisse, 1995). Para o extrato hidroalcoólico foi obtido um teor médio de  $0,655 \pm 0,016\%$ . Por essa mesma metodologia, também foi verificado o teor médio de  $0,656 \pm 0,006\%$  de flavonóides presentes nas folhas de *P. actinia*. Ambos os resultados estão de acima do teor mínimo de 0,3% de flavonóides indicados na literatura para partes aéreas de *P. incarnata*. Apesar desse método não ser sensível a presença de flavonóides C-glicosilados, visto que esses são resistentes a hidrólise ácida, esse método pode ser eficiente na detecção de possíveis adulterações da droga oficial.

Como as condições cromatográficas usadas na avaliação qualitativa do extrato exibiram separação e resolução adequada dos picos para os flavonóides, realizou-se a análise quantitativa em CLAE para estimar a concentração de flavonóides totais presentes no extrato hidroalcoólico na forma de isovitexina, por meio da plotagem da área dos picos presentes no cromatograma das amostras no gráfico da curva de calibração da isovitexina. O extrato hidroalcoólico apresentou um teor estimado em 0,027% de isovitexina e o extrato das folhas de *P. actinia* obtido por refluxo com etanol por 15min, 0,061%.

Apesar da predominância de estudos sobre flavonóides no gênero *Passiflora*, a presença de outras substâncias, como traços de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, derivados da pirona e até mesmo moléculas de caráter protéico, já foram sugeridas como substâncias com potencial atividade farmacológica (Lutomski *et al.*, 1960; Aoyagi *et al.*, 1974; Vale *et al.*, 1983).

Com o objetivo de estudar qual(is) seria(m) o(s) componente(s) responsável(is) pela atividade sedativa anteriormente observada, foi desenvolvida uma segunda etapa de trabalho, onde foram testados farmacologicamente uma série de extratos e frações, monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), testes químicos e CLAE frente a amostras autênticas de flavonóides C-glicosilados e padrões de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos já citados na literatura para o gênero *Passiflora*.

Essa etapa seguiu a metodologia utilizada por Dhawan *et al.* (2001a) para a extração bruta dos compostos químicos por aparelho de Soxhlet. Esse procedimento visa realizar uma extração fracionada para obtenção de compostos de polaridade crescente. Esses autores utilizaram na extração quatro solventes e observaram que somente o extrato metanólico de *P. incarnata* apresentava atividade ansiolítica no LCE, conforme pode ser observado na Figura 6.

Relative anxiolytic activity profile of the four extracts of *P. incarnata*

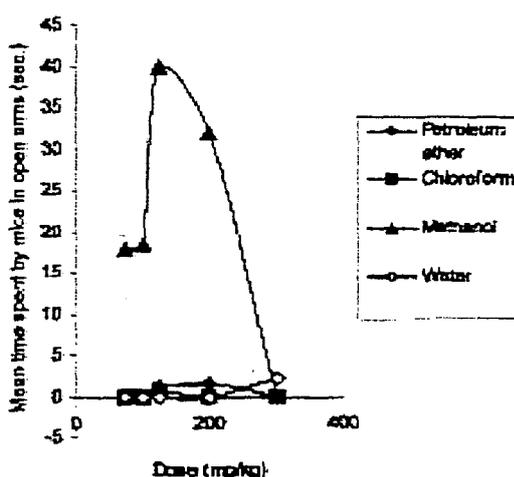
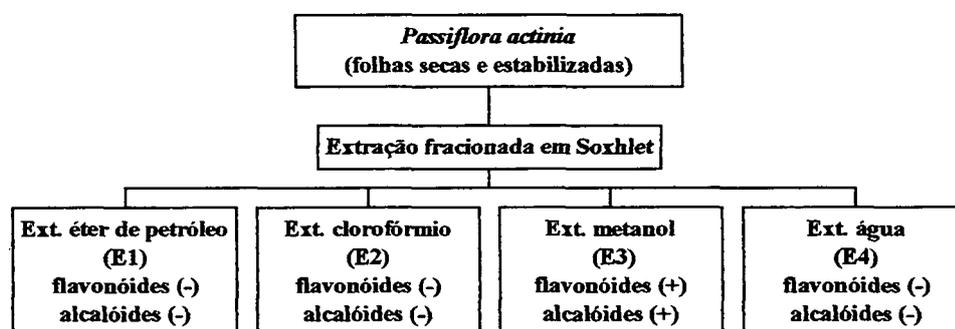


Fig. 1. Dose-response curve showing the anxiolytic profile as the mean time (seconds) spent by mice in the open arms of the elevated plus-maze.

**Figura 6:** Curva dose-resposta mostrando o efeito ansiolítico através da média de tempo (em segundos) gastos pelos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Dhawan *et al.*, 2001a).

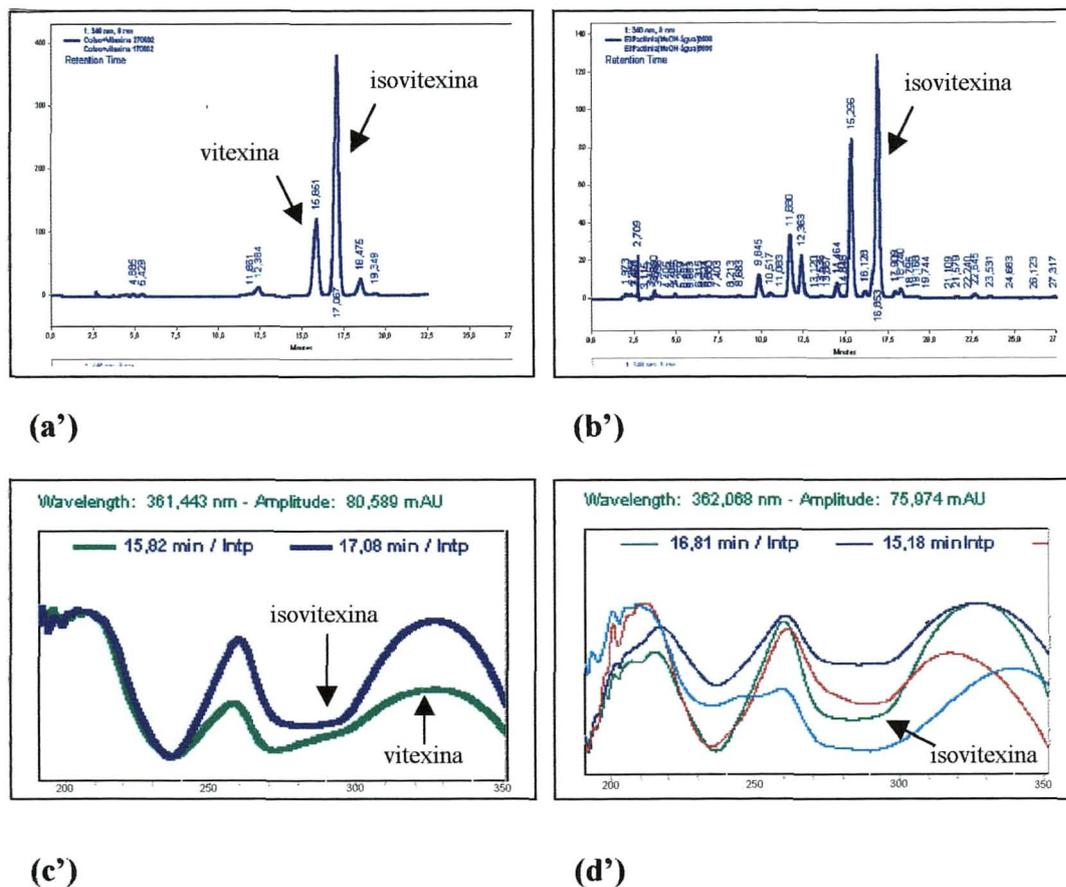
Folhas secas e pulverizadas de *P. actinia* (750g) foram extraídas sucessivamente até a exaustão com: éter de petróleo, clorofórmio, metanol e água deionizada (Esquema 2), sendo então os extratos identificados por E1 quando extraído com éter de petróleo (37,05g); E2, para clorofórmio (24,67g); E3, para metanol (103,86g); e E4 com água deionizada (48,13g).

Ao ser submetido à CCD, apenas o extrato E3 apresentou manchas características para flavonóides, quando reveladas com solução de NEU, e manchas características para substâncias de natureza alcaloídica, quando reveladas com solução de Dragendorff acético.



**Esquema 2:** Extração fracionada em Soxhlet das folhas secas e estabilizadas de *P. actinia*.

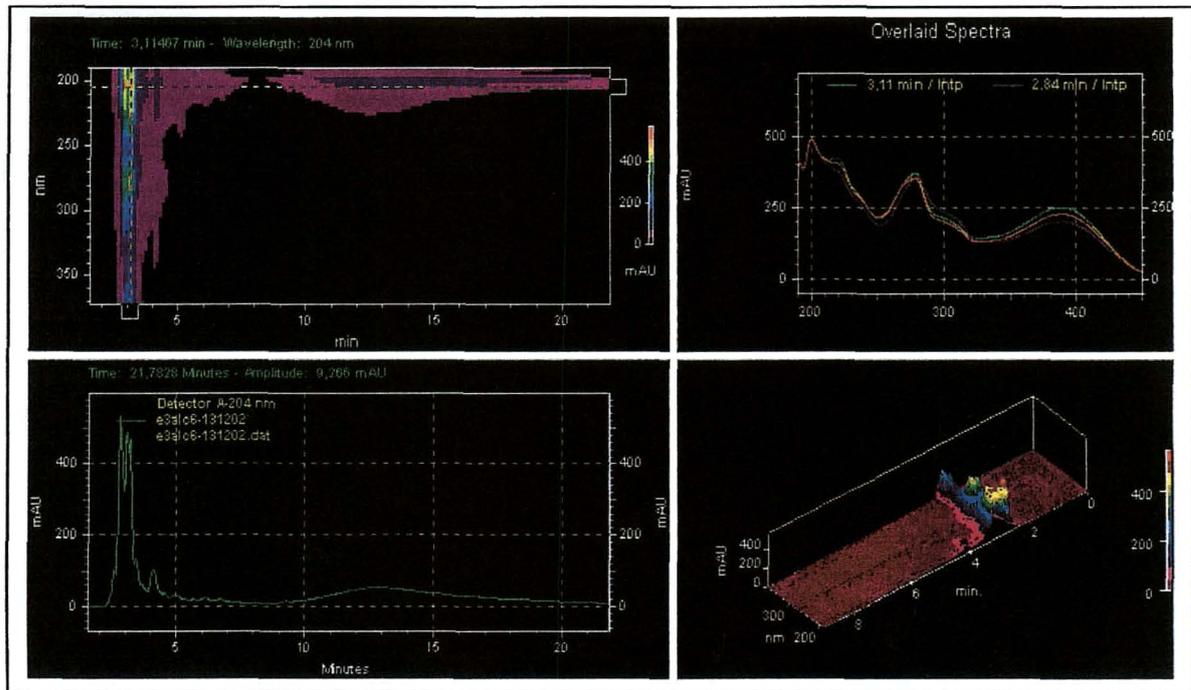
Quando o extrato E3 foi analisado em CLAE, sob sistema eluente para flavonóides, foram observados vários picos com espectros de absorção no UV característicos para essa substância, com dois máximos de absorção: a banda II, ocorrendo entre 240 e 285nm e a banda I entre 300 e 400nm (Zuanazzi, 2000). Esses espectros de UV, ao serem comparados com espectros de amostras autênticas (isovitexina, vitexina, orientina, swertisina e rutina), possibilitaram a identificação do composto majoritário isovitexina, com sinal superior a 120mAU, bem como traços de outros flavonóides não identificados (Figura 7). Não foi detectada a presença de orientina, swertisina, vitexina e rutina neste extrato.



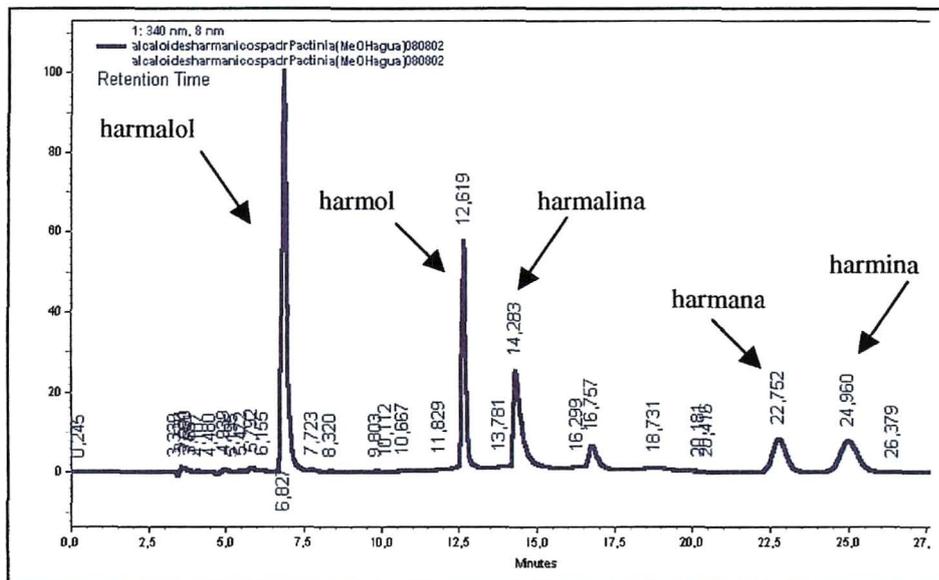
**Figura 7:** Cromatogramas dos padrões vitexina e isovitexina (a') do extrato E3 de *P. actinia* (b'). Espectros UV dos padrões vitexina e isovitexina (c') e de E3 (d'). Sistema eluente para flavonóides.

O sistema eluente para alcalóides não apresentou nenhum pico semelhante aos dos padrões autênticos de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos (Figura 8 e 9). Entretanto, nessa fase móvel foi possível observar a presença de uma série de picos, provavelmente formados por flavonóides, devido às absorções máximas em 280 e 390nm, mostrando um deslocamento batocrômico das absorções esperadas para flavonóides, como a isovitexina, em 260 e 330nm respectivamente. Acredita-se que esse deslocamento foi devido ao caráter básico da fase móvel utilizada como eluente, visto que a literatura relata que em metanol, a isovitexina apresenta dois máximos de absorção UV (271 e

336nm) e quando esta é submetida a um meio alcalino, as absorções máximas ficam deslocadas para 278 e 398nm (Mabry *et al.*, 1970).



**Figura 8:** Cromatograma e espectro UV do extrato E3 de *P. actinia* em sistema eluente para alcalóides.



**Figura 9:** Cromatograma e espectro UV do extrato E3 de *P. actinia* em sistema eluente para alcalóides.

Rehwald *et al.* (1995) trabalhando com quinze amostras comerciais de partes aéreas de *P. incarnata* sob CLAE verificou que apenas uma das amostras apresentava traços do alcalóide harmana. A concentração detectada do mesmo (0,55-2,92ppm), foi considerada pelos autores muito baixa para afirmar que os alcalóides são os princípios farmacologicamente ativos nesta espécie.

A solução aquosa de E3 em presença dos reagentes gerais para alcalóides (Mayer, Dragendorff, Bouchardat e Bertrand) apresentou uma reação forte, que não foi reproduzida após a alcalinização com amônia diluída (pH 10-12) e extração com clorofórmio (reação fraca). Contudo, quando a solução alcalinizada foi acidificada e submetida aos reagentes gerais para alcalóides, novamente ocorreu uma reação intensa, sugerindo que essa reação se deva a presença de outras substâncias, como alcalóides quaternários.

Flavonóides como vitexina, isovitexina e orientina foram descritos por Petry *et al.* (2001) no extrato hidroalcoólico de *P. edulis*. Os autores verificaram que esse extrato apresentava atividade ansiolítica em camundongos submetidos ao LCE e sugeriram que essa ação poderia estar relacionada com a presença desses constituintes. Resultados semelhantes foram divulgados por De-Paris *et al.* (2002) com o extrato aquoso da mesma planta.

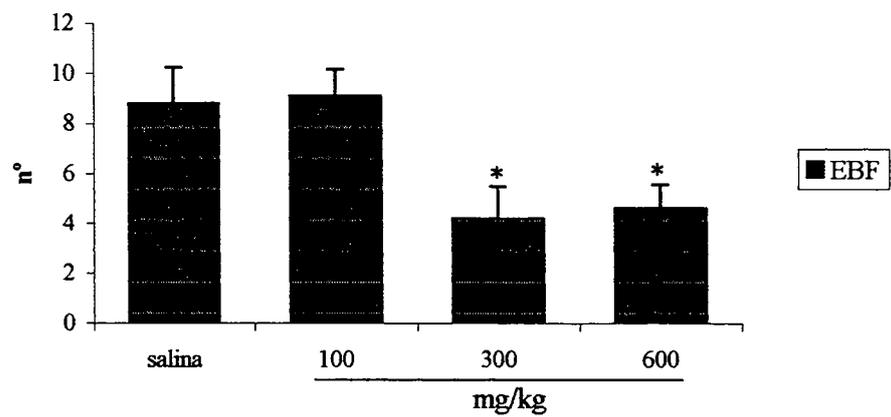
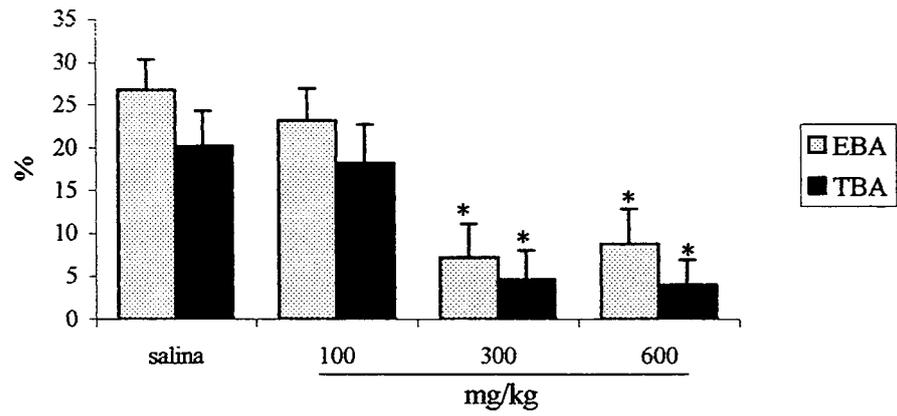
Oga *et al.* (1984) relataram a presença de vitexina, isovitexina e orientina em extrato hidroalcoólico de *P. alata* que apresentou redução da atividade locomotora, prolongamento do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico e aumento no tempo de latência das convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos (via *i.p.*; doses testadas: 75 e 150 mg/kg). Speroni *et al.* (1988) demonstraram que a fração apolar do extrato fluido de *P. incarnata* apresentava vários efeitos sobre o SNC. Apesar de não terem identificado o flavonóide vitexina nesta fração, os autores sugeriram que a

ação biológica poderia estar relacionada com a presença de flavonóides não glicosilados.

Neste estudo, comprovando a atividade sedativa inicialmente observada com o extrato hidroalcoólico, camundongos submetidos ao tratamento agudo com E3 de *P. actinia* nas doses de 300 e 600mg/kg, *i.p.*, apresentaram uma diminuição significativa da porcentagem de entradas ( $F_{3,40}=7,0$ ;  $p<0,05$ ) e da porcentagem do tempo despendidos nos braços abertos ( $F_{3,40}=9,8$ ;  $p<0,05$ ), durante o período de 5min de avaliação no teste do LCE (Figura 10). Além disso, as mesmas doses também causaram uma diminuição significativa do número de entradas nos braços fechados ( $F_{3,40}=5,2$ ;  $p<0,05$ ).

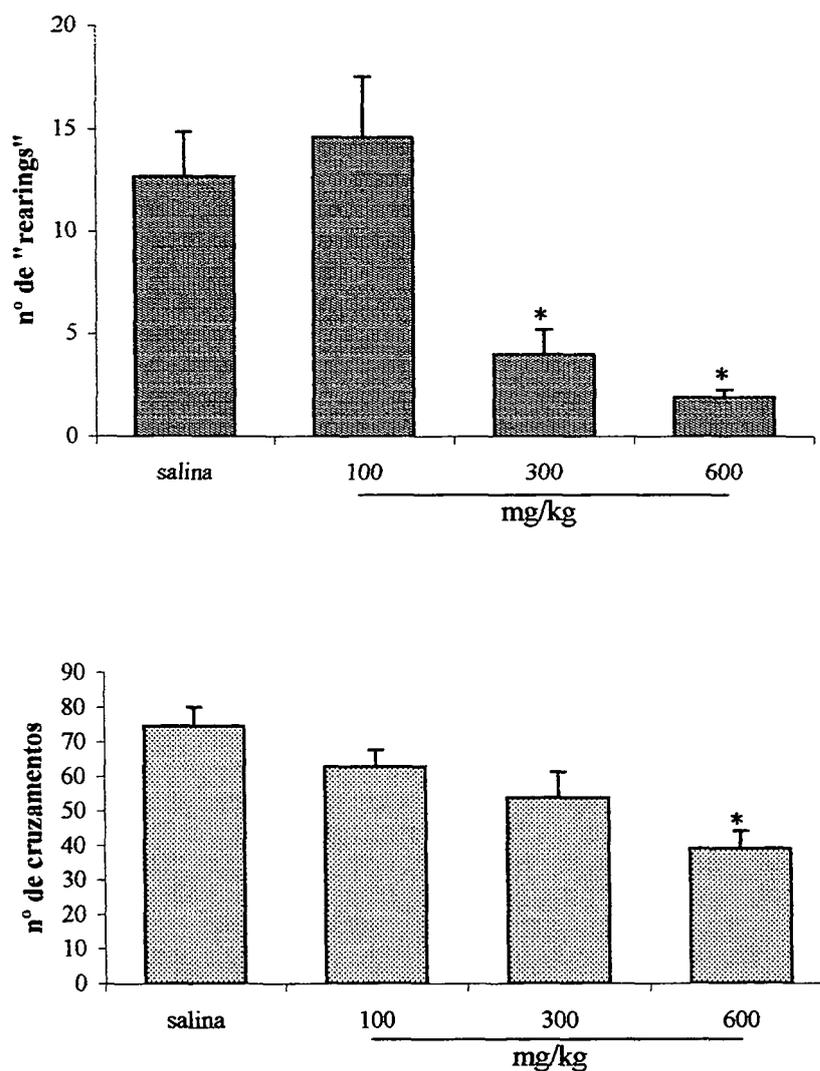
A redução na atividade locomotora do E3 foi confirmada pela diminuição significativa do número de *rearings* (300 e 600mg/kg  $F_{3,40}=6,2$ ;  $p<0,05$ ) e cruzamentos (600mg/kg,  $F_{3,40}=4,54$ ;  $p<0,05$ ) no teste do Campo Aberto. (Figura 11). Assim, como já demonstrado para o extrato hidroalcoólico, o extrato E3 (300 e 600 mg/kg) também apresentou efeito sedativo.

Da mesma forma, Soulimani *et al.* (1997), obtiveram resultado semelhante, trabalhando com extrato aquoso de *P. incarnata*. Doses de 400 e 800mg/kg (*i.p.*) produziram uma redução da atividade locomotora espontânea de camundongos nos testes da escada (*staircase*) e da exploração livre. Os autores não pesquisaram a presença de flavonóides no extrato aquoso de *P. incarnata*, porém demonstraram que a atividade sedativa desse extrato não é alterada na presença do bloqueador dos receptores BZD flumazenil.



- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*:  $p < 0,05$

**Figura 10:** Efeito da administração de E3 de *P. actinia* (100, 300 e 600mg/kg, *i.p.*) em camundongos avaliados no LCE.



• \*:  $p < 0,05$

**Figura 11:** Efeitos da administração de E3 de *P. actinia* (100, 300 e 600mg/kg, *i.p.*) em camundongos avaliados no CA. As colunas representam as médias e as o EPM de 10-12 animais.

A partir da década de 1990, vários autores têm sugerido que alguns flavonóides, como a crisina obtida a partir de *P. coerulea*, poderiam exercer atividade do tipo ansiolítica, atuando como agonistas parciais de receptores BZD (Wolfman *et al.*, 1994; Salgueiro *et al.*, 1997; Zanolli *et al.*, 2000).

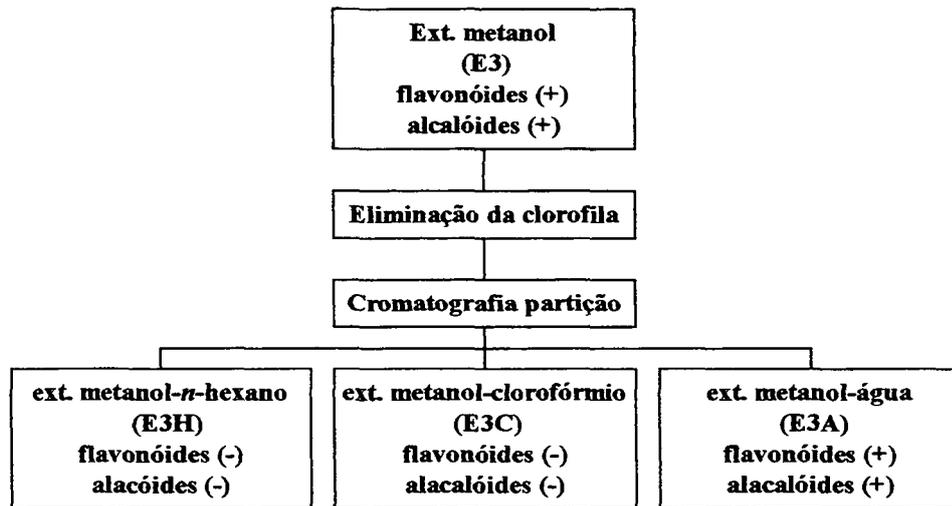
Entretanto, outros estudos sugerem que a atividade sedativa da apigenina obtida de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, não pode ser atribuída à interação dessa com

receptores BZD, visto que essa atividade não foi suprimida na presença do antagonista benzodiazepínico flumazenil (Avallone *et al.*, 2000; Zanoli *et al.*, 2000).

Os demais extratos (E1, E2 e E4) não apresentaram sinais característicos para substâncias alcaloídicas ou flavonoídicas em CCD e também não foram analisados quanto à atividade farmacológica, pois em trabalho similar, utilizando *P. incarnata*, os mesmos se mostraram inativos (Figura 6) (Dhawan *et al.*, 2001a).

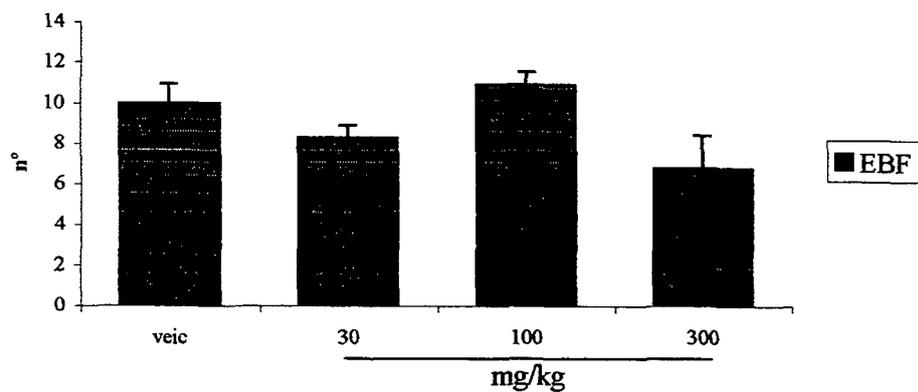
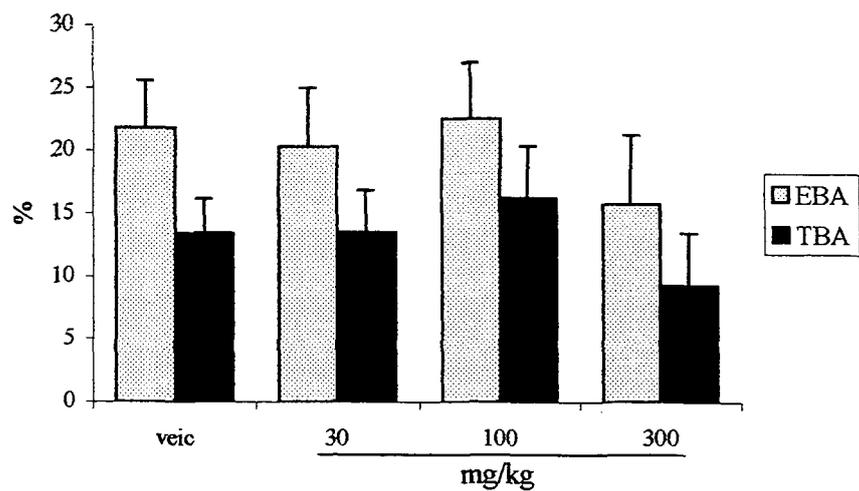
### **3.5.1. Separação dos compostos do extrato E3 por partição e análise dos extratos metanol-*n*-hexano (E3H) e metanol-clorofórmio (E3C)**

Após ter sido verificada a atividade farmacológica do extrato metanólico (E3), foi efetuada a precipitação da clorofila a frio sob agitação (Franchi, 2000). Este procedimento visou também reduzir a quantidade de compostos de natureza lipofílica e concentrar a quantidade dos supostos constituintes ativos de natureza polar presentes em E3 (flavonóides *C*-glicosilados e alcalóides). O extrato metanólico processado foi então submetido à partição com os solventes *n*-hexano e clorofórmio sucessivamente, obtendo-se os extratos 6,78g de E3H e 3,77g de E3C (Esquema 2). A finalidade desse procedimento foi separar constituintes de acordo com a sua afinidade pelo solvente. Ambos extratos não apresentaram presença de constituintes alcaloídicos ou flavonoídicos através de análise por CCD e reações químicas; a fase aquosa residual do processo de particionamento de E3, denominada de extrato E3A (70,3g), apresentou sinais positivos nas reações para flavonóides e alcalóides.



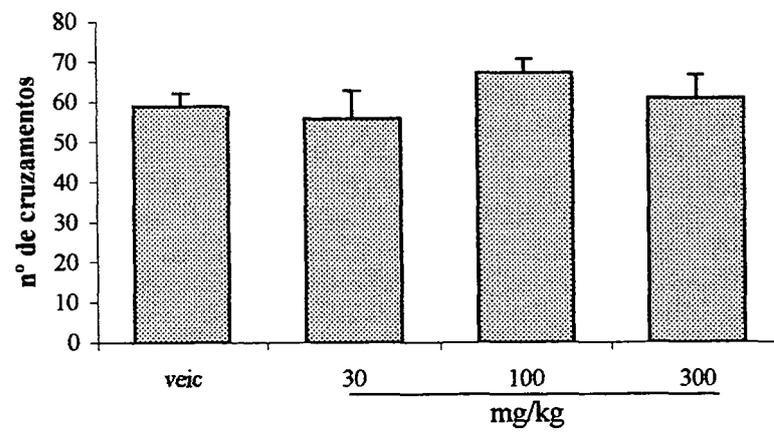
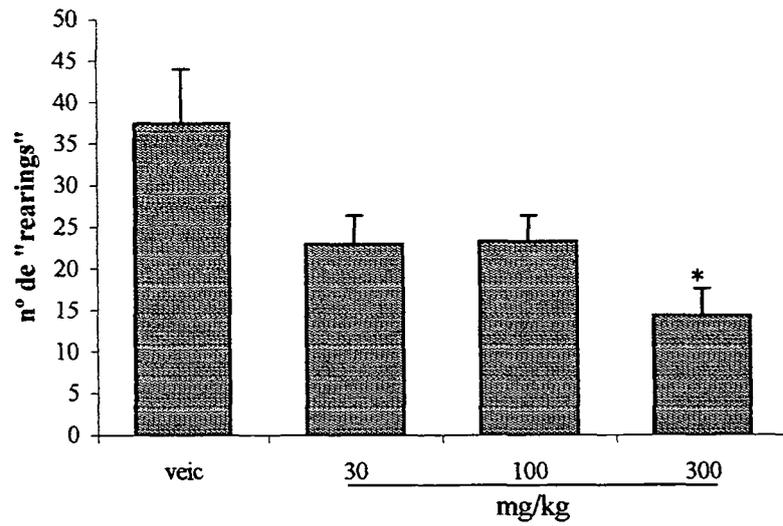
**Esquema 3:** Eliminação da clorofila e separação por particionamento do extrato metanólico (E3)

Devido ao fato de E3H e E3C serem originados de um extrato que apresentou atividade farmacológica, os mesmos foram submetidos aos ensaios farmacológicos do LCE (Figuras 12 e 14), sem apresentar atividade, e no CA (Figuras 13 e 15). Conforme pode ser observado nas Figuras 13 e 15, respectivamente, com a administração desses dois extratos, o único parâmetro alterado foi o número de *rearings* durante a exploração do CA com E3H (300mg/kg;  $F_{3,38}=5,03$ ;  $p<0,05$ ) e com E3C (100mg/kg;  $F_{3,39}=4,64$ ;  $p<0,05$ ). Entretanto, acredita-se que o fato registrado não se deva a alguma atividade sobre o SNC, pois nessas doses, foi observado que os animais apresentavam contorção abdominal, fato este, que poderia contribuir para a redução da atividade locomotora, devido à presença de desconforto na hora em que o animal se eleva sobre as patas posteriores. Além disso, essas doses não alteraram os demais parâmetros analisados nesses dois modelos experimentais.



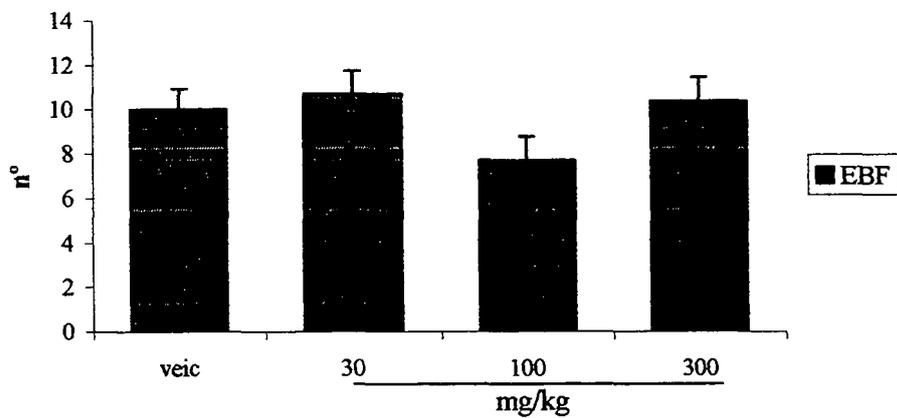
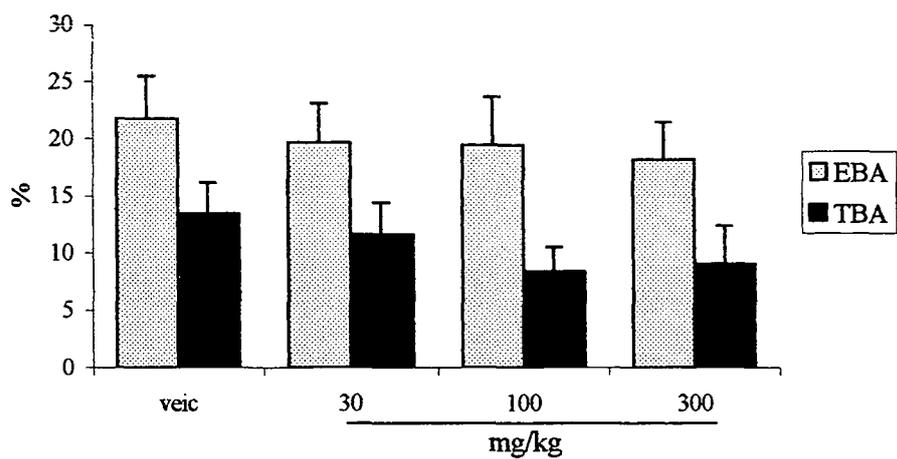
- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos

**Figura 12:** Efeitos da administração do extrato metanol-*n*-hexano (E3H) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos (n=10) avaliados no LCE.



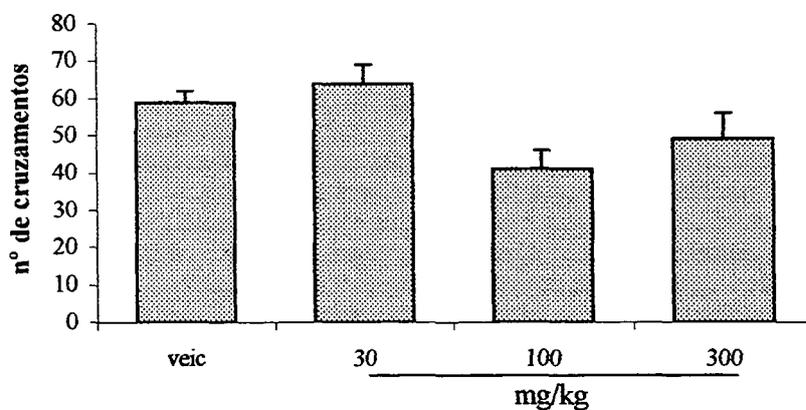
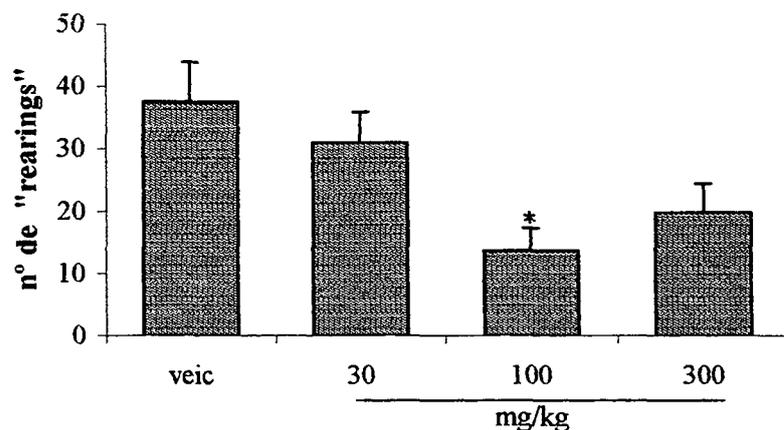
- \*p<0,05

**Figura 13:** Efeito da administração do extrato metanol-*n*-hexano (E3H) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos (n=10) avaliados no CA.



- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos

**Figura 14:** Efeitos da administração do extrato metanol-clorofórmio (E3C) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos (n=10) avaliados no LCE.



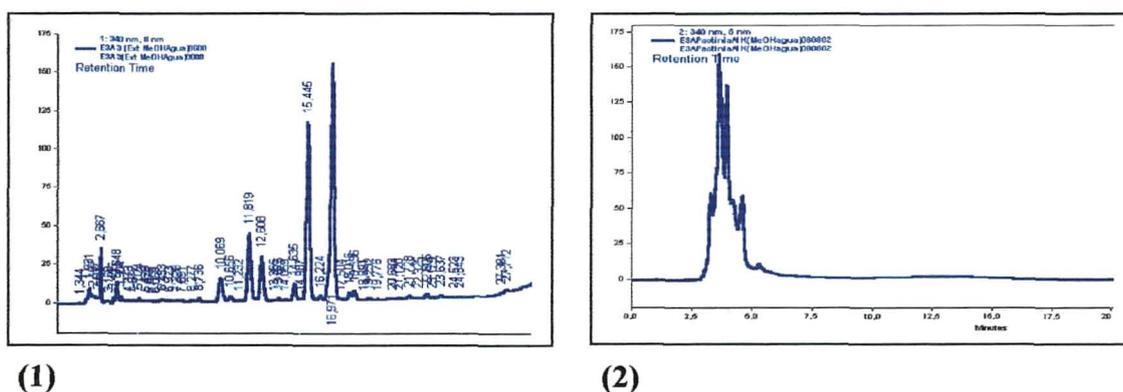
- \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$

**Figura 15:** Efeito da administração do extrato metanol-clorofórmio (E3C) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos ( $n=10$ ) avaliados no CA.

Não foram efetuadas as análises desses extratos em CLAE, por não terem sido observados a presença de alcalóides e flavonóides em CCD, reações químicas e nem sinais concretos de atividade ansiolítica e sedativa.

### 3.5.2. Análise e fracionamento do extrato metanol-água (E3A)

O extrato metanol-água, E3A, quando submetido à CLAE, nas condições anteriormente descritas, apresentou vários picos com espectros de UV característicos para flavonóides, sendo possível a identificação da substância majoritária isovitexina (16,97min, 150mAU). Conforme já havia sido observado em E3, no sistema eluente para alcalóides, nenhum pico semelhante aos padrões de alcalóides  $\beta$ -carbolínicos foram observados, entretanto, novamente foi possível observar a presença de picos com um tempo de retenção baixo na coluna cromatográfica. Os cromatogramas e os espectros UV de E3A apresentaram perfis semelhantes ao extrato metanólico E3 (Figura 16). Os resultados das análises em CCD e das reações químicas de identificação para flavonóides e alcalóides foram semelhantes aos de E3.



**Figura 16:** Perfis cromatográficos em CLAE de E3A nos sistemas eluentes para flavonóides (1) e alcalóides (2), respectivamente.

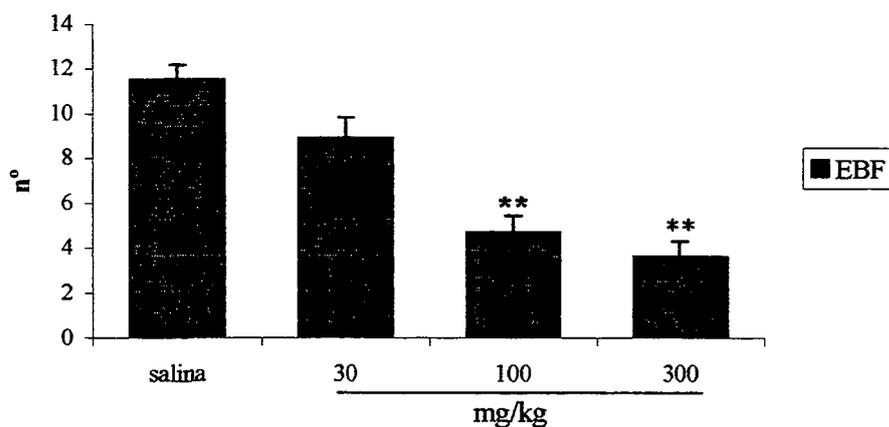
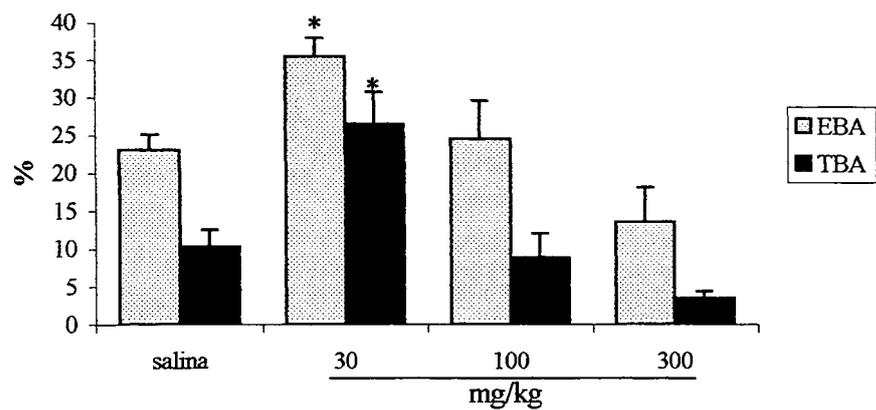
Ao ser testado farmacologicamente, a administração de E3A na dose de 30mg/kg resultou em um significativo aumento da porcentagem de entradas ( $F_{3,46}=6,7$ ;  $p<0,05$ ) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos no LCE ( $F_{3,46}=10,46$ ;  $p<0,05$ ), sem ocorrer mudanças do número de entradas nos braços fechados. Esses resultados sugerem que nessa dose, o E3A apresenta um efeito ansiolítico seletivo, livre de sedação (Figura 17). Também não foram observadas mudanças significativas, em

relação ao controle salina, no número de cruzamentos e *rearings* no teste campo aberto, reafirmando que não houve diminuição da atividade locomotora ou sedação (Figura 18).

No entanto, doses mais altas do extrato metanol-água, 100 e 300mg/kg, diminuíram significativamente o número de entradas nos braços fechados ( $F_{3,46}=20,5$ ;  $p<0,001$ ) no LCE, bem como também reduziram o número de *rearings* ( $F_{3,46}=21,4$ ;  $p<0,05$ ) no CA. Somente a dose de 300mg/kg produziu significativa diminuição do número de cruzamentos ( $F_{3,46}=21,4$ ;  $p<0,001$ ) no CA. Conforme já havia sido observado para o extrato metanólico, doses de 100 e 300mg/kg do extrato metanol-água também promoveram uma diminuição geral da atividade locomotora nos dois modelos experimentais testados, resultado que pode ser interpretado como um efeito tipo sedativo.

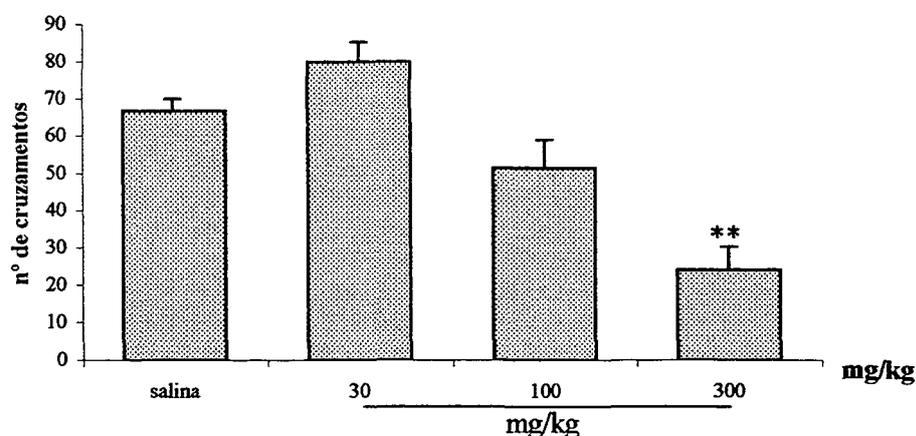
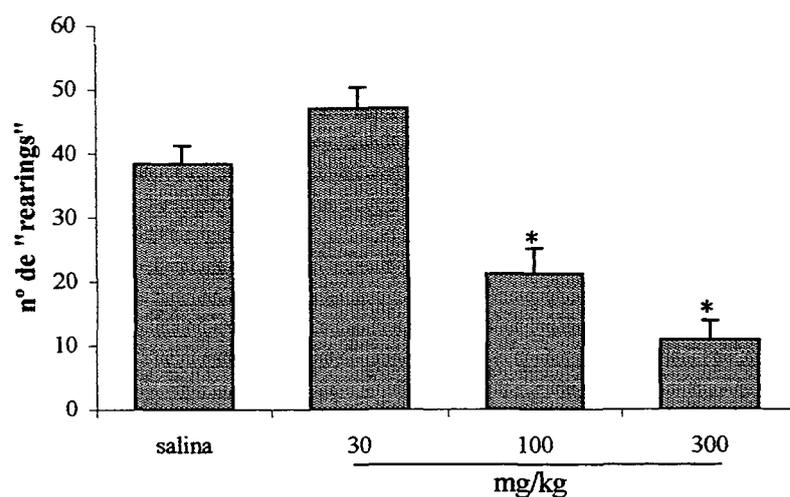
A purificação do extrato metanol (E3) para o extrato metanol-água (E3A) possibilitou um nítido aumento da atividade sedativa e a observação da atividade ansiolítica, em doses inferiores a 100mg/kg.

Um estudo realizado por Dhawan *et al.* (2001a), mostrou um efeito tipo ansiolítico com o extrato metanólico de partes aéreas de *P. incarnata* (doses de 125mg/kg, administradas pela via oral em camundongos) no teste do LCE. Essa atividade foi atribuída a presença de um grupo benzoflavona, o qual foi isolado após uma série de fracionamentos e purificações. Esse composto na dose de 10mg/kg (*p.o.*) apresentou atividade ansiolítica superior àquela produzida pelo diazepam (2mg/kg, *p.o.*). Apesar de ainda não ter sido divulgado qual o nome e a estrutura química do composto responsável pela ação ansiolítica, os autores acreditam que não se trata de nenhum outro flavonóide já citado no gênero *Passiflora*.



- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$

**Figura 17:** Efeitos da administração do extrato metanol-água (E3A) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos (n=10-12) avaliados no LCE.



- \*p<0,05 e \*\*p<0,001

**Figura 18:** Ação do extrato metanol-água (E3A) de *P. actinia* (30, 100 e 300mg/kg, *i.p.*) em camundongos (n=10) avaliados no CA.

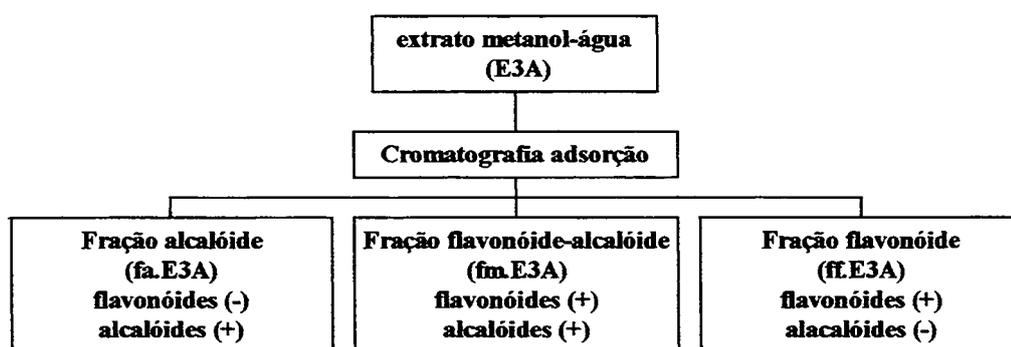
Estudos revelaram que flavonóide crisina, em baixas doses (1mg/kg) apresentaram atividade ansiolítica em camundongos avaliados nos testes do labirinto em cruz elevado (Wolfman *et al.*, 1994) e da caixa claro-escuro (Zanoli *et al.*, 2000), provavelmente devido a interação dessa substância com os receptores BZD. Esses resultados levaram os pesquisadores responsáveis pelos experimentos a sugerirem que a

crisina possa ser considerada parcialmente como responsável pela atividade ansiolítica de *P. coerulea* e de *P. incarnata*.

### 3.5.3. Pesquisa da atividade das frações derivadas do extrato metanol-água (E3A)

Com o objetivo de se obter frações brutas de alcalóides e flavonóides separadas, o extrato metanol-água foi submetido à cromatografia de adsorção em coluna, usando como fase estacionária óxido de alumínio. A partir desse procedimento, chegou-se a três frações brutas, denominadas de fa.E3A (fração “alcalóide”), fm.E3A (fração “alcalóide”-flavonóide) e ff.E3A (fração flavonóide).

As cromatografias em camada delgada e reações químicas de identificação de fa.E3A apresentaram somente sinais característicos para alcalóides, enquanto que para a fm.E3A evidenciaram-se constituintes com características para alcalóides e também para flavonóides.(Esquema 4).

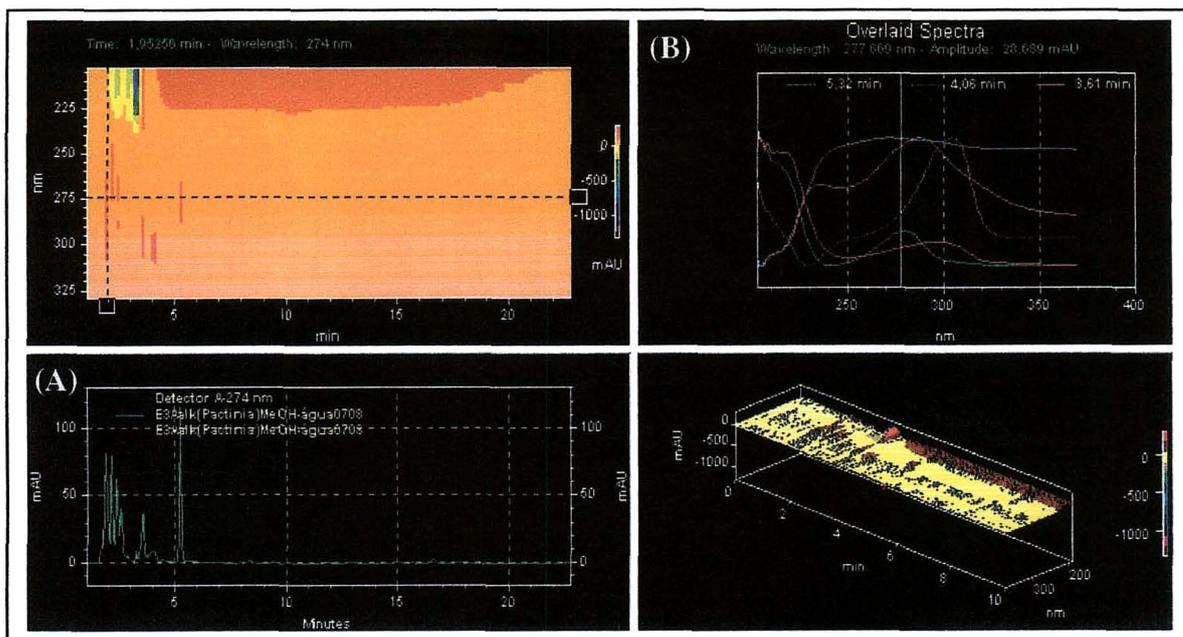


**Esquema 4:** Fracionamento em coluna de adsorção do extrato E3A de *P. actinia*

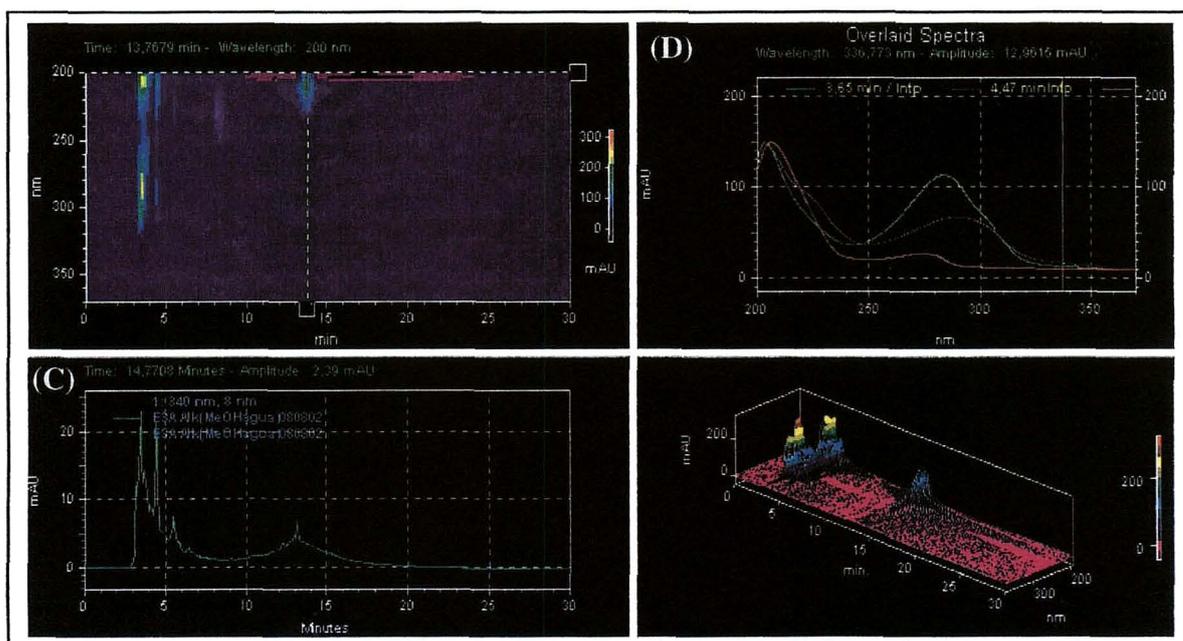
A análise em CLAE da fração “alcalóide” (fa.E3A) confirmou o resultado apresentado em CCD e reações químicas para alcalóides e flavonóides, não sendo detectada a presença expressiva de flavonóides (Figura 19). Na fase móvel para alcalóides (Figura 20), foi novamente observada a ausência compostos com espectros UV característicos para flavonóides. Entretanto foi visualizar a presença de três compostos distintos, os quais suspeitam-se que sejam alcalóides quaternários. Nenhum alcalóide  $\beta$ -carbolínico clássico foi encontrado, por meio da comparação com os padrões.

Na análise por CLAE da fração “alcalóide”-flavonóide (fm.E3A) em sistema eluente para flavonóides foi observada a presença de isovitexina com sinal próximo a 10mAU.

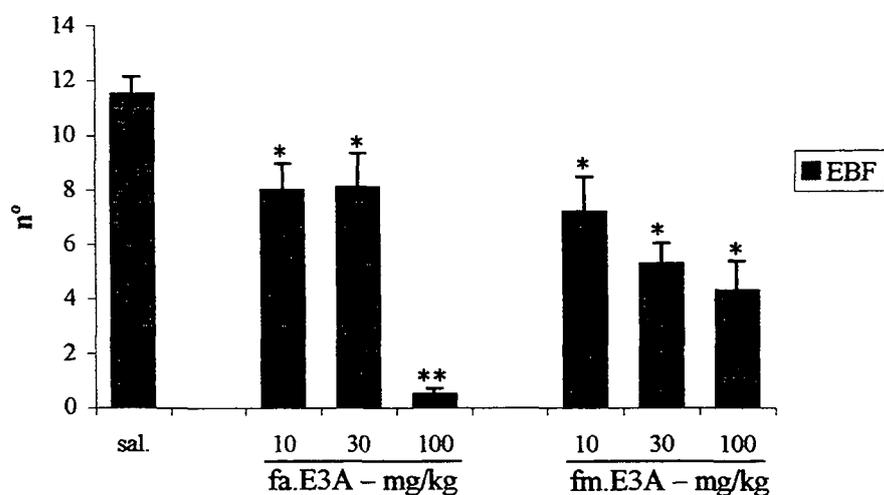
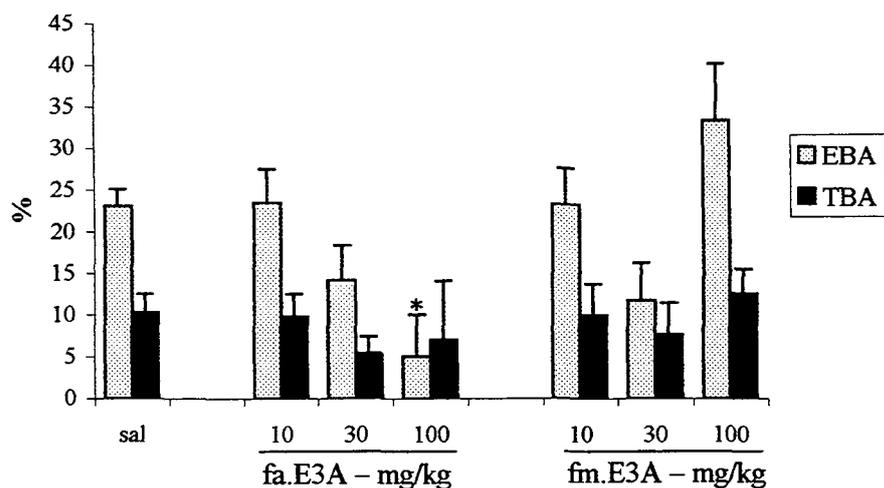
Ao serem testadas nos modelos de ansiedade e sedação, as frações “alcalóide” ( $F_{3,41}=30,5$ ) e “alcalóide”-flavonóide ( $F_{3,41}=12,1$ ) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, apresentaram uma significativa redução do número de entradas nos braços fechados. Entretanto, somente a fração alcalóide também reduziu a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{3,41}=5,24$ ,  $p<0,05$ ) no labirinto em cruz elevado, demonstrando uma redução da atividade locomotora geral dos animais (Figura 21). Esses resultados são confirmados no teste do campo aberto, onde doses de 100mg/kg da fração “alcalóide” e fração “alcalóide”-flavonóide (Figura 22) também reduziram drasticamente o número de *rearings* (fa.E3A:  $F_{3,41}=34,20$ ;  $p<0,001$  e fm.E3A:  $F_{3,41}=6,2$ ;  $p<0,001$ ) e o número de cruzamento (fa.E3A:  $F_{3,41}=15,65$ ;  $p<0,001$  e fm.E3A:  $F_{3,41}=3,6$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 19:** Perfil cromatográfico (A) e espectro UV (B) de fa.E3A no sistema eluente para flavonóide

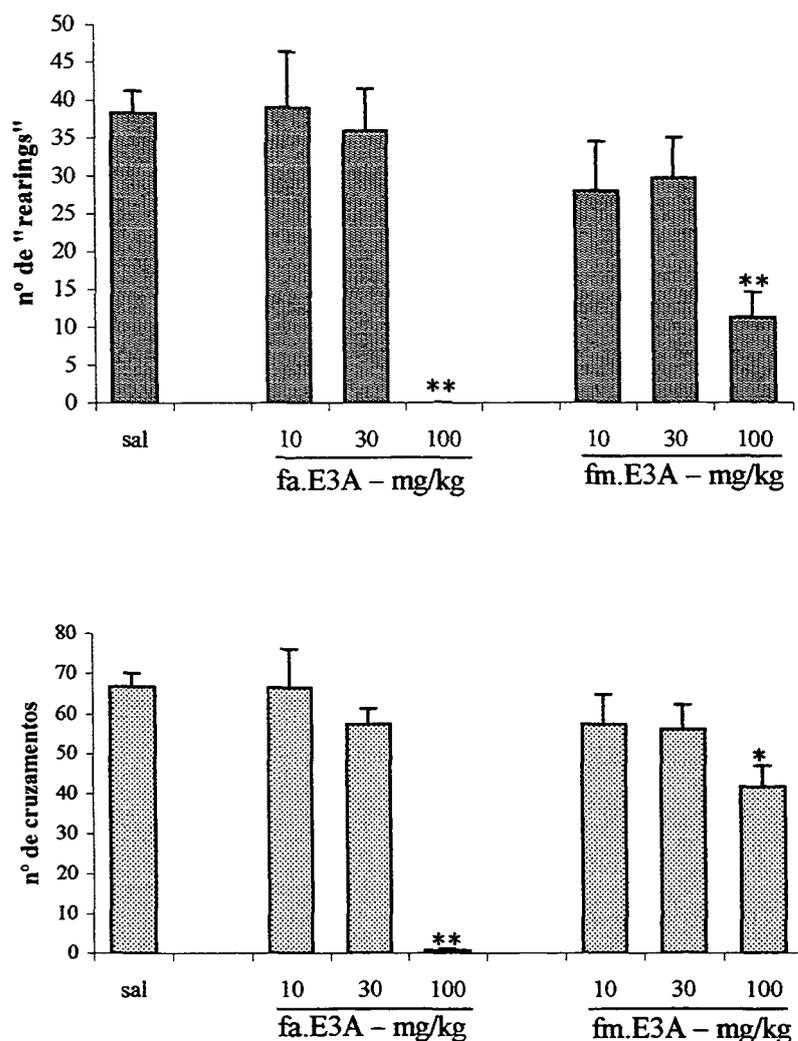


**Figura 20:** Perfil cromatográfico (C) e espectro UV (D) de fa.E3A no sistema eluente para alcalóides.



- n° EBF: porcentagem de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,001$

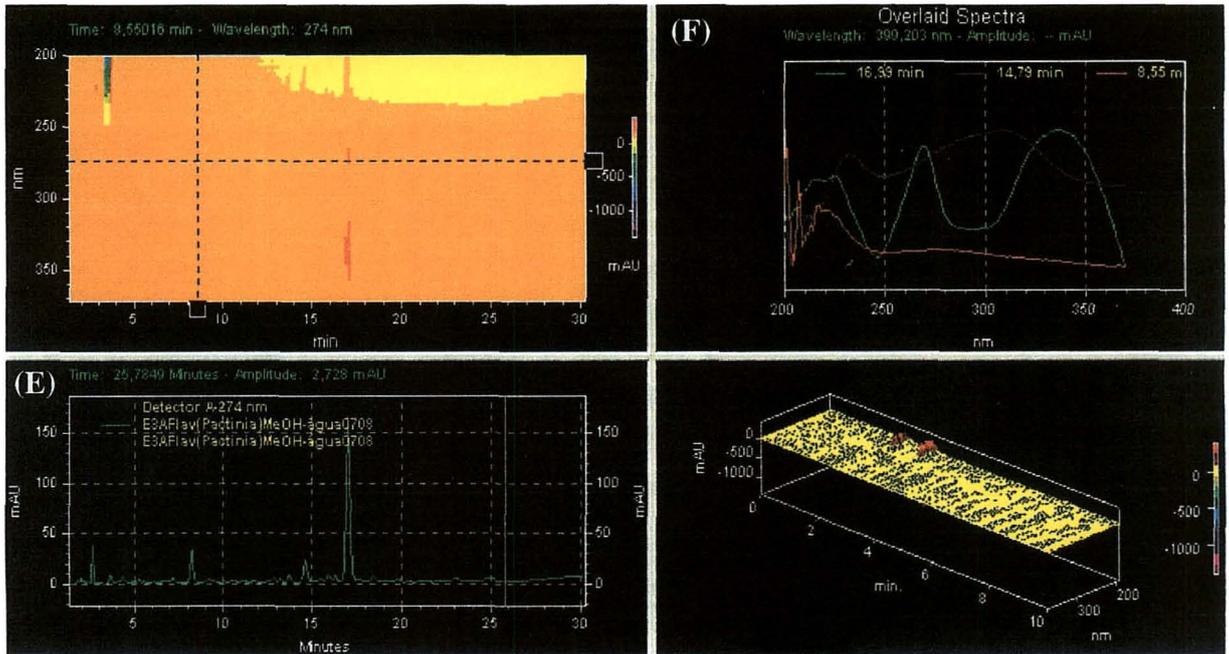
**Figura 21:** Efeito da administração *i.p.* das frações “alcalóide” (fa.E3A) e “alcalóide”-flavonóide (fm.E3A) de *P. actinia* nas doses de 10, 30 e 100mg/kg em camundongos avaliados no LCE por 5min.



**Figura 22:** Efeitos da administração *i.p.* das frações "alcalóide" (fa.E3A) e "alcalóide"-flavonóide (fm.E3A) de *P. actinia* nas doses de 10, 30 e 100mg/kg em camundongos avaliados no CA por 5min. As colunas representam as médias e as barras o E.P.M. de 10-12 animais. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$

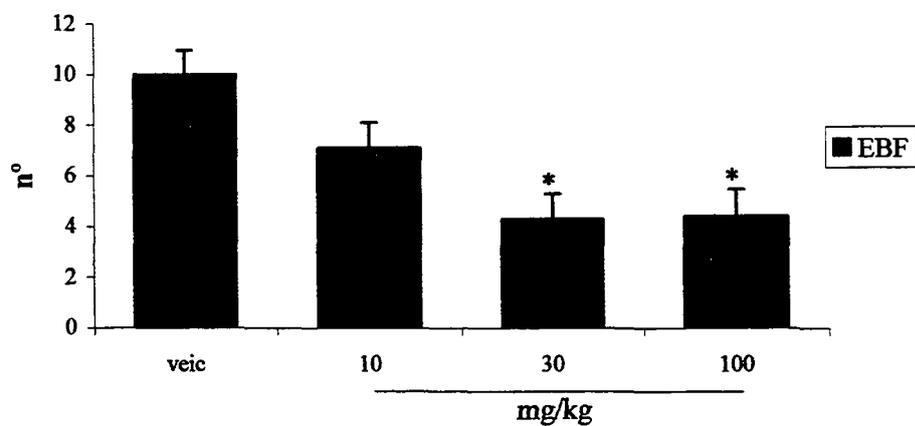
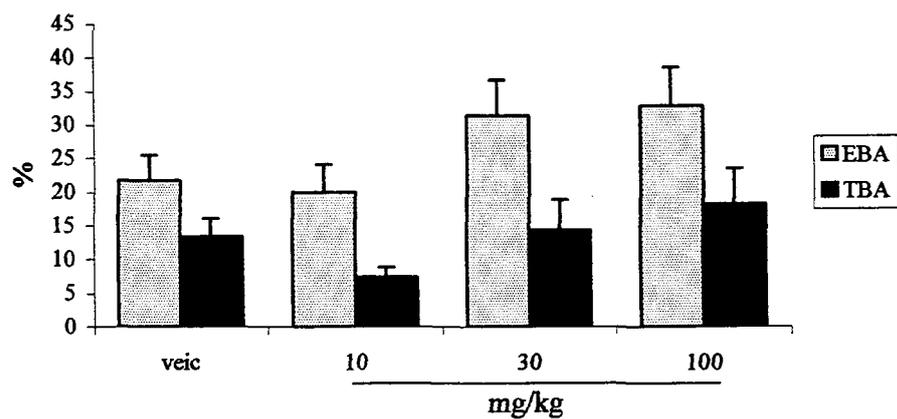
A fração flavonóide (ff.E3A), ao ser submetida a CCD, apresentou somente mancha características para flavonóides, sendo este resultado confirmado pela reação positiva para flavonóides (reação de Shinoda). Nas condições cromatográficas para compostos flavonóidicos observou-se somente um flavonóide, detectado a 16,99min (1) com sinais acima de 150mAU (Figura 23). Este flavonóide apresentou o tempo de

retenção e o espectro de UV semelhante a amostra autêntica isovitexina. A pesquisa de alcalóides por CCD e precipitação com reativos gerais para alcalóides foi negativa.



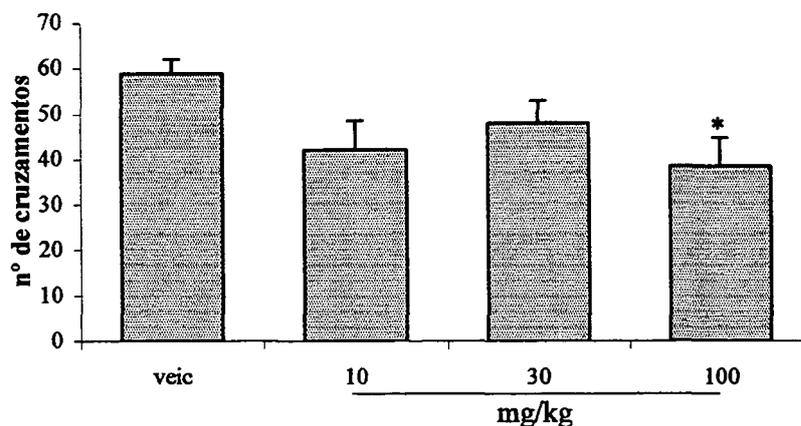
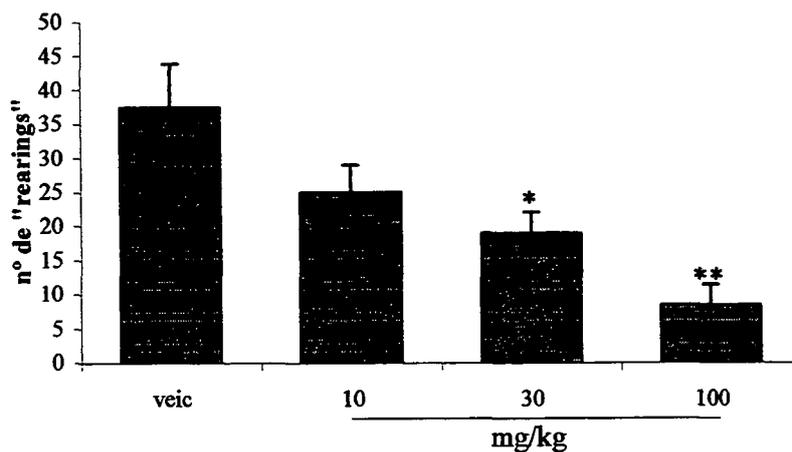
**Figura 23:** Cromatograma (E) e espectro UV (F) da fração flavonóide- ff.E3A obtidos no sistema eluente para flavonóides.

Os resultados farmacológicos no LCE obtidos para a fração flavonóide - ff.E3A (Figura 24) mostram uma significativa diminuição no número de entradas nos braços fechados nas doses de 30 e 100mg/kg ( $F_{3,39}=7,1$ ,  $p<0,05$ ), sendo que essas doses também reduziram o número de *rearings* (30 e 100mg/kg:  $F_{3,39}=7,67$ ;  $p<0,05$ ) e cruzamentos (100mg/kg:  $F_{3,39}=2,85$ ;  $p<0,05$ ) no CA, indicando um efeito de diminuição da atividade locomotora por sedação (Figura 25).



- n°EBF: número de entradas nos braços fechados
- %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos
- %EBA: porcentagem de entradas nos braços abertos
- \*p<0,05, \*\*p<0,001

**Figura 24:** Efeito da administração *i.p.* da fração flavonóide- ff.E3A de *P. actinia* (10, 30 e 100mg/kg) em camundongos avaliados no LCE por 5min.



**Figura 25:** Efeito da administração *i.p.* da fração flavonóide – ff.E3A de *P. actinia* (10, 30 e 100mg/kg) em camundongos avaliados no CA por 5min. \* $p < 0,05$

Como já foi citado anteriormente, a fração flavonóide apresentou quantidades consideráveis do flavonóide isovitexina, o qual pode vir a ser o responsável pela atividade observada.

Entretanto, em 1988, Speroni *et al.* observaram que as administrações de vitexina e isovitexina puras (5 e 10mg/kg, *i.p.*) não produziam atividade sobre o SNC de camundongos. Soulimani *et al.* (1997), na tentativa de encontrar o constituinte responsável pelas atividades sobre o SNC da *P. incarnata*, testaram misturas de flavonóides (vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina) com maltol nas concentrações normalmente encontradas nas partes aéreas secas desta espécie no teste

*staircase* e não observaram nenhuma alteração da atividade locomotora. A partir deste fato, sugeriram que nenhum desses compostos poderia ser isoladamente o princípio responsável pela atividade psicotrópica obtida

Ao analisar os resultados obtidos com as frações testadas (fa.E3A, fm.E3A e ff.E3A), é possível sugerir a existência de mais de um grupo de compostos com atividade na espécie estudada, ou seja, os flavonóides, os possíveis “alcalóides quaternários”, ou talvez até outra(s) substância(s) não identificada(s) pode(m) ser o(s) responsável(is) pela ação sobre o SNC de *P. actinia*.

A expressiva atividade sedativa da fração alcalóide sugere que o grupo compostos que acreditam-se que sejam “alcalóides quaternários”, possuem atividade significativa na redução da atividade locomotora dos animais testados, visto que esta fração não apresenta flavonóides e, portanto, estes não podem ser considerados os responsáveis pela ação observada.

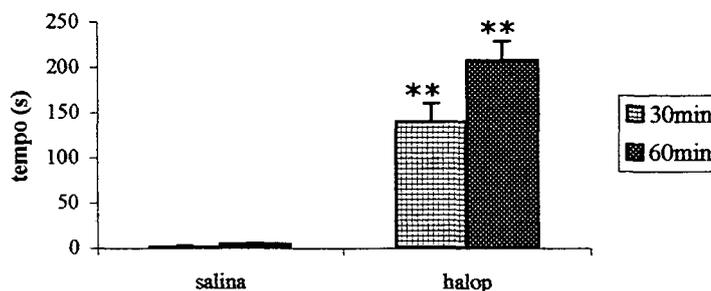
### **3.6 Medida da catalepsia**

A catalepsia é definida como um estado de inatividade onde animais de laboratório mantêm posturas incomuns e desconfortáveis, impostas pelo pesquisador, por um período de tempo prolongado. A medida da catalepsia tem sido um parâmetro largamente utilizado para avaliar efeitos motores de drogas, particularmente aqueles efeitos relacionados com o sistema extrapiramidal (Sanberg *et al.*, 1988).

Durante a realização dos testes do LCE e CA, com fração alcalóide, foi observado que os camundongos apresentavam, além da redução da atividade locomotora, reações distônicas como tremores e elevação da cauda em “S”. Por esses sintomas geralmente serem comum em camundongos tratados com medicamentos neurolépticos, como o haloperidol, foi realizado um teste de catalepsia, onde se

verificou que os animais permaneciam imobilizados em posição não habitual durante grande parte do tempo. A partir desse resultado, iniciou-se uma bateria de teste de catalepsia com o objetivo de analisar a capacidade de indução da catalepsia dos extratos e frações de *P. actinia*, que anteriormente haviam apresentado atividade depressora do SNC.

Com a finalidade de padronizar o experimento em questão, inicialmente o aparato foi testado com a droga controle positivo haloperidol (1mg/kg). O efeito cataléptico foi observado (Figura 26) nos tempos de 30min (\*\*p<0,001) e 60min (\*\*p<0,001).

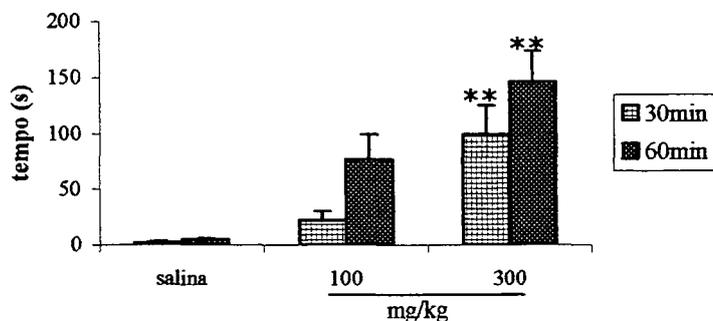


**Figura 26:** Atividade cataléptica do haloperidol (1mg/kg) comparado com o controle salina (n=10; \*\*p<0,001).

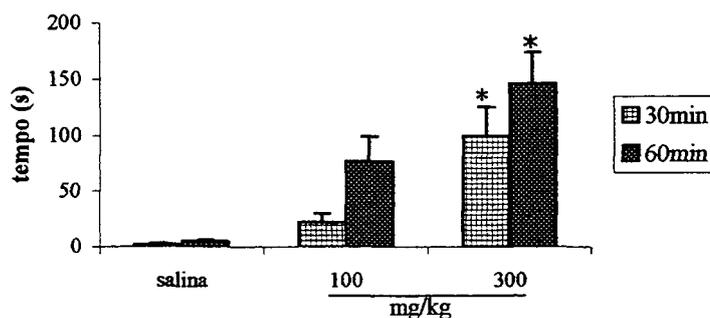
Um aumento significativo no tempo de imobilidade foi observado com 300mg/kg do extrato hidroalcoólico (Figura 27) em 30min ( $F_{2,29}=9,67$ ;  $p<0,001$ ) e 60min ( $F_{2,29}=10,59$ ;  $p<0,001$ ), 300mg/kg do extrato metanólico (Figura 28) em 30min ( $F_{2,25}=3,91$ ;  $p<0,05$ ) e 60min ( $F_{2,25}=6,73$ ;  $p<0,05$ ) e o extrato metanol-água (Figura 29) nas doses de 100mg/kg (60min -  $F_{2,28}=4,47$ ;  $p<0,05$ ) e 300mg/kg (30min -  $F_{2,28}=7,26$ ;  $p<0,05$  e 60min -  $F_{2,28}=4,47$ ;  $p<0,05$ ).

Conforme pode ser observado nas figuras 30, 31, 32 as frações derivadas do extrato metanol-água, também produziram significativo aumento do tempo de imobilização: fração “alcalóide” nas doses de 100mg/kg (30min -  $F_{2,25}=5,2$ ;  $p<0,05$ ) e

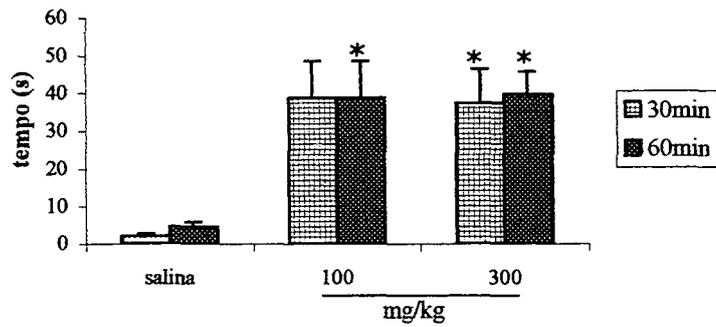
300mg/kg (30min -  $F_{2,25}=5,2$ ;  $p<0,05$  e 60min -  $F_{2,25}=5,89$ ;  $p<0,05$ ), 300mg/kg da fração flavonóide (30min-  $F_{2,23}=16,42$ ;  $p<0,001$  e 60min -  $F_{2,23}=5,02$ ;  $p<0,05$ ) e 300mg/kg da fração “alcalóide”-flavonóide (30min -  $F_{2,25}=9,78$ ;  $p<0,001$  e 60min -  $F_{2,25}=9,31$ ;  $p<0,001$ ).



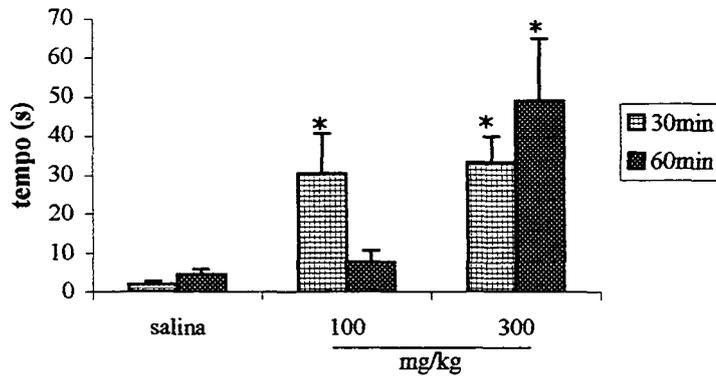
**Figura 27:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* de extrato hidroalcoólico de *P. actinia* (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=10; \*\*\* $p<0,001$ ).



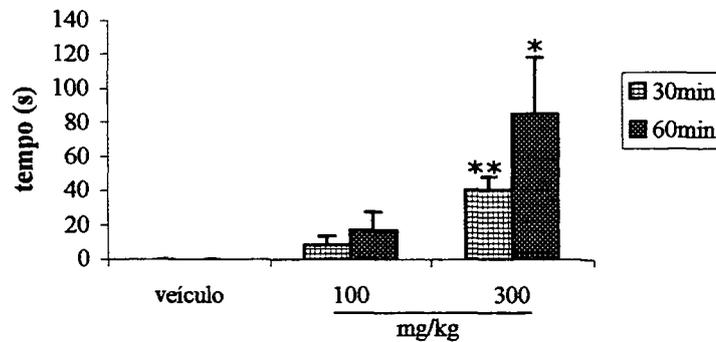
**Figura 28:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* de extrato metanólico de *P. actinia* (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=8-9; \* $p<0,05$ ).



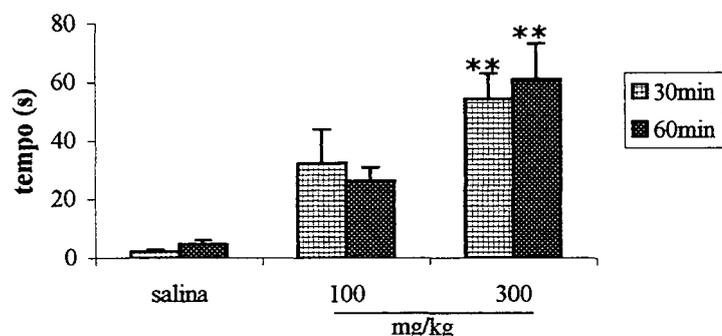
**Figura 29:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* de extrato metanol-água de *P. actinia* (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min (n=9-10; \*p<0,05).



**Figura 30:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* da fração "alcalóide" (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=8-9; \*p<0.05).



**Figura 31:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* da fração flavonóide (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=8; \*p<0.05; \*\*p<0,001).



**Figura 32:** Medida da catalepsia em camundongos após a administração *i.p.* da fração “alcalóide”-flavonóide (100 e 300mg/kg) ou salina nos tempos de 30 e 60min. (n=8-9; \*\*p<0.001).

Indução da catalepsia, efeito semelhante ao que observamos neste experimento, foi relatada por Vale *et al.* (1983) ao avaliarem os efeitos sobre o SNC do extrato *Passiflora edulis f. flavicarpa* Deneger (20 e 40mg/kg, *i.p.*). Além disso, esses autores realizaram outros experimentos também sensíveis para a caracterização de efeitos de drogas neurolépticas, como a medida da temperatura reto-sigmoideana e a interação com as ações farmacológicas da anfetamina. Embora nestes últimos testes o perfil de ação farmacológica correspondeu a ação neuroléptica, os resultados não foram conclusivos, uma vez que resultados negativos foram obtidos com o modelo experimental da esQUIVA ativa de duas vias.

Evidências experimentais indicam que a catalepsia em animais ou a catatonia em pacientes psiquiátricos pode ser o resultado de uma interação insuficiente entre a dopamina e seus receptores nos gânglios basais (Sanberg *et al.*, 1988). Drogas que bloqueiam esta interação, como o haloperidol, são capazes de produzir esses efeitos. No entanto, diversos neurotransmissores como, por exemplo, a serotonina e a acetilcolina, podem estar envolvidos na geração e na modulação destes efeitos.

## 4. CONCLUSÕES

---

- O perfil cromatográfico dos compostos flavonoídicos em CLAE, do extrato metanólico desclorofilado de *P. actinia*, apresentou maior semelhança com o perfil do extrato de *P. incarnata* do que com o extrato de *P. alata*.
- O extrato hidroalcoólico de *P. actinia* (100 e 300mg/kg) apresentou atividade sedativa em camundongos avaliados nos modelos experimentais labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA). Esse mesmo extrato não apresentou sinais de toxicidade aguda em doses inferiores a 1800mg/kg.
- O extrato metanólico de *P. actinia* submetido à CLAE, apresentou picos característicos para flavonóides, sendo possível a identificação de isovitexina por meio de co-injeção com o padrão. Foi observada a ausência de vitexina, orientina, rutina e swertisina. No sistema eluente para alcalóides, verificou-se a ausência dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos, entretanto as análises por CCD e reações químicas de identificação apresentaram resultados característicos para alcalóides, possivelmente devido à presença de alcalóides quaternários. Esse extrato apresentou atividade sedativa nas doses de 300 e 600mg/kg, nos modelos anteriormente citados.
- Os sub-extratos metanol-*n*-hexano e metanol-clorofórmio mostraram-se inativos nos testes farmacológicos realizados, bem como foram negativos nos ensaios para alcalóides e flavonóides por meio de CCD e reações químicas
- O sub-extrato metanol-água apresentou atividade ansiolítica livre de sedação apenas na dose de 30mg/kg. Doses maiores apresentaram atividade sedativa.

A análise química desse, permitiu evidenciar expressiva semelhança com o extrato metanólico.

- As frações flavonóide (ff.E3A), “alcaloide” (fa.E3A) e flavonoide-“alcaloide” (fm.E3A), apresentaram atividade sedativa em doses de 30 e 100m/kg, no LCE e CA. As análises químicas permitiram verificar a ausência de flavonóides e a presença de compostos com alta polaridade, os quais possivelmente sejam alcalóides quaternários em fa.E3A; a presença de isovitexina e compostos provavelmente alcaloídicos em fm.E3A e a presença de isovitexina em ff.E3A.
- A atividade sedativa observada em fa.E3A não pode ser atribuída a presença de flavonóides.
- Todos os extratos e frações de *P. actinia*, com atividade psicofarmacológica nos modelos experimentais testados para ansiedade e sedação, também induziram catalepsia em animais.
- Os resultados obtidos com o presente trabalho, não são suficientes para que se possa assegurar a substituição de *P. incarnata* por *P. actinia*, sendo necessária a execução de outros ensaios farmacológicos e toxicológicos.
- Experimentos futuros deverão ser realizados a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação dos extratos/frações de *P. actinia* e de identificar as substâncias responsáveis por essa ação, bem como avaliar a atividade farmacológica dessa espécie em outros modelos experimentais.

## 5. REFERÊNCIAS

---

Akhondzadeh, S., Naghavi, H.R., Vazirian, M., Shayeganpour, A., Rashidi, H. & Khani, M. (2001). Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **J Clin Pharm Ther.**, 26, 363-7.

Alonso, J.R. (1998). **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS.

ANVISA (2000). Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Aoyagi, N., Kimura, R. & Murata, T. (1974). Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 22, 1008-13.

Avallone, R., Zanolli, P., Puia, G., Kleinschnitz, M., Schreier, P. & Baraldi, M. (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemical Pharmacology**, 59, 1387-1394.

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

Bennati, E. (1971). Quantitative determination of harmine and harmaline in the extract of *Passiflora incarnata*. **Boll Chim Farm**, 110, 664-9.

Bennati, E. & Fedeli, E. (1968). Gas chromatography of fluid extract of *Passiflora incarnata*. **Boll Chim Farm**, 107, 716-20.

Borrelli, E., Pinto, L., Izzo, A.A., Mascolo, N., Capasso, F., Mercati, V., Toja, E. & Autore, G. (1996). Anti-inflammatory Activity of *Passiflora incarnata* L. in Rats. **Phytoterapy Research**, 10, S104-6.

Carlo, G.D., Mascolo, N., Izzo, A.A. & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs (Minireview). **Life Sciences**, 65, 337-53.

Cervi, A.C. (1981). **Revisão do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) do estado do Paraná - Brasil**. Barcelona, Tese (Doutorado em Botânica). In Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

Coleta, M., Campos, M.G., Cotrim, M.D. & Cunha, A.P.d. (2001). 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, S20-1.

Cordell, G.A. (1981). **Introduction to alkaloids: A Biogenetic Approach**. New York: Wiley-Interscience publication.

Cronquist, A. (1988). Outline of classification of Magnoliophyta. In **The evolution and classification of flowering plants**.p. 505-513. New York: The New York Botanical Garden.

Da-Silva, R.A.D. (1926). **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional.

De-Paris, F., Petry, R.D., Reginatto, F.H., Gosmann, G., Quevedo, J., Salgueiro, J.B., Kapczinski, F., Ortega, G.G. & Schenkel, E.P. (2002). Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 21, 5-8.

Dewick, P.M. (1997). **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. Chichester: John Wiley & Sons.

Dhawan, K., Kumar, S. & Sharma, A. (2001a). Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacol**, 78, 165-70.

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

Dhawan, K., Kumar, S. & Sharma, A. (2002a). Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* in mice. **Phytotherapy Research**, in press.

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

Dhawan, K. & Sharma, A. (2002b). Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**, 73, 397-9.

Dhawan, K. & Sharma, A. (2002c). Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreases libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* inneaus in healthy male rats. **Life Sciences**, 71, 3059-3069.

Farmacopéia, C.d.R.d. (1977). **Farmacopéia Brasileira** (Farm. Bras. III). São Paulo: Organização Andrei.

Farmacopéia, C.d.R.d. (1959). **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil** (F. Bras. II). São Paulo: Siqueira.

Fellows, E.J. & Smith, C.S. (1938). The Chemistry of *Passiflora incarnata*. **Journal American Pharmaceutical Association**, 27, 574-6.

Franchi, S.M. (2000). **Contribuição ao estudo farmacognóstico da folha de *Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae**. Curitiba, Dissertação (Mestrado em Botânica)In Curso de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná.

Freitas, P.C.D. (1985). **Estudo Farmacognóstico comparativo de Espécies Brasileiras do Gênero *Passiflora* L.** São Paulo, Dissertação (Mestrado em Farmácia) In Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Geiger, H. & Markhan, K.R. (1986). The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift-fur-Naturforschung Section C**, 41, 949-50.

Graeff, F.G. (1993). Ansiedade. In **Neurobiologia das Doenças Mentais**. eds Graeff, F.G. & Brandão, M.L. pp. 109-44. São Paulo: Lemos.

Graeff, F.G. (1999). Medicamentos Ansiolíticos. In **Fundamentos de Psicofarmacologia**. eds Graeff, F.G. & Guimarães, F.S. pp. 69-92. São Paulo: Editora Atheneu.

Guimarães, F.S. (1999). Medicamentos hipnóticos. In **Fundamentos de Psicofarmacologia**. eds Graeff, F.G. & Guimarães, F.S. pp. 161-174. São Paulo: Editora Atheneu.

Handley, S.L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptors agonists and antagonists in a maze-exploration of fear-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.**, 324, 1-5.

Hoehne, F.C. (1939). **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais: coletânea de 114 aulas primeiramente publicadas no "O Estado de São Paulo" de 1934-38.** São Paulo: Departamento de Botânica do Estado.

Joly, A.B. (1998). **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. pp. 478-480. São Paulo: Nacional.

Kimura, R., Matsui, S., Ito, S., Aimoto, T. & Murata, T. (1980). Central depressant effects of maltol analogs in mice. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 28, 2570-9.

Kurtz, S.M.T.F. (2001). **Maracujá: Farmacognose das folhas de *Passiflora actinia* Hooker e estudo preliminar de formulação para incorporar a tintura de *Passiflora alata* Dryander, Passifloraceae.** Curitiba (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) In *Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas*, Universidade Federal do Paraná.

Li, Q.M., Heuvel, H.v.d., Delorenzo, O., Corthout, J., Pieters, L.A., Vlietinck, A.J. & Claeys, M. (1991). Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **J Chromatogr**, 562, 435-46.

Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, 92, 180-5.

Loggia, R.D., Tubaro, A. & Redaelli, C. (1981). Evaluation of the activity on the mouse CNS of several plant extracts and a combination of them. **Riv Neurol**, 51, 297-310.

Lutomski, J. (1960). Isolation of the major alkaloids from *Passiflora incarnata*. **Biul. Inst. Roslin Lecznicych**, 6, 209-219.

- Lutomski, J. (1959). Qualitative and quantitative chromatographic investigation of alkaloids of *Passiflora incarnata*. **Biul. Inst. Roslin Lecznicych**, 5, 181-198.
- Lutomski, J. (1967). Simple alkaloids. I. Thin-layer chromatography of harman alkaloids occurring in plant material and in preparations. **Herba Pol.**, 13, 44-52.
- Lutomski, J., Adamska, M. & Jaruzelski, M. (1968). Simple carboline alkaloids. V. Comparative analysis of the basic components of *Passiflora incarnata* grown in greenhouses and open fields. **Herba Pol.**, 14, 139-147.
- Lutomski, J. & Malek, B. (1975). Pharmacochemical investigations on raw materials genus *passiflora*. 3. Phytochemical investigations on raw materials of *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* (author's transl). **Planta Medica**, 27, 222-5.
- Lutomski, J. & Wrocinski, T. (1960). Pharmacodynamic properties of *P. incarnata* preparations. The effect of alkaloid and flavonoid components on pharmacodynamic properties of the raw materials. **Biul. Inst. Roslin Lecznicych**, 6, 176-184.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. & Thomas, M.B. (1970). **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag.
- McCormick, S. & Mabry, T.J. (1982). The Flavonoids of *Passiflora sexflora*. **Journal of Natural Products**, 45, 782.
- Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative Neurology**, 48, 254-260.
- Moraes, M.L.L. (1995). **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** São Carlos (Mestrado em Química) In: Instituto de Química de São Carlos.: Universidade Federal de São Carlos.
- Neu, R. (1954). Inhaltsstoffe de *Passiflora incarnata*. 1. Mitteilung: Die in Alkalien unlöslichen Anteile Lipoidextrakte. **Arzneimittel-Forschung**, 4, 292-294.
- Neu, R. (1956). Inhaltsstoffe de *Passiflora incarnata*. 3. Mitteilung: 3-Methyl-4-Carbolin das alkaloid der Passifloren. **Arzneimittel-Forschung**, 6, 94-98.
- Nodari, R.O. & Guerra, M.P. (2000). Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. eds Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. p.11-24. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC-Editora da Universidade/UFRGS.
- Office, H.M.s.S. (1993). **British Pharmacopoeia**. London.
- Oga, S., Freitas, P.C.d., Silva, A.C.G.d. & Hanada, S. (1984). Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, 50, 303-6.
- Pellow, S. & File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, 24, 525-9.

- Pepplinkhuizen, L., Fekkes, D. & Timmerman, L. (1996). Norharman and anxiety disorders. *Acta Neuropsychiatrica*, 8, 93-95.
- Pereira, C.A.M. & Vilegas, J.H.Y. (2000). Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 3, 1-12.
- Petry, R.D., Reginatto, F., de-Paris, F., Gosmann, G., Salgueiro, J.B., Quevedo, J., Kapczinski, F., Ortega, G.G. & Schenkel, E.P. (2001). Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytotherapy Research*, 15, 162-4.
- Petry, R.D., Souza, K.C.B.d., Bassani, V.L., Petrovick, P.R. & Ortega, G.G. (1998). Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). *Revista Brasileira de Farmácia*, 79, 7-10.
- Proliac, A. & Raynaud, J. (1988). *O*-glucosyl-2"-*C*-glucosyl-6-apigénine de *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae). *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 63, 174-5.
- Rahman, K., Krenn, L., Koop, B., Schubert-Zsilavec, M., Mayer, K.K. & Kubelka, W. (1997). Isoscoparin-2"-*O*-glucoside from *Passiflora incarnata*. *Phytochemistry*, 45, 1093-4.
- Reginatto, F., Kauffman, C., Schripsema, J., Guillaume, D., Gosmann, G. & Schenkel, E.P. (2001). Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal Brazilian Chemical Society*, 12, 32-36.
- Reginatto, F.R. (2000). **Saponinas em *Passiflora alata* Dryander**. Porto Alegre, Tese (Doutorado em Farmácia) In *Faculdade de Farmácia*: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Rehwald, A., Meier, B. & Sticher, O. (1994). Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 69, 153-158.
- Rehwald, A., Sticher, O. & Meier, B. (1995). Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed high-performance liquid-chromatography. *Phytochemical Analysis*, 6, 96-100.
- Rommelspacher, H., Nanz, C., Borbe, H.O., Fehske, K.J., Muller, W.E. & Wollert, U. (1980). 1-Methyl-beta-carboline (harmane), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 314, 97-100.
- Ruggy, G.H. & Smith, C.S. (1940). A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. *Journal American Pharmaceutical Association*, 29, 245-9.
- Salgueiro, J.B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M.B.C., Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997). Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine

receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 58, 887-891.

Sanberg, P.R., Bunsey, M.D., Giordano, M. & Norman, A.B. (1988). The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, 102, 748-759.

Sanberg, P.R., Pevsner, J. & Coyle, J.T. (1984). Parametric influences on catalepsy. **Psychopharmacology**, 82, 106-8.

Sanberg, P.R., Pisa, M., Faulks, I.J. & Fibiger, H.C. (1980). Experimental influences on catalepsy. **Psychopharmacology**, 69, 225-6.

Schripsema, J., Dagnino, D. & Gosmann, G. (2000). Alcalóides Indólicos. In **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. eds Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. pp. 679-703. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC-Editora da Universidade/UFRGS.

Shi, C.C., Chen, S.Y., Wang, G.J., Liao, J.F. & Chen, C.F. (2000). Vasorelaxant effect of harman. **European Journal of Pharmacology**, 390, 319-325.

Simões, C.M.O. & Schenkel, E.P. (2002). 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, 27-32.

Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Bousta, D., Misslin, R. & Mortier, F. (1997). Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, 57, 11-20.

Souza, J.S.I. & Meletti, L.M.M. (1997). **Maracujá: espécies, variedades e cultivo**. 179 p. Piracicaba: FEALQ.

Souza, K.C.B. (1997). **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa***. Porto Alegre, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas): Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Speroni, E. & Minghetti, A. (1988). Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, 54, 488-91.

Suisse, C.F. (1995). **Pharmacopoea Helvetica**. p. 1.1.1990. Berne: Departament Fédéral de l'Intérieur, Switzerland.

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

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

Wagner, H. & Bladt, S. (1996). **Plant drug analysis**. Germany: Springer.

Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. & Medina, J.H. (1994). Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. **Pharmacol Biochem Behav**, 47, 1-4.

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

Zarindast, M.R. (1993). Influences of different adenosine receptor subtypes on catalepsy in mice. **Psychopharmacology**, 113, 257-261.

Zuanazzi, J.A.S. (2000). Flavonóides. In **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. eds Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. p. 489-515. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC-Editora da Universidade/UFRGS.