



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN NA OTIMIZAÇÃO DE
MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FLAVONOÍDES USANDO EXTRAÇÃO
ACELERADA COM SOLVENTES (ASE) E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES
QUÍMICOS POR CLAE-DAD-UV EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*.**

SILVANA VIEIRA FLORESTA GOMES

SALVADOR - BA

2013

SILVANA VIEIRA FLORESTA GOMES

**APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN NA OTIMIZAÇÃO DE
MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES USANDO EXTRAÇÃO
ACELERADA COM SOLVENTES (ASE) E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES
QUÍMICOS POR CLAE-DAD-UV EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*.**

Tese submetida ao Colegiado de Pós-graduação em Química como requisito parcial para o título de Doutor em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David

SALVADOR - BA

2013

Gomes, Silvana Vieira Floresta.

Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. / Silvana Vieira Floresta Gomes. - 2013.

161 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Maurício David.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Produtos naturais. 2. Flavonoides. 3. *Passiflora*. 4. Extração (Química). 5. Antioxidantes. 6. Box-Behnken. I. David, Jorge Maurício. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 583.456

CDU - 547.9

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, ao meu esposo, Anderson, aos meus pais, Salomão e Aurora e a Tia Rita.

*“Agrada-te do Senhor, e Ele
satisfará os desejos do teu
coração. Entrega o teu caminho ao
Senhor, confia nEle, e Ele tudo
fará”. Salmos 37:4 e 5*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao Deus criador pelas bênçãos, proteção, força e determinação para concluir este trabalho.

Ao meu esposo, Anderson, meu amor, companheiro e amigo que nunca deixou de me apoiar e me dar força quando muitas vezes tive vontade de desistir, foi compreensivo, amoroso, atencioso, paciente e meu incentivador. Esse trabalho também é seu!

Aos meus pais, Salomão e Aurora, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida, dando amor e carinho.

À Tia Rita pelo amparo, amor, cuidado, carinho e atenção, fazendo de tudo para minimizar o meu cansaço, estresse e crises. Demonstrou um verdadeiro amor de mãe.

Agradeço a minhas irmãs, Fernanda, Luciana e Cremilda, pelo apoio, ajuda e atenção.

As minhas inesquecíveis amigas Dayse e Ingrid que me mostraram o quanto é importante a amizade. Muito obrigada pela ajuda, pelas horas até tarde no laboratório, pelas risadas e conversas animadoras.

Aos Professores do Departamento de Farmácia (UFS/Lagarto), que tive o privilégio de conhecer, Di Pietro, Adriana, Rodrigo, James, Daniele, Natália e Cristiani, pela amizade, apoio e carinho.

Aos meus queridos amigos, Juliana, Rogério, Patrícia, Rosmam, Bráulio, Kelly, Vinícius, Midiam, Jeandson, Elaine, Luigi, Ana Karina, Carla e Sérgio pelo apoio, força e ânimo que me deram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Jorge Maurício David, pela oportunidade, apoio e auxílio nos momentos difíceis, um exemplo para mim de professor, orientador e pesquisador.

À Onildo, Éder e Taliane da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo auxílio e contribuição para que este trabalho fosse realizado, disponibilizando as espécies de *Passiflora*.

Aos meus colegas Jean e Rogério pela ajuda e orientação em momentos tão importantes do trabalho.

À Lindomar, cujo auxílio e ajuda foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros de jornada do GPPN: Larissa, Mariluze, Eliézer, Bruno, Clayton, Ramine, Darlan, Hugo, Fábio, Raul, Vanessa, Jéferson, Manuela, Patrícia e José Cândido.

Aos professor Sérgio L. C. Ferreira pelo apoio científico.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Bahia e aos professores do Colegiado de Pós-graduação, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho descreve a aplicação de planejamento Box-Behnken para otimização de método de extração de flavonoides, usando extração acelerada com solventes (ASE), e o desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE com detecção por arranjo de diodos (DAD), para a quantificação dos principais marcadores químicos nas folhas de *Passiflora alata*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. malacophylla*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* e *P. vitifolia*, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. A otimização do método de extração no extrator acelerado com solventes (ASE) foi realizada através de um planejamento Box-Behnken de três fatores, proporção da solução hidroetanólica (%), temperatura e nº de ciclos e três níveis experimentais (+1, 0, -1), com o objetivo de se obter as melhores condições para a determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais e rendimento (%), avaliando simultaneamente as respostas processadas. As condições otimizadas foram a proporção hidroetanólica 64% (v/v), 80 °C e 5 ciclos de extração. Um método analítico de perfil cromatográfico foi desenvolvido e validado, utilizando CLAE-DAD, para a análise dos extratos hidroetanólico 64% (v/v) das folhas de espécies de *Passiflora* estudadas. Os perfis cromatográficos das espécies de *Passiflora* demonstraram ser bastante diferentes entre si, o que possibilitará a sua aplicação no controle de qualidade químico, na identificação e determinação da autenticidade de fitoterápicos produzidos a partir de diferentes espécies de *Passiflora* de nossa flora. O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação dos flavonoides C-glicosilados, orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina nas diferentes espécies de *Passiflora*. O teste de atividade antioxidante utilizando a metodologia do radical estável DPPH demonstrou que os extratos de *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. malacophylla*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* e *P. vitifolia* possui atividade antioxidante quando comparado ao padrão ácido gálico. No teste de atividade anticolinesterásica, as espécies de *Passiflora* não apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. A atividade citotóxica *in vitro* utilizando o método de MTT demonstrou que, dos extratos de *Passiflora* analisados, somente o extrato de *P. alata* apresentou potencial citotóxico relevante, com percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90%, frente as linhagens de células do ovário – humano, carcinoma do cólon e glioblastoma.

Palavras-chave: Box-Behnken, extração acelerada, flavonoides, *Passiflora*, CLAE-DAD.

ABSTRACT

This work describes an application of Box- Behnken experimental planning for the optimization of a method for flavonoid extraction employing accelerated solvent extraction (ASE), and development and validation of an analytical method by HPLC with diode array detection (DAD) for quantification of the major chemical markers in the leaves of *Passiflora alata*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. malacophylla*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* and *P. vitifolia* grown at Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA. The optimization of the extraction method on accelerated solvent extractor (ASE) was performed by using a Box- Behnken application of three factors, hydroethanol solution proportion (%), temperature and number of ASE cycles and three experimental levels (+1, 0, - 1), with the purpose to obtain the best conditions for the determination of extract yield (%), total phenolic content and total flavonoid, while assessing the responses processed. The observed optimized conditions were: proportion hydroethanol 64% (w/w), 80 °C and 5 cycles of extraction. An analytical profile chromatographic method was developed and validated using HPLC-DAD for the analysis of hydroethanolic extract 64% (w/w) of the *Passiflora* leaves species studied. The chromatographic profiles of the *Passiflora* species proved to be quite different, which enables its application in the chemical quality control, identification and determination of the authenticity of herbal medicines produced from different *Passiflora* species from Brazilian flora. The validated chromatographic method was applied in the quantification of flavonoid C- glycosides, orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin and rutin in different species of *Passiflora*. The test of antioxidant activity using the methodology of the stable radical DPPH showed that extracts of *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. malacophylla*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* and *P. vitifolia* has antioxidant activity when compared to standard gallic acid. In the test of anticholinesterase activity, the *Passiflora* species showed no inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase. The in vitro cytotoxic activity using the MTT method showed that extracts of *Passiflora* analyzed, only the extract from *P. alata* showed cytotoxic relevant to the percentage of tumor growth inhibition higher than 90% against the ovarian cell line - human colon carcinoma and glioblastoma.

Keywords: Box-Behnken, accelerated extraction, flavonoids, *Passiflora*, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trajetória temporal do número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>maracuja</i> , no INPI.....	27
Figura 2 - Trajetória temporal do número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no USPTO (A) e EPO (B), no título ou resumo.....	28
Figura 3 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>maracuja</i> , no INPI, <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no USPTO e EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a sua titularidade, se pessoa física ou jurídica.....	29
Figura 4 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>maracuja</i> , no INPI, <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a pessoa jurídica depositante.....	29
Figura 5 - Número de patentes nacionais registradas no INPI referente à busca com as palavras-chaves <i>passiflora</i> ou <i>maracuja</i> , no título ou resumo, distribuído segundo o estado brasileiro depositante.....	30
Figura 6 - Número de patentes registradas no EPO referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no título ou resumo, distribuído segundo o país depositante.....	30
Figura 7 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou <i>maracuja</i> , no INPI, <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a participação da espécie na formulação.....	34
Figura 8 - Número de artigos publicados referente à busca avançada com o termo <i>Passiflora</i> no título ou resumo, para o período de 1997 a agosto de 2013, segundo o banco de dados pesquisado.....	35
Figura 9 - Número de teses/dissertações publicadas no Banco de Teses da CAPES referente à busca com o termo <i>Passiflora</i> no assunto, segundo o banco de dados pesquisado.....	35
Figura 10 – Estrutura básica dos flavonoides.....	40
Figura 11 – (A) Etapas da extração com ASE e (B) Equipamento de extração acelerada com solventes.....	48
Figura 12 - Distribuição espacial dos pontos experimentais de um planejamento Box-Behnken para otimização de 3 variáveis.....	50
Figura 13 - Fotos dos acessos de <i>Passiflora</i> : (08) – <i>P. gibertii</i> ; (25) – <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> ; (32) – <i>P. maliformis</i> ; (77) – <i>P. cincinnata</i> ; (104) – <i>P. vitifolia</i> ; (105) – <i>P. tenuifila</i> ; (109) – <i>P. galbana</i> ; (114) – <i>P. mucronata</i> ; (125) – <i>P. capsularis</i> ; (152) – <i>P. suberosa</i> ; (157) – <i>P. quadrangularis</i> ; (163) – <i>P. alata</i>	71
Figura 14 - Fotos dos acessos de <i>Passiflora</i> : (170) – <i>P. malacophylla</i> ; (172) – <i>P. racemosa</i> ; (205) – <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ; (237) – <i>P. setacea</i>	72
Figura 15 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.....	75
Figura 16 - Curva de calibração de fenólicos totais utilizando-se o ácido gálico como padrão	75

Figura 17 - Esquema representativo da complexação do íon Al ³⁺ e flavonoides.....	76
Figura 18 - Curva de calibração para a determinação dos flavonoides totais a partir da quercetina.....	76
Figura 19 - Superfícies de respostas para a desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos e PH = proporção hidroetanólica.....	80
Figura 20 - Superfícies de contorno para a desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos e PH = proporção hidroetanólica.....	80
Figura 21 - Gráfico com valores preditos e desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos e PH = proporção hidroetanólica; R = rendimento; FEN = fenólicos totais e FLA = flavonoides totais.....	81
Figura 22 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) de eluição gradiente do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , referente à condição 1 da Tabela 18.....	85
Figura 23 - Reação química de síntese da sílica híbrida de segunda geração.....	87
Figura 24 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) de eluição gradiente do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , referente à condição 6 da Tabela 18.....	87
Figura 25 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> e espectros de absorção no UV das bandas cromatográficas assinaladas (1 a 6). tR1 = 10,3 min; tR2 = 12,6 min; tR3 = 15,2 min; tR4 = 15,7 min; tR5 = 18,2 min; tR6 = 18,7 min.....	89
Figura 26 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. alata</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (7 a 11). tR7 = 15,2 min; tR8 = 15,7 min; tR9 = 16,4 min; tR10 = 18,2 min; tR11 = 18,7 min.....	90
Figura 27 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. capsularis</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (12 a 17). tR12 = 15,1 min; tR13 = 15,6 min; tR14 = 15,8 min; tR15 = 17,3 min; tR16 = 17,8 min; tR17 = 18,6 min.....	91
Figura 28 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. cincinnata</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (18 a 23). tR18 = 15,1 min; tR19 = 15,6 min; tR20 = 16,5 min; tR21 = 17,3 min; tR22 = 18,2 min; tR23 = 18,7 min.....	92
Figura 29 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> e espectros de absorção no UV das bandas cromatográficas assinaladas (24 a 29). tR24 = 10,3 min; tR25 = 12,5 min; tR26 = 15,2 min; tR27 = 15,7 min; tR28 = 18,2 min; tR29 = 18,7 min.....	93
Figura 30 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. galbana</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (30 a 35). tR30 = 15,1 min; tR31 = 15,9 min; tR32 = 17,5 min; tR33 = 18,6 min; tR34 = 19,1 min; tR35 = 20,1 min.....	94
Figura 31 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. gibertii</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (36 a 41). tR36 = 15,8 min; tR37 = 16,4 min; tR38 = 18,1 min; tR39 = 18,6 min; tR40 = 18,9 min; tR41 = 20,8 min.....	95
Figura 32 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. malacophylla</i> e	

espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (42 a 47). tR42 = 12,5 min; tR43 = 14,3 min; tR44 = 15,2 min; tR45 = 15,7 min; tR46 = 18,2 min; tR47 = 18,7 min.....	96
Figura 33 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. maliformis</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (48 a 53). tR48 = 14,3 min; tR49 = 15,1 min; tR50 = 15,6 min; tR51 = 16,5 min; tR52 = 17,3 min; tR53 = 18,7 min.....	97
Figura 34 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. morifolia</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (54 a 59). tR54 = 14,3 min; tR55 = 15,1 min; tR56 = 15,6 min; tR57 = 18,1 min; tR58 = 18,7 min; tR59 = 27,0 min.....	98
Figura 35 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. mucronata</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (60 a 65). tR60 = 15,5 min; tR61 = 15,9 min; tR62 = 17,5 min; tR63 = 18,8 min; tR64 = 19,1 min; tR65 = 20,1 min.....	99
Figura 36 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. quadrangularis</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (66 a 71). tR66 = 15,5 min; tR67 = 15,8 min; tR68 = 16,4 min; tR69 = 17,9 min; tR70 = 18,1 min; tR71 = 18,7 min.....	100
Figura 37 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. racemosa</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (72 a 77). tR72 = 12,5 min; tR73 = 14,2 min; tR74 = 15,6 min; tR75 = 18,1 min; tR76 = 18,7 min; tR77 = 18,9 min.....	101
Figura 38 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. setacea</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (78 a 83). tR78 = 12,5 min; tR79 = 15,1 min; tR80 = 15,6 min; tR81 = 17,5 min; tR82 = 18,1 min; tR83 = 18,6 min.....	102
Figura 39 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. suberosa</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (84 a 89). tR84 = 12,2 min; tR85 = 15,1 min; tR86 = 15,4 min; tR87 = 18,2 min; tR88 = 18,6 min; tR89 = 18,9 min.....	103
Figura 40 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. tenuifila</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (90 a 95). tR90 = 15,1 min; tR91 = 15,8 min; tR92 = 18,7 min; tR93 = 18,9 min; tR94 = 19,1 min; tR95 = 20,8 min.....	104
Figura 41 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de <i>P. vitifolia</i> e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (96 a 101). tR96 = 14,3 min; tR97 = 15,1 min; tR98 = 15,5 min; tR99 = 17,5 min; tR100 = 18,1 min; tR101 = 18,7 min.....	105
Figura 42 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. alata</i> (A), <i>P.</i> <i>capsularis</i> (B), <i>P. cincinnata</i> (C), <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (D), <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> (E), <i>P. galbana</i> (F), <i>P. gibertii</i> (G), <i>P. malacophylla</i> (H).....	107
Figura 43 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. maliformis</i> (I), <i>P.</i> <i>morifolia</i> (J), <i>P. mucronata</i> (K), <i>P. quadrangularis</i> (L), <i>P. racemosa</i> (M), <i>P.</i> <i>setacea</i> (N), <i>P. suberosa</i> (O), <i>P. tenuifila</i> (P).....	108
Figura 44 - Cromatograma sobreposto ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. vitifolia</i> (Q).....	109
Figura 45 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	112
Figura 46 - Curvas de calibração por padronização externa para o método de quantificação de orientina (A), isoorientina (B), vitexina (C), isovitexina (D) em	

extratos de <i>Passiflora</i>	114
Figura 47 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) obtidos por CLAE-DAD de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , tR1 = 15,2 (isorientina); tR2 = 15,7 (orientina); tR3 = 18,2 (vitexina); tR4 = 18,7 (isovitexina); tR5 = 18,8 (rutina).....	121
Figura 48 – Estruturas químicas dos flavonoides orientina, isorientina, isovitexina, vitexina e rutina. Glu = glicose.....	124
Figura 49 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) dos padrões isorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina.....	124
Figura 50 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) das soluções-padrão de 1,0 mg/L (A), 7,5 mg/L (B) e 15 mg/L (C) e espectros UV-1 (isorientina), UV-2 (orientina), UV-3 (vitexina), UV-4 (isovitexina) e UV-5 (rutina). tR1 = 15,2 min; tR2 = 15,6 min; tR3 = 18,2 min; tR4 = 18,7 min; tR5 = 18,9 min.....	125
Figura 51 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. alata</i> (A), <i>P. capsularis</i> (B), <i>P. cincinnata</i> (C), <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (D), <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> (E), <i>P. galbana</i> (F). 1 – isorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina.....	126
Figura 52 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. gibertii</i> (G), <i>P. malacophylla</i> (H), <i>P. maliformis</i> (I), <i>P. morifolia</i> (J), <i>P. mucronata</i> (K), <i>P. quadrangularis</i> (L), <i>P. racemosa</i> (M), <i>P. setacea</i> (N). 1 – isorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina; 5 – rutina.....	127
Figura 53 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de <i>P. suberosa</i> (O), <i>P. tenuifila</i> (P), <i>P. vitifolia</i> (Q). 1 – isorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina; 5 – rutina.....	128
Figura 54 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.....	132
Figura 55 - Atividade antioxidante pelo método do DPPH.....	132
Figura 56 - Percentual do sequestro de radical de livre do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de espécies de <i>Passiflora</i>	133
Figura 57 - Percentual do sequestro de radical de livre do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de espécies de <i>Passiflora</i>	134
Figura 58 - Resultados da atividade da enzima acetilcolinesterase.....	137
Figura 59 – Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	137
Figura 60 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de <i>Passiflora</i> frente as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de cólon).....	138
Figura 61 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de <i>Passiflora</i> frente as linhagens celulares OVACAR-8 (ovário-humano).....	139
Figura 62 - Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de <i>Passiflora</i> frente as linhagens celulares SF-295 (Glioblastoma).....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Passiflora</i> que estão presentes na Lista Vermelha da IUCN e sua categoria de risco de extinção.....	23
Tabela 2 - Limites nos ensaios de pureza da droga vegetal obtidas de <i>Passiflora</i> sp.....	25
Tabela 3 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave <i>passiflora</i> ou maracuja, no INPI, <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no USPTO e EPO, no título ou resumo.....	27
Tabela 4 - Assuntos das patentes registradas referente à busca com as palavras-chave: <i>passiflora</i> ou maracuja, no INPI, <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no USPTO e EPO, no título ou resumo, segundo a classificação internacional de patentes (CIP).....	31
Tabela 5 - Número de patentes registradas nos diferentes bancos de dados referente à busca com as palavras-chave: <i>passiflora</i> ou <i>passion flower</i> , no USPTO e EPO; <i>passiflora</i> ou maracuja, no INPI, <i>Passiflora</i> na CAPES e no Scifinder, no título ou resumo.....	36
Tabela 6 – Subgrupos principais dos flavonoides e exemplos.....	41
Tabela 7 - Estrutura química dos flavonoides C-glicosilados relatados em espécies de <i>Passiflora</i>	43
Tabela 8 –Solventes e mistura de solventes na extração de flavonoides de <i>Passiflora</i>	46
Tabela 9 - Quantidade de material vegetal seco e triturado.....	57
Tabela 10 - Matriz Box-Behnken para três variáveis.....	59
Tabela 11 - Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento Box-Behnken.....	58
Tabela 12 - Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de <i>Passiflora</i> (BGP) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.....	70
Tabela 13 - Matriz e resultados do planejamento Box-Behnken para determinação do rendimento, fenólicos totais e flavonoides totais da espécie <i>P. alata</i>	78
Tabela 14 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para o rendimento de extração.....	78
Tabela 15 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para fenólicos totais.....	79
Tabela 16 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para flavonoides totais.....	79
Tabela 17 – Rendimento dos extratos de <i>Passiflora</i>	82
Tabela 18 - Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de <i>P. edulis</i> flavicarpa, com detecção em $\lambda = 337$ nm.....	84
Tabela 19 - Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (tR) e as áreas das bandas cromatográficas, numeradas nas Figuras 42 a 44, avaliadas nas análises de amostras de <i>Passiflora</i> (repetibilidade).....	109
Tabela 20 - Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (tR) e as áreas das bandas cromatográficas avaliadas nas análises de amostra de <i>P. edulis</i> flavicarpa (precisão de injeção).....	112
Tabela 21 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de	

orientina.....	115
Tabela 22 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de isoorientina.....	115
Tabela 23 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de vitexina.....	115
Tabela 24 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de isovitexina.....	116
Tabela 25 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de rutina.....	116
Tabela 26 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina.....	117
Tabela 27 - Média das áreas das bandas cromatográficas e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada substância na avaliação da repetibilidade do método.....	119
Tabela 28 - Média das áreas das bandas cromatográficas e coeficientes de variação (CV) obtidos para as substâncias orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina na avaliação da precisão intermediária do método.....	120
Tabela 29 - Recuperação dos padrões em extrato de <i>P. edulis</i> flavicarpa.....	122
Tabela 30 - Concentração dos flavonoides isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina em espécies de <i>Passiflora</i>	130
Tabela 31 - CE ₅₀ dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de dezessete espécies de <i>Passiflora</i> estudadas.....	135
Tabela 32 - Valores de CI ₅₀ do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de <i>P. alata</i> em linhagens de células tumorais, com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE - enzima acetilcolinesterase

ACN – acetonitrila

AG – ácido gálico

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – extração acelerada com solvente

BA – Bahia

BGP – Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora*

CE₅₀ – concentração efetiva para se obter 50% de efeito

CI₅₀ – concentração efetiva para se obter 50% de inibição

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CCDA – cromatografia em camada delgada analítica

CIP – Classificação Internacional de Patentes

CV – coeficiente de variação

DA – doença de Alzheimer

DMSO - dimetilsufóxido

d.i. – diâmetro interno

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DTNB - ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico]

DAD – detector de arranjo de diodos

DIC – detector de ionização de chamas

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EM – espectrometria de massas

ESI – ionização por spray de elétrons

EPO - *European Patent Office*

FB – Farmacopeia Brasileira

FDA – *Food and Drug Administration*

FEN – fenólicos totais

FLA – flavonoides totais

FFFB - Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira

FMAE – extração por micro-ondas focalizada

g.l. – graus de liberdade

Glu - glicose

HCT – 116 – linhagem tumoral do carcinoma do cólon

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

L - linear

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MAE – extração assistida por micro-ondas

MQ – média quadrática

MQ_{ta} – média quadrática devido à falta de ajuste

MQ_{ep} – média quadrática devido ao erro puro

MQR – média quadrática da regressão

MQ_r – média quadrática dos resíduos

MSR – metodologia de superfície de resposta

MS – Ministério da Saúde

MTT - sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

NC – número de ciclos

NCI – Instituto Nacional do Câncer

ND – não detectado

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVACAR-8 – linhagem tumoral do ovário-humano

Q - quadrático

QUE – quercetina

R – rendimento

PC – ponto central

PH – proporção da solução hidroetanólica

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS

SFE – extração em fluido supercrítico

SF-295 – linhagem tumoral do glioblastoma

SNC – sistema nervoso central

SQ – soma quadrática

SQR – soma quadrática da regressão

SQT – soma quadrática total

SPE – extração em fase sólida

SRL – sequestro do radical livre DPPH

SUS – Sistema Único de Saúde

THF – tetraidrofurano

T – temperatura

t_g – tempo de gradiente

t_R – tempo de retenção

USPTO - *United States Patent and Trademark Office's*

UV – ultravioleta

Vis – visível

vol. inj. – volume de injeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Gênero <i>Passiflora</i> : considerações gerais.....	23
2.2. Prospecção tecnológica e científica em <i>Passiflora</i>	25
2.3. Composição química.....	40
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	47
3.1. Extração acelerada com solventes (ASE).....	47
3.2. Planejamento Box-Behnken.....	49
4 OBJETIVOS.....	53
4.1. Gerais.....	53
4.2. Específicos.....	53
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
5.1. Materiais e equipamentos.....	55
5.2. Coleta e processamento de amostras vegetais.....	56
5.3. Extração acelerada com solventes (ASE).....	57
5.4. Determinação dos fenólicos totais.....	59
5.5. Determinação dos flavonoides totais.....	60
5.6. Preparo das amostras para CLAE.....	61
5.7. Condições analíticas para o perfil cromatográfico de extratos de espécies de <i>Passiflora</i> e do método quantitativo.....	62
5.8. Validação do método analítico.....	62
5.9. Testes de atividade biológica.....	64
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
6.1. Coleta e processamento de amostras de <i>Passiflora sp.</i>	69
6.2. Extração acelerada com solventes (ASE).....	72
6.3. Pré-tratamento das amostras.....	82
6.4. Otimização das condições cromatográficas do perfil cromatográfico.....	83
6.5. Validação do método analítico para o perfil cromatográfico de espécies de <i>Passiflora</i>	106
6.6. Certificação do método analítico.....	112
6.7. Análise quantitativa.....	123
6.8. Testes biológicos.....	131
7 CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS.....	145
GLOSSÁRIO.....	159

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins medicinais é considerado uma das primeiras formas de cuidado da saúde utilizada pelo homem, e está relacionada aos primórdios da medicina¹.

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base terapêutica, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de crescimento vertiginoso com o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos². Porém, atualmente, o uso de produtos medicinais à base de plantas vem apresentando um crescimento marcante, como tratamento alternativo aos medicamentos da medicina convencional³.

Desde a Declaração de *Alma-Ata*, em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais com finalidades profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnóstico, em função de 80% da população mundial utilizá-las para cuidar da Atenção Primária à Saúde⁴.

No Brasil, como em diversos países, as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos têm seu uso extenso pela população. Diversos são os fatores que propiciaram o interesse da população por estes produtos, valendo destacar, a preferência por tratamentos preventivos e terapias complementares em relação aos tratamentos convencionais, principalmente com relação a doenças degenerativas e crônicas, que afetam o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular; a preocupação com os efeitos colaterais, frequentemente observados com o uso de medicamentos sintéticos, associada à crença de que os fitomedicamentos não os possuem; a tendência à automedicação; o maior volume e divulgação de estudos científicos que comprovam a eficácia e a segurança de espécies vegetais⁵.

Nesse sentido, o mercado mundial de medicamentos fitoterápicos teve um aumento expressivo nas últimas décadas, especialmente nos países industrializados, cujo faturamento atinge mais de US\$ 20 bilhões anuais. Os países europeus, especialmente a Alemanha, os países asiáticos e os Estados Unidos, possuem os principais mercados consumidores desses medicamentos. No Brasil, cerca de 200 laboratórios movimentam em torno de US\$ 400 milhões,

representando em torno de 6,7% das vendas de medicamentos no país, sendo um mercado promissor e em franca expansão⁶.

Acompanhando o processo de crescimento do setor industrial de medicamentos fitoterápicos, vários países da Europa estão intensificando esforços para unificar a legislação referente aos medicamentos fitoterápicos, amplamente comercializados nestes países, em especial Alemanha e França. Por outro lado, nos Estados Unidos, as preparações à base de plantas são classificadas como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao *Food and Drug Administration* (FDA) para a comercialização destes produtos⁷.

No Brasil, várias ações governamentais surgiram para regulamentar e fomentar seu desenvolvimento, como a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), ambas publicadas em 2006^{8,9}. Essas políticas trazem como diretrizes, dentre outras ações, a elaboração/adequação de marco regulatório e incentivo à pesquisa para plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do País.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), órgão responsável pelo registro de medicamentos e outros produtos destinados à saúde, possui diversas normas regulamentando os fitoterápicos, sendo a principal delas a RDC nº 14 (2010) que trata do registro desses medicamentos¹⁰.

Com o intuito de fortalecer pesquisas com plantas medicinais nativas prioritárias e disponibilizar estas informações, o Ministério da Saúde (MS) publicou, em fevereiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Esta lista é composta por 71 espécies vegetais, para as quais serão priorizadas pesquisas e investimentos com o intuito de que as mesmas sejam utilizadas com segurança e eficácia nas suas diferentes formas de apresentação: material vegetal *in natura*, material vegetal seco, medicamentos manipulados e industrializados¹¹.

Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia, segurança e qualidade destes medicamentos. A eficácia diz respeito à comprovação, através de ensaios farmacológicos não-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam

a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde (metais pesados, agrotóxicos, microrganismos e seus produtos de degradação)¹².

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam tanto a matéria-prima vegetal quanto o produto final. Sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final⁷.

Além disso, as plantas constituem misturas complexas de várias substâncias químicas cuja atividade biológica pode, em muitos casos, ser atribuída aos efeitos sinérgicos das mesmas, sendo que, muitas vezes, essas substâncias responsáveis pela atividade farmacológica não estão suficientemente estabelecidas^{13,14}. Desta forma, o controle de qualidade, a padronização e a determinação da estabilidade de fitoterápicos se tornam tarefas bastante complexas.

Sendo assim, os parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal devem ser rigorosamente estabelecidos, bem como ser padronizados os procedimentos de preparo dos extratos (derivados da droga vegetal), a fim de se obter produtos com consistência em termos de composição química⁵.

Atualmente, a padronização de medicamentos fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados¹⁵. Tal substância não necessariamente apresenta a atividade farmacológica esperada ou para a qual o extrato é empregado.

Além da padronização no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, é de grande importância a utilização de técnicas químicas de análise, que permitem avaliar a qualidade dos produtos de origem vegetal de forma adequada, considerando sua complexidade e todos os fatores inerentes aos fitomedicamentos¹⁴.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Passiflora*: considerações gerais

O gênero *Passiflora*, com cerca de 520 espécies de dicotiledôneas, é o maior e mais diversificado da família Passifloraceae, ocorrendo, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo o maior foco de distribuição geográfica a região Centro-norte do Brasil, onde são encontradas pelo menos 79 espécies, e o estado da Bahia, com 45 espécies relatadas¹⁵⁻²⁰. As características das espécies são muito variadas, desde plantas escandentes, herbáceas ou lenhosas, expandindo-se geralmente, mediante gavinhas auxiliares, e raramente como árvores pequenas ou arbustos²¹. Segundo o inventário sobre o estado de conservação mundial de espécies de plantas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN)²², conhecido como Lista Vermelha da IUCN, 27 espécies de *Passiflora*, todas nativas do Equador, encontram-se ameaçadas e seu risco de extinção é discriminado na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies de *Passiflora* que estão presentes na Lista Vermelha da IUCN e sua categoria de risco de extinção.

Categoria	Espécie	Categoria	Espécie
Em Perigo	<i>P. andina</i> <i>P. anfracta</i> <i>P. brachyantha</i> <i>P. discophora</i> <i>P. harlingii</i> <i>P. linda</i> <i>P. loxensis</i> <i>P. luzmaria</i> <i>P. montana</i> <i>P. subpurpurea</i> <i>P. zamorana</i>	Vulnerável	<i>P. ampullacea</i> <i>P. deltoifolia</i> <i>P. eggertii</i> <i>P. hirtiflora</i> <i>P. jamesonii</i> <i>P. jatunsachensis</i> <i>P. roseorum</i> <i>P. sanctae-barbarae</i> <i>P. trochlearis</i>
Deficiência de Dados	<i>P. telesiphe</i>	Quase Ameaçada	<i>P. reflexiflora</i> <i>P. sodiroi</i>
Pouco Preocupante	<i>P. indecora</i> <i>P. monadelphica</i> <i>P. smilacifolia</i> <i>P. sprucei</i>		

Ordem crescente das categorias de risco de extinção: pouco preocupante; quase ameaçada; dependente de conservação; vulnerável; em perigo; criticamente em perigo; extinta na natureza; extinta. Fonte: <http://www.iucnredlist.org/search>.

No Brasil, as espécies do gênero *Passiflora* são popularmente conhecidas como maracujá, nome de origem indígena, das tribos Tupi e Guarani, e deriva de “murukuia”, que significa “alimento em forma de cuia”^{23,24}.

O nome derivado do latim, *passio* (paixão) e *flos* (flor) é uma alusão às partes das flores e folhas da primeira espécie de *Passiflora* descoberta (*P. incarnata* L.) pelos jesuítas, que recordavam alguns símbolos da paixão de Cristo²¹. Por esta razão, as espécies de *Passiflora* são conhecidas na Europa e América do Norte como flor-da-paixão (*passion flower*).

Muitas espécies do gênero possuem frutos comestíveis, enquanto que outras são cultivadas como ornamentais devido as suas flores que são consideradas exóticas, algumas de coloração forte e brilhante, outras de coloração suave e marcante, devido, principalmente, à presença da corona, que caracteriza a família Passifloraceae^{25,26}.

No Brasil, das 120 espécies nativas de maracujá, três possuem destacado interesse comercial: *P. edulis* Sims (maracujá-roxo), *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener (maracujá-amarelo ou azedo) e *P. alata* Curtis (maracujá-doce). O maracujá-amarelo é o mais conhecido e comercializado no Brasil, sendo a matéria-prima das indústrias de suco de maracujá.

Dentre as várias espécies de *Passiflora*, destacam-se a *P. incarnata*, *P. alata*, *P. edulis* e *P. caerulea*, pois são amplamente usadas na medicina tradicional por toda Europa e nas Américas. *P. incarnata* é a espécie mais estudada no que diz respeito às propriedades medicinais, possuindo monografias descritas na Farmacopeia Europeia (2005), Britânica (2005), Francesa (1965) e Suíça (1971), entre outras^{27,28}.

No Brasil, o gênero *Passiflora* foi inserido na Farmacopeia Brasileira (FB), desde a sua 1ª edição em 1926, com a descrição da droga vegetal, extrato fluido e tintura de folhas de *P. alata*²⁹. Recentemente, na quinta edição da FB³⁰, houve a inserção da monografia de *P. edulis*. Para ambas as monografias fica estabelecido o conteúdo mínimo de 1,0% de flavonoides totais, expressos em apigenina, e os limites para os ensaios de pureza referente ao teor de material estranho, de água, de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácido, semelhantes para ambas as espécies, diferindo apenas o índice de espuma, máximo de 100 para *P. alata* e mínimo de 5000 para *P. edulis* (Tabela 2).

Tabela 2 - Limites nos ensaios de pureza da droga vegetal obtidas de *Passiflora* spp.

Ensaio de pureza	<i>P. edulis</i>	<i>P. alata</i>
Material estranho	No máximo 2,0%	No máximo 2,0%
Água	No máximo 11,0%	No máximo 11,0%
Cinzas totais	No máximo 10,0%	No máximo 10,0%
Cinzas insolúveis em ácido	No máximo 0,4%	No máximo 0,4%
Índice de espuma	No máximo 100	No máximo 5000

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>.

Monografias das drogas vegetais de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, assim como a tintura de *P. edulis* estão descritas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB), todas com a indicação de uso como ansiolítico e sedativo leve³¹. Folhas de *P. alata*, *P. edulis* e partes aéreas de *P. incarnata* estão recomendadas para quadros leves de ansiedade e insônia a partir da infusão de suas drogas vegetais segundo a RDC nº 10 (2010)³², que trata da notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Devido à sua grande importância terapêutica, as espécies de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* encontram-se listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

A Anvisa padronizou e disponibilizou em seu site, conforme preconizado pela RDC nº 47 (2009)³³, bula padrão de medicamento fitoterápico obtidos de *P. incarnata*, no qual o extrato/tintura das partes aéreas é padronizado com flavonoides totais expressos em vitexina. Vale ressaltar que o medicamento de *P. incarnata* é um dos fitoterápicos industrializados que possui registro simplificado no Brasil³⁴ e em outros países, a exemplo dos países da Comunidade Europeia³⁵ e Canadá³⁶.

2.2. Prospecção tecnológica e científica em *Passiflora*

Diante da demanda mundial de mercado e o desenvolvimento tecnológico, faz-se necessário tornar a prospecção tecnológica de patentes uma ferramenta rotineira de busca utilizada pelos profissionais das instituições de ensino, uma vez que através das patentes são mapeados todos os processos e produtos existentes, identificando o estágio de maturidade da tecnologia em questão e como ela se insere na sociedade³⁷.

Segundo dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), a documentação de patente é a mais completa entre as fontes de pesquisa. Estudos

revelam que 70% das informações tecnológicas contidas nestes documentos não estão disponíveis em qualquer outro tipo de fonte de informação³⁸, o que reforça a necessidade do mapeamento das patentes concomitante com o levantamento da literatura.

A prospecção tecnológica e científica baseou-se na busca de patentes, realizada dia 22 de agosto de 2013, na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), do *United States Patent and Trademark Office's* (USPTO) e do *European Patent Office* (EPO). A pesquisa exploratória acerca das espécies de *Passiflora* abrangeu a busca de patentes, artigos, dissertações e teses publicadas. O levantamento foi realizado com as palavras-chave *Passiflora* ou *passion flower* ou maracuja, a depender do banco de dados utilizado. O objetivo principal foi apresentar uma visão geral do estado atual de desenvolvimento científico e tecnológico relacionada às espécies do gênero *Passiflora*.

Essas fontes foram utilizadas pela abrangência do acervo e gratuidade de acesso, sendo semanalmente atualizadas. No caso das patentes, foram utilizadas as palavras-chave *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO e EPO; *passiflora* ou maracuja, no INPI, no título ou resumo. As patentes encontradas foram verificadas individualmente para confirmar que se tratava do objeto de interesse do presente trabalho, uma espécie medicinal.

Para o levantamento de artigos, foi utilizada a palavra-chave *Passiflora*, com busca no título/resumo dos bancos de dados do *ScienceDirect*, *PubMed* e *Scielo*, para o período de 1997 até o presente, 22 de agosto de 2013, sem discriminação da área de concentração do estudo. Uma busca mais refinada foi realizada no *SciFinder*, no qual se cruzou o termo *Passiflora* com a subcategoria de substâncias orgânicas, pertencente à categoria de química geral, desses foram selecionados os artigos que possuíam relação com áreas de atividade biológica e produtos naturais.

A prospecção de dissertações e teses defendidas no país foi realizada no Banco de Teses da CAPES e *Passiflora* foi o termo de busca.

A prospecção analisou qual(is) espécie(s) do gênero era alvo de interesse das publicações e patentes encontradas nas diferentes bases de dados, nos campos do título e do resumo das patentes e publicações. Todas as nomenclaturas botânicas encontradas foram verificadas no site do Tropicos[®].

Com relação às patentes referentes ao gênero *Passiflora* e seu nome popular (maracuja ou *passion flower*) foram encontradas 23 patentes no INPI, 6 no USPTO e

174 no EPO (Tabela 3). Esse valor total é o número real de patentes, pois muitas vezes as patentes possuíam o termo de busca, mas não se tratavam da espécie medicinal ou as patentes se apresentavam de forma duplicada contendo os dois termos.

Tabela 3 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou *maracuja*, no INPI, *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO e EPO, no título ou resumo.

Palavras-chave no título ou resumo	INPI	USPTO	EPO
<i>Passiflora</i>	7	4	120
<i>passion flower</i>	-	2	78
maracuja	23	-	-
<i>Passiflora</i> e maracuja	7	-	-
<i>Passiflora</i> e <i>passion flower</i>	-	-	24
Total	23	6	174

Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), *United States Patent and Trademark Office's* (USPTO) e *European Patent Office* (EPO).

No Brasil, a primeira patente envolvendo o gênero *Passiflora* foi registrada em 1997, tendo como título “Composto revitalizador da pele”, sendo o maracujá um dos ativos da formulação.

A trajetória temporal do número de patentes nas diferentes bases de dados está representada nas Figuras 1 e 2. Percebe-se claramente o crescente número de registros no banco de patentes europeu, enquanto que no USPTO o registro de patentes envolvendo o gênero é mais recente que o do INPI.

Figura 1 - Trajetória temporal do número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou maracuja, no INPI.

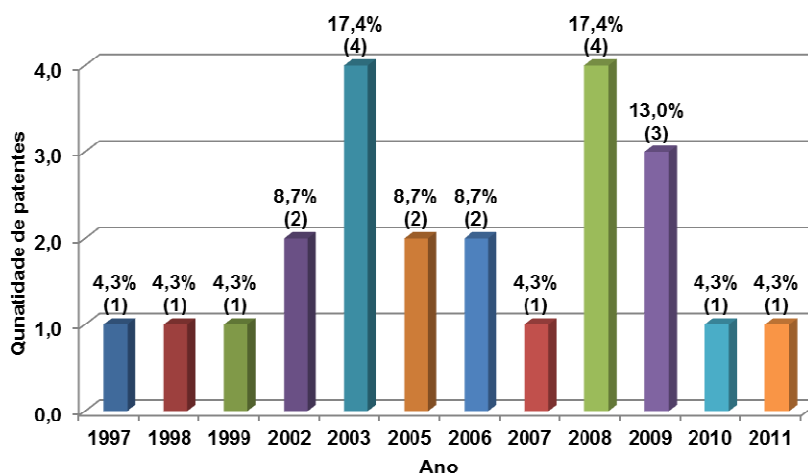
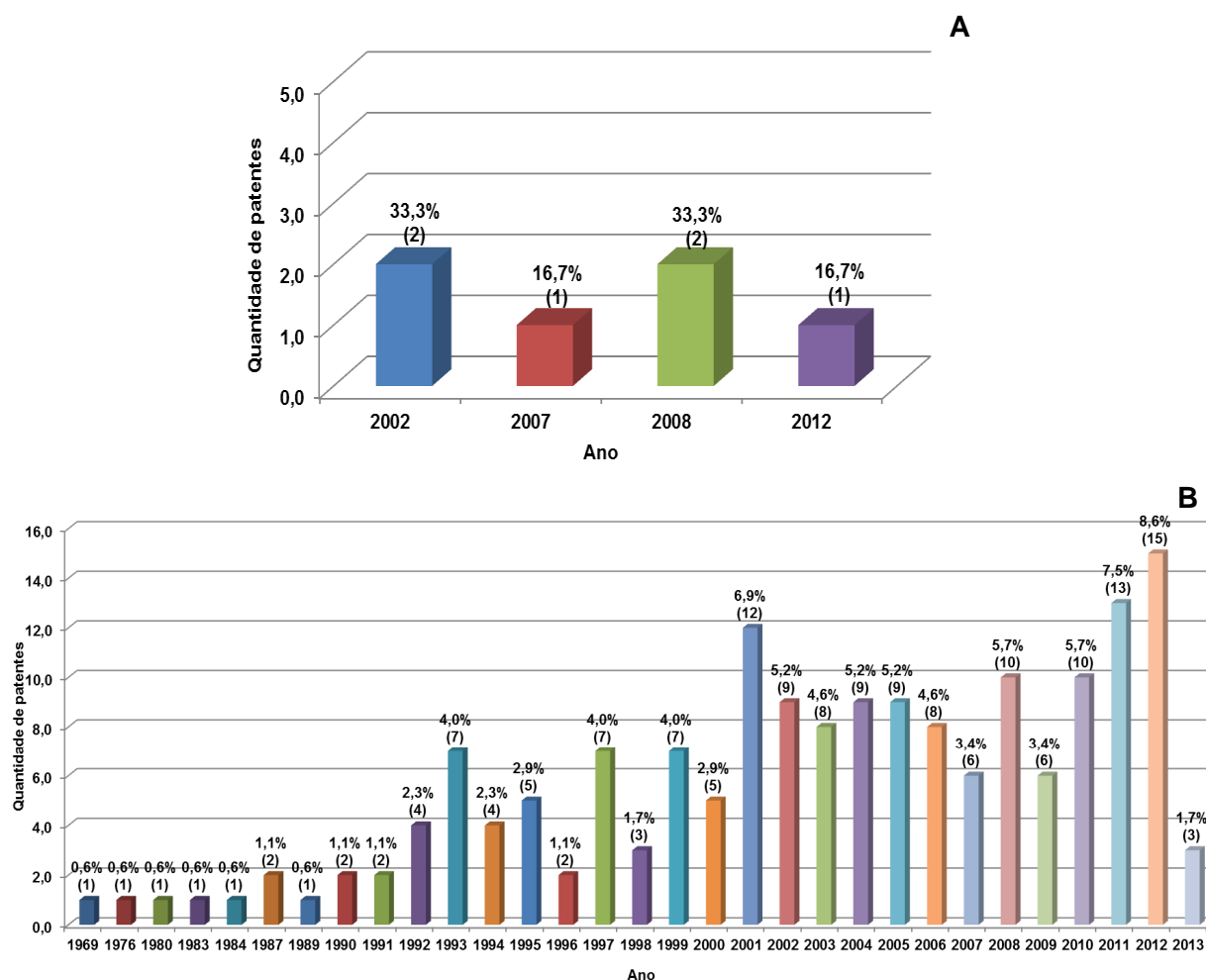
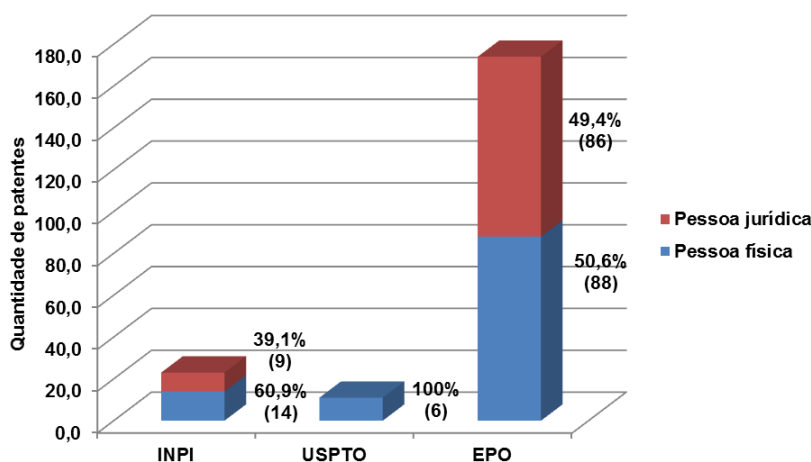


Figura 2 - Trajetória temporal do número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO (A) e EPO (B), no título ou resumo.



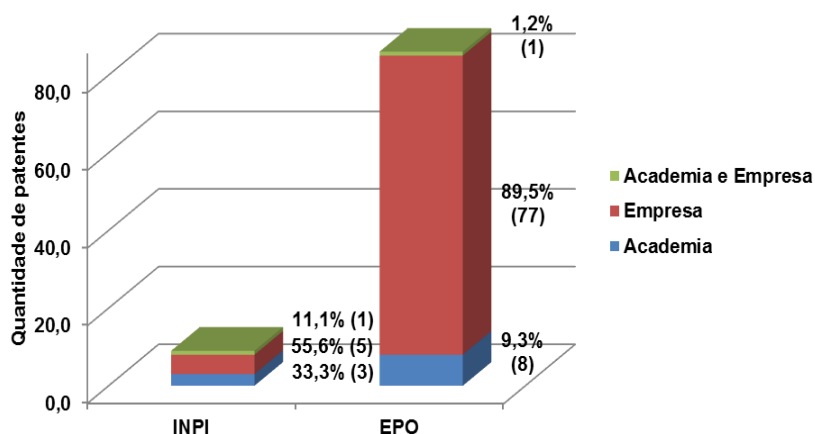
O maior número de patentes acerca da espécie, nos bancos de dados do INPI, foi registrado por pessoas físicas, 60,9% (14). No USPTO a totalidade das patentes encontradas é pertencente à pessoas físicas, enquanto no EPO, o número de patentes registradas por pessoas físicas 50,6% (86) assemelha-se ao de pessoas jurídicas, 49,4% (88) (Figura 3). O elevado número de patentes registrado na base de dados do EPO pode ser justificado por essa base de dados importar patentes periodicamente de mais de 80 países.

Figura 3 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou *maracuja*, no INPI, *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO e EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a sua titularidade, se pessoa física ou jurídica.



Com relação às patentes registradas por pessoas jurídicas, a maior parte delas é depositada pelo setor empresarial, tanto no INPI, 55,6% (5), quanto no EPO, 89,5% (77) (Figura 4). Em ambos os bancos de patentes, apenas uma patente foi encontrada tendo como depositante a empresa e a academia em parceria (Figura 4).

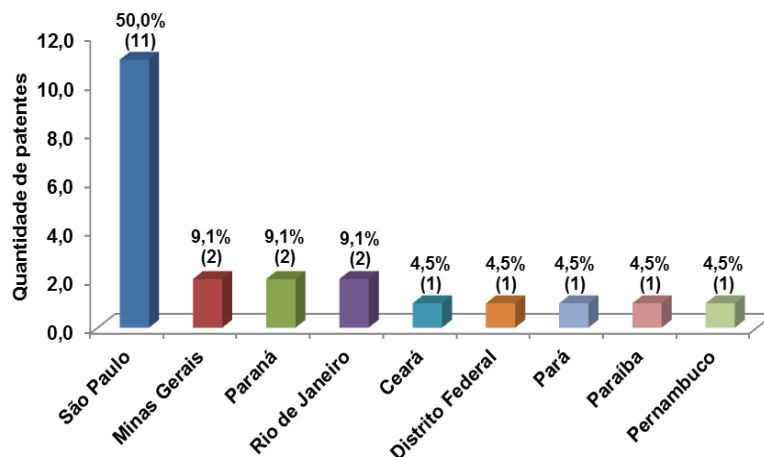
Figura 4 – Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou *maracuja*, no INPI, *passiflora* ou *passion flower*, no EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a pessoa jurídica depositante.



Das patentes registradas no INPI para a espécie em estudo, apenas uma delas é pertencente à Suíça, sendo o restante nacional. A titularidade das 22 patentes nacionais abrange todas as regiões do país: 68,2% (15) para região sudeste, 13,6% (3) para região nordeste, 9,1% (2) para região sul, 4,5% (1) para

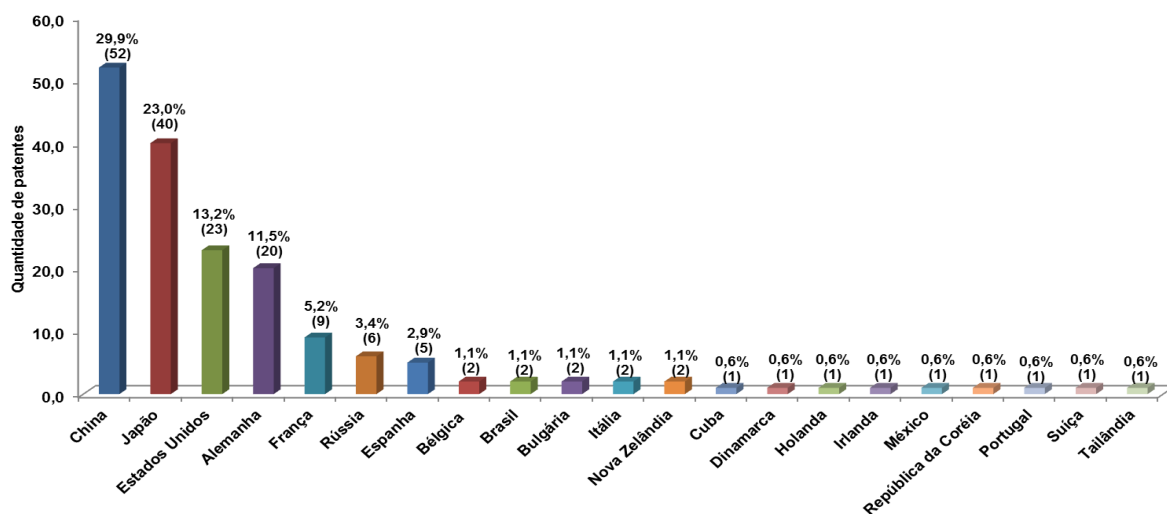
região centro-oeste e norte cada uma. No estado de São Paulo observa-se o maior número de patentes registradas com 50,0% (11) (Figura 5).

Figura 5 - Número de patentes nacionais registradas no INPI referente à busca com as palavras-chaves *passiflora* ou maracuja, no título ou resumo, distribuído segundo a unidade da federação depositante.



Com relação as 174 patentes registradas no banco europeu de patentes para a espécie em estudo, a China e o Japão são os países com maior número de depósitos, enquanto o Brasil detém a titularidade apenas de duas patentes registradas no EPO (Figura 6).

Figura 6 - Número de patentes registradas no EPO referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou *passion flower*, no título ou resumo, distribuído segundo o país depositante.



As patentes encontradas para *Passiflora* foram contabilizadas quanto à distribuição nas diferentes classes da Classificação Internacional de Patentes (CIP), ficando evidente a diversidade de área de aplicação das patentes, nas diferentes seções: A – Necessidades humanas; B – Operações de processamento; transporte; C – Química; metalurgia; D – Têxteis; papel e G – Física (Tabela 4). Através desse levantamento percebe-se a predominância das patentes relacionadas às preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas (A61K), em todas as três bases de patentes pesquisadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Assuntos das patentes registradas referente à busca com as palavras-chave: *passiflora* ou *maracuja*, no INPI, *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO e EPO, no título ou resumo, segundo a classificação internacional de patentes (CIP).

Classificação Internacional de Patentes			Banco de patentes		
Seção	Subseção	Classe	INPI	USPTO	EPO
A - Necessidades Humanas	A61 – Ciência médica ou veterinária; Higiene.	A61K - Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas.	8	6	132
		A61Q – Uso específico de cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal.	1	2	27
		A61P - Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais.	1	2	58
	A23 – Alimentos ou produtos alimentícios; seu beneficiamento, não abrangido por outras classes.	A23L – Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas; seu preparo ou tratamento.	7	2	43
		A23J – Composição à base de proteínas para produtos alimentícios; preparação de proteínas para produtos alimentícios; composição de fosfatídeos para produtos alimentícios.	1	-	-
		A23C – Produto de laticínio, p. ex., leite, manteiga, queijo; substitutos do leite ou do queijo; produção dos mesmos.	-	-	2
		A23D – Óleos ou gorduras comestíveis.	-	-	1
		A23F – Café; chá; seus substitutos; manufatura, preparo, ou infusão dos mesmos.	-	-	8

Continua

		A23G – Cacau; produtos de cacau; confeitos; goma de mascar; sorvetes; preparações dos mesmos.	-	-	2
		A23K – Produtos alimentícios especialmente adaptados para animais; métodos especialmente adaptados para a produção dos mesmos.	-	-	4
	A24 – Tabaco; charutos; cigarros; artigos para fumantes.	A24B – Manufatura ou preparo de tabaco para fumar ou mascar; tabaco; rapé.	-	-	1
	A47 – Móveis; artigos ou aparelhos domésticos; moinhos de café; moinhos de especiaria; aspiradores em geral.	A47J – Equipamento de cozinha; moedores de café; moedores de especiarias; aparelhos para fazer bebidas.	1	-	-
	A01 – Agricultura; silvicultura; pecuária; caça; captura em armadilhas; pesca.	A01H – Novas plantas ou processos para obtenção das mesmas; reprodução de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos.	1	-	1
		A01G – Horticultura; cultivo de vegetais, flores, arroz, frutas, vinhas, lúpulos ou algas; silvicultura; irrigação.	1	-	2
		A01N – Conservação de corpos de seres humanos ou animais ou plantas ou partes dos mesmos; biocidas; repelentes ou atrativos de pestes; reguladores do crescimento de plantas.	-	-	3
		A01P – Atividade de compostos químicos ou preparações biocidas, repelentes ou atrativos de pestes ou reguladores do crescimento de plantas.	-	-	1
B – Operações de processamento; transporte.	B01 – Processos ou aparelhos físicos ou químicos em geral.	B01J – Processos químicos ou físicos; aparelhos pertinentes aos mesmos.	1	-	-
		B01D – Separação.	2	-	6
C – Química; metalurgia.	C02 – Tratamento de água, de águas residuais, de esgotos ou de lamas e lodos.	C02F – Tratamento de água, de águas residuais, de esgoto ou de lamas e lodos.	1		
		C07 – Química orgânica.			
		C07C – Compostos acíclicos ou carbonílicos.	2	-	2
		C07H – Açúcares; seus derivados; nucleosídeos; nucleotídeos; ácidos nucleicos.	-	-	1
	C07D – Compostos heterocíclicos.	-	-	1	
	C07G – Compostos de constituição desconhecida.	-	-	1	

Continua

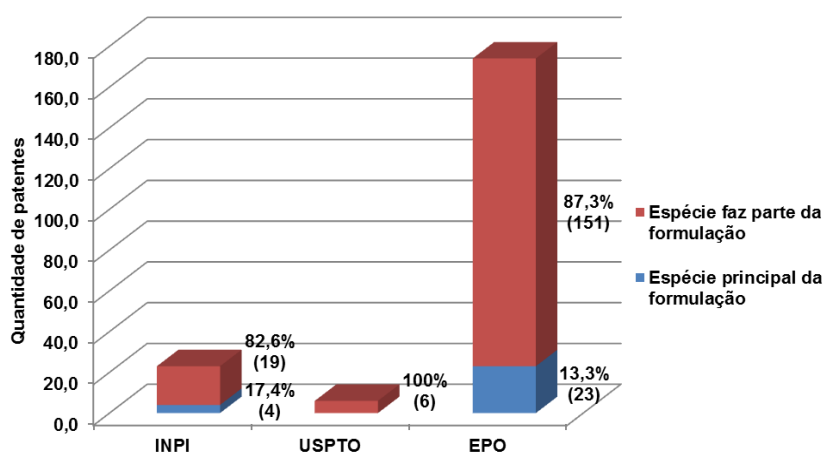
C09 – Corantes; tintas; polidores; resinas naturais; adesivos; composições não abrangidos em outros locais; aplicações de materiais não abrangidos em outros locais.	C09B – Corantes orgânicos ou compostos estreitamente relacionados à produção de corantes; mordentes; lacas.	-	-	1
C11 – Óleos animais ou vegetais, gorduras, substâncias graxas ou ceras; ácidos graxos derivados dos mesmos.	C11B – Produção, refinação, ou preservação de óleos, substâncias graxas.	-	-	3
	C11C – Ácidos graxos derivados de gorduras, óleos ou ceras; velas; gorduras, óleos ou ácidos graxos resultantes da modificação química de gorduras, óleos, ácidos graxos obtidos dos mesmos.	-	-	1
	C11D – Composições de detergentes; uso de substâncias isoladas como detergentes; sabão ou fabricação do sabão; sabões de resina; recuperação do glicerol.	-	-	1
C12 – Bioquímica; cerveja; álcool; vinho; vinagre; microbiologia; enzimologia; engenharia genética ou de mutação.	C12G – Vinho; outras bebidas alcoólicas; sua preparação.	1	-	3
	C12J – Vinagre, sua preparação.	-	-	2
	C12N – Micro-organismos ou enzimas; suas composições.	-	-	5
	C12P – Processo de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica.	-	-	4
	C12R – Esquema de indexação associado às subclasses C12C-C12Q, relativo a micro-organismos.	-	-	2
C23 – Revestimento de materiais metálicos; revestimento de materiais com materiais metálicos; Tratamento químico de superfícies; Tratamento de difusão de materiais metálicos; revestimento por evaporação a vácuo, por pulverização catódica, por implantação de íons ou por deposição química em fase de vapor, em geral; inibição da corrosão de materiais metálicos ou incrustação em geral.	C23F – Remoção não-mecânica de materiais metálicos das superfícies.	1	-	-

Continua

D – Têxteis; papel.	D21 – Fabricação do papel; produção de celulose.	D21C – Produção de celulose por eliminação de substâncias não celulósicas de materiais contendo celulose; regeneração de licores de polpa; aparelhos para esse fim.	1	-	-
		D21H – Composições de polpa; sua preparação não abrangida pelas subclasses D21C, D21D; impregnação ou revestimento do papel; tratamento do papel acabado não abrangido pela classe B31 ou subclasse D21G; papel não incluído em outro local.	-	-	1
G – Física	G01 – Medição; teste.	G01N – Investigação ou análise dos materiais pela determinação de suas propriedades químicas ou físicas.	1	-	-

Grande parte das patentes encontradas nessa busca se referia às formulações desenvolvidas a partir da espécie com diferentes finalidades, dentre elas, cosmética, alimentar e medicinal. Na Figura 7 observa-se na maioria das formulações, que *Passiflora* é apenas um dos ingredientes ativos da composição.

Figura 7 - Número de patentes registradas referente à busca com as palavras-chave *passiflora* ou maracuja, no INPI, *passiflora* ou *passion flower*, no EPO, no título ou resumo, distribuído segundo a participação da espécie na formulação.



Com relação à busca avançada de artigos nas diferentes bases de dados pesquisadas, o maior número de publicações (332) foi encontrado na base de dados *Scielo*, e quase metade desse valor (143) registrado no *ScienceDirect* (Figura 8), o que nos permite inferir a elevada quantidade de publicações para o gênero, com relação ao número de patentes registradas no INPI para o mesmo período. O mesmo é percebido com o alto e crescente número de trabalhos de pós-graduação

nas instituições de pesquisa no país, tendo como objeto de estudo os representantes da família Passifloraceae (Figura 9).

Figura 8 - Número de artigos publicados referente à busca avançada com o termo *Passiflora* no título ou resumo, para o período de 1997 a agosto de 2013, segundo o banco de dados pesquisado.

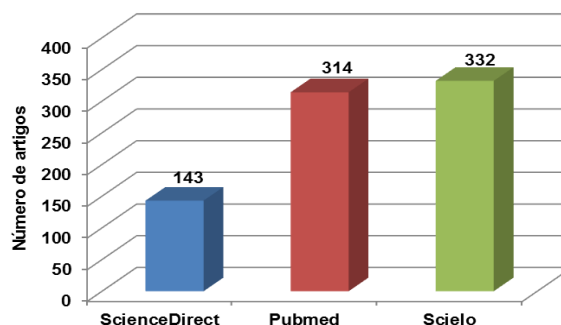
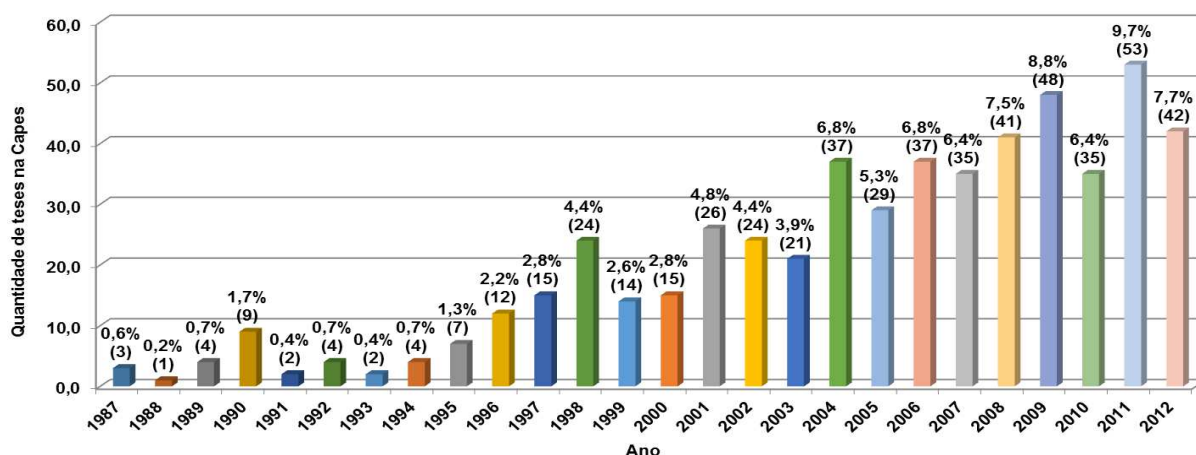


Figura 9 - Número de teses/dissertações publicadas no Banco de Teses da CAPES referente à busca com o termo *Passiflora* no assunto, segundo o banco de dados pesquisado.



A prospecção acerca de identificar qual era a espécie do gênero, objeto de estudo nas patentes e publicações, encontra-se apresentadas na Tabela 5. Apenas para *P. edulis* e *P. incarnata* observou-se dados em todas as bases pesquisadas. A partir desse levantamento foi verificado que muitas das nomenclaturas botânicas estavam escritas de forma errônea, mas ainda assim foi possível encontrar a nomenclatura correta no site do Tropicos[®] e o nome científico correto compõe a Tabela 5, sendo na sua legenda discriminado os nomes errôneos encontrados. Em outros casos não foi possível identificar a espécie de *Passiflora* que o estudo se referia, pois não foi encontrada nenhuma semelhança da nomenclatura relatada no

estudo com as espécies existentes para o gênero descritas no Tropicos[®]. Essas espécies são *P. adularia*; *P. cacaoensis*; *P. garaynglia*; *P. incense*; *P. longifilamentosa*; *P. murcielago*; *P. oleracea*; *P. orientalis*; *P. sidaefolia*; *P. somniferum*; *P. sapphire*; *P. star of Clevedon*; *P. st. Rule*; *P. sunbrust*, sendo estas não contabilizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Número de patentes registradas nos diferentes bancos de dados referente à busca com as palavras-chave: *passiflora* ou *passion flower*, no USPTO e EPO; *Passiflora* ou *maracuja*, no INPI, *Passiflora* na CAPES e no *Scifinder*, no título ou resumo.

Espécie	CAPES	SciFinder	INPI	USPTO	EPO
<i>P. alata</i>	87	33	2	-	1
<i>P. actinia</i>	8	6	-	-	-
<i>P. adenopoda*</i>	-	2	-	-	-
<i>P. allantophylla</i>	-	1	-	-	-
<i>P. amethystina</i>	9	2	-	-	-
<i>P. ambigua</i>	-	1	-	-	-
<i>P. ampullacea</i>	-	1	-	-	-
<i>P. antioquiensis</i>	-	-	-	-	1
<i>P. anfracta</i>	-	1	-	-	-
<i>P. apetala</i>	-	1	-	-	-
<i>P. auriculata</i>	-	1	-	-	-
<i>P. bahiensis</i>	2	1	-	-	-
<i>P. biflora</i>	-	5	-	-	-
<i>P. boenderi</i>	-	1	-	-	-
<i>P. bryonioides*</i>	-	2	-	-	-
<i>P. capsularis</i>	11	5	-	-	-
<i>P. caerulea</i>	14	11	-	-	9
<i>P. cerradensis*</i>	1	-	-	-	-
<i>P. cincinnata</i>	39	2	-	-	-
<i>P. citrina</i>	1	1	-	-	-
<i>P. coactilis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. coccinea</i>	14	4	-	-	-
<i>P. cochinchinensis</i>	-	-	-	-	1
<i>P. colinvauxii</i>	-	2	-	-	-
<i>P. konzattiana</i>	-	1	-	-	-
<i>P. coriacea*</i>	1	3	-	-	-
<i>P. cuneata</i>	-	2	-	-	-
<i>P. cuprea</i>	-	1	-	-	-
<i>P. cyanea</i>	-	1	-	-	-
<i>P. decaisneana</i>	-	1	-	-	-
<i>P. discophora</i>	-	1	-	-	-
<i>P. edulis</i>	403	164	5	4	25

Continua

<i>P. edmundoi</i>	2	-	-	-	-
<i>P. elegans</i>	4	1	-	-	-
<i>P. filipes</i>	-	1	-	-	-
<i>P. foetida</i>	9	17	-	-	3
<i>P. galbana</i>	3	1	-	-	-
<i>P. guatemalensis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. gibertii</i>	27	3	-	-	-
<i>P. gilbertiana</i>	-	1	-	-	-
<i>P. glandulosa</i>	1	-	-	-	-
<i>P. gracilis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. haematostigma</i>	2	-	-	-	-
<i>P. hahnii</i>	-	1	-	-	-
<i>P. herbertiana*</i>	-	1	-	-	-
<i>P. helleri</i>	-	1	-	-	-
<i>P. holosericea</i>	-	1	-	-	-
<i>P. incarnata</i>	14	86	1	3	54
<i>P. indecora</i>	-	1	-	-	-
<i>P. jorullensis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. juliana</i>	-	1	-	-	-
<i>P. kermesina</i>	2	-	-	-	-
<i>P. kalbreyeri</i>	-	1	-	-	-
<i>P. kawensis*</i>	-	1	-	-	-
<i>P. laurifolia</i>	6	1	-	-	1
<i>P. ligularis</i>	4	4	-	-	2
<i>P. lobata</i>	-	1	-	-	-
<i>P. lutea</i>	-	2	-	-	-
<i>P. luetzelburgii</i>	2	-	-	-	-
<i>P. maliformis</i>	3	3	-	-	-
<i>P. macrocarpa</i>	1	-	-	-	-
<i>P. macrophylla</i>	-	1	-	-	-
<i>P. malacophylla</i>	2	-	-	-	-
<i>P. mansii</i>	2	-	-	-	-
<i>P. manicata</i>	-	3	-	-	-
<i>P. mayarum</i>	-	1	-	-	-
<i>P. menispermifolia</i>	-	2	-	-	-
<i>P. misera</i>	10	2	-	-	-
<i>P. micropetala</i>	1	-	-	-	-
<i>P. miersii</i>	2	-	-	-	-
<i>P. morifolia</i>	7	2	-	-	-
<i>P. mollissima</i>	1	5	-	-	1
<i>P. mucronata</i>	8	2	-	-	-
<i>P. mucugeana*</i>	1	-	-	-	-

Continua

<i>P. murucuja</i>	-	2	-	-	-
<i>P. multiflora</i>	-	1	-	-	-
<i>P. naviculata</i>	-	1	-	-	-
<i>P. nitida</i>	20	1	-	-	-
<i>P. obtusifolia</i>	-	1	-	-	-
<i>P. oerstedii*</i>	-	2	-	-	-
<i>P. organensis</i>	5	1	-	-	-
<i>P. odontophylla</i>	2	-	-	-	-
<i>P. ovalis</i>	1	-	-	-	-
<i>P. palmeri</i>	3	2	-	-	1
<i>P. pavonis</i>	-	2	-	-	-
<i>P. platyloba</i>	-	2	-	-	-
<i>P. penduliflora</i>	-	1	-	-	-
<i>P. perfoliata</i>	-	4	-	-	-
<i>P. pendens</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pentagona</i>	1	-	-	-	-
<i>P. perpera</i>	-	-	-	-	1
<i>P. phoenicia</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pinnatistipula</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pittieri</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pilosicorona</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pulchella</i>	-	2	-	-	-
<i>P. punctata</i>	-	1	-	-	-
<i>P. pohlii*</i>	6	-	-	-	-
<i>P. quadrangularis</i>	5	11	-	-	2
<i>P. quadrifaria</i>	-	1	-	-	-
<i>P. quinquangularis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. racemosa</i>	-	2	-	-	1
<i>P. recurva</i>	1	-	-	-	-
<i>P. rubra</i>	2	1	-	-	-
<i>P. rovirosae</i>	-	1	-	-	-
<i>P. rufa</i>	-	1	-	-	-
<i>P. rhamnifolia</i>	2	-	-	-	-
<i>P. sanguinolenta</i>	1	2	-	-	-
<i>P. saxicola</i>	1	-	-	-	-
<i>P. setacea</i>	23	1	-	-	-
<i>P. serratodigitata</i>	3	-	-	-	-
<i>P. speciosa</i>	1	1	-	-	-
<i>P. suberosa</i>	26	5	-	-	-
<i>P. sexflora</i>	-	3	-	-	-
<i>P. serratifolia</i>	-	2	-	-	-
<i>P. sidiifolia*</i>	-	1	-	-	-

Continua

<i>P. subpeltata</i>	-	3	-	-	-
<i>P. tenuifila</i>	1	3	-	-	-
<i>P. tricuspis</i>	1	2	-	-	-
<i>P. truncata</i>	1	-	-	-	-
<i>P. trintae</i>	1	-	-	-	-
<i>P. talamancensis</i>	-	1	-	-	-
<i>P. tetrandra</i> *	-	2	-	-	-
<i>P. trifasciata</i>	-	2	-	-	-
<i>P. trinervia</i>	-	1	-	-	-
<i>P. tripartita</i>	-	3	-	-	-
<i>P. trisecta</i>	-	1	-	-	-
<i>P. tryphostemmatoides</i>	-	1	-	-	-
<i>P. tuberosa</i>	-	1	-	-	-
<i>P. tulae</i>	1	-	-	-	-
<i>P. villosa</i> *	3	-	-	-	-
<i>P. vespertilio</i> *	1	-	-	-	-
<i>P. vitifolia</i>	4	2	-	-	-
<i>P. violacea</i>	-	2	-	-	-
<i>P. urbaniana</i>	-	1	-	-	-
<i>P. xiikzodz</i>	-	1	-	-	-
<i>P. watsoniana</i>	3	-	-	-	-
<i>P. warmingii</i>	-	5	-	-	-
<i>P. wilsonii</i>	-	-	-	-	7
<i>P. yucatanensis</i> *	-	1	-	-	-
<i>Passiflora</i> spp	-	3	12	2	70

Todas as nomenclaturas botânicas foram verificadas no site do Tropicos[®]. * Nomenclatura botânica escrita erroneamente na publicação ou patente: *P. adenodopa* (artigo); *P. bryoniodes* (artigo); *P. cerradense* (CAPES e patente); *P. coriacea* (CAPES e artigos); *P. kewensis* (artigo); *P. murcugeana* (CAPES); *P. oerstidii* (artigo); *P. pohii* (CAPES); *P. sidifolia* (artigo); *P. tetrandra* (artigo); *P. vilosa* (CAPES); *P. vespertilio* (CAPES); *P. yucatanensis* (artigo).

Diante da prospecção realizada, percebe-se o número relevante de publicações e patentes nas mais diferentes áreas de interesse comercial pelo mundo. Vale destacar o elevado número de teses e dissertações desenvolvidas nos programas de pós-graduação do país abrangendo os representantes da família Passifloriaceae. No entanto, o número de patentes registradas no INPI não reflete a capacidade institucional e científica instalada no Brasil.

2.3. Composição química

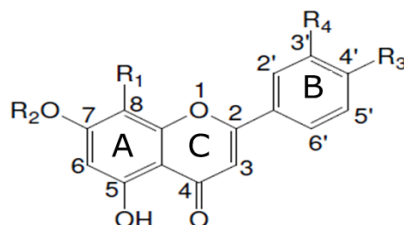
Considerando o número de espécies do gênero *Passiflora*, poucas delas foram estudadas quimicamente até o momento. Apesar disto, há uma quantidade considerável de substâncias identificadas, que pertencem às classes dos flavonoides, alcaloides β -carbolínicos, triterpenos de esqueleto cicloartano, glicosídeos esteroidais, glicosídeos cianogênicos, saponinas triterpenoidicas, cumarinas e derivados, ácidos graxos (linoleico e linolênico), maltol e etilmaltol, fitosteróis (estigmasterol) e óleos voláteis^{17,39}.

Os flavonoides compõem a principal categoria presente nas espécies de *Passiflora*, podendo-se destacar a importância química dos mesmos como possíveis agentes farmacológicos e, também, considerá-los como potenciais marcadores quimiotaxonômicos.

2.3.1. Flavonoides do gênero *Passiflora*

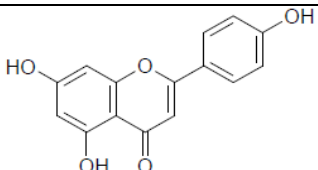
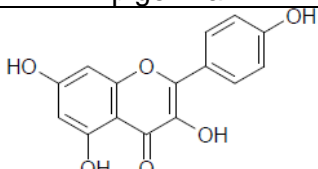
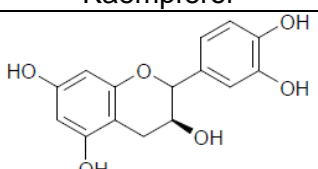
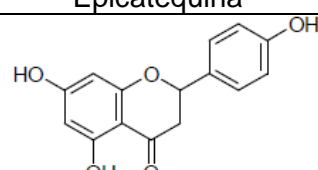
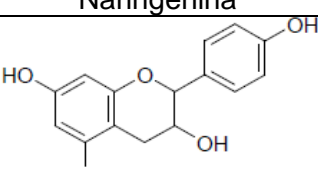
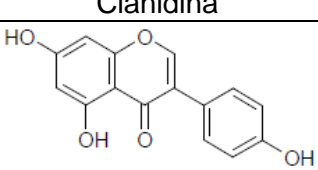
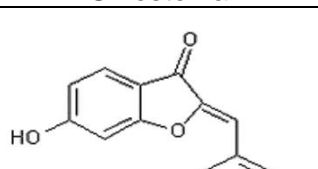
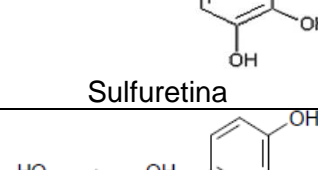
Os flavonoides apresentam um esqueleto carbônico com 15 átomos (C₁₅), que inclui dois anéis aromáticos ligados entre si por um fragmento de três carbonos (Figura 10). Esse esqueleto resulta de duas rotas biossintéticas distintas, a do ácido chiquímico proveniente da fenilalanina, que é o precursor do ácido cinâmico, responsável pela síntese do anel aromático (B) e a ponte de três carbonos, e a do acetato, via malonato, responsável pela formação do outro anel aromático (A)^{40,41}.

Figura 10 - Estrutura básica dos flavonoides.



Os flavonoides podem ser agrupados em sete subgrupos principais: flavonas, flavonóis, catequinas ou flavanóis, flavanonas, antocianidinas, isoflavonas, auronas e chalconas (Tabela 6). Das principais classes, os flavonóis glicosilados predominam em frutas e verduras⁴².

Tabela 6 – Subgrupos principais dos flavonoides e exemplos.

Subgrupo	Estrutura	Exemplo
Flavona	 <p>Apigenina</p>	Apigenina Luteolina Crisina
Flavonol	 <p>Kaempferol</p>	Kaempferol Quercetina Miricetina Morina
Flavanol ou Catequina	 <p>Epicatequina</p>	Epicatequina Galocatequina
Flavanona	 <p>Naringenina</p>	Naringenina Hesperitina Eriodictiol
Antocianidina	 <p>Cianidina</p>	Cianidina Pelargonidina
Isoflavona	 <p>Genisteína</p>	Genisteína Daidzeína
Aurona	 <p>Sulfuretina</p>	Sulfuretina Auresina
Chalcona	 <p>Chalcona</p>	Chalcona Buteína Ocanina

Essas várias classes de flavonoides são possíveis de serem encontradas graças ao nível diferenciado de oxidação do anel carbônico, caracterizadas de acordo com o número de hidroxilas que podem ser substituídos, além da possibilidade de glicosilação desses grupos⁴³.

Os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antiespasmódica, antidiarreica, hepatoprotetora, antifúngica, analgésica, inibição de enzimas (respiração mitocondrial), inibição da agregação plaquetária, vasodilatadora, antialérgica. Os heterosídeos flavonoídicos possuem maior absorção pelo trato intestinal, quando comparados com as agliconas, como também se destacam por possuírem algumas atividades mais potentes do que as agliconas⁴⁴⁻⁴⁹.

Os primeiros relatos sobre os flavonoides em espécies de *Passiflora* são da década de 60, quando foi estudada principalmente a espécie *P. incarnata*³⁹.

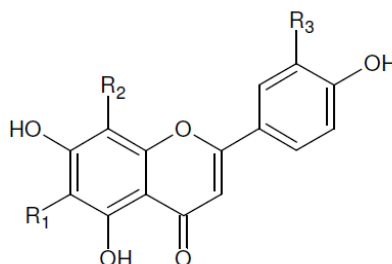
No gênero *Passiflora* os flavonoides apresentam-se normalmente na forma O- e C-glicosilados e muito poucos são agliconas livres, o que é uma característica deste gênero.

Os flavonoides C-glicosilados parecem constituir a melhor classe de substâncias químicas utilizadas como referência para o controle de qualidade das espécies de *Passiflora*, pois são os constituintes de distribuição mais homogênea no gênero e têm sido sugeridos como possíveis constituintes responsáveis pelas suas atividades farmacológicas^{17,50,51}. As substâncias ou classes de substâncias químicas presentes na matéria-prima vegetal, que possuem preferencialmente correlação com o efeito terapêutico, e são utilizadas como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico, são denominadas de marcadores¹⁰.

Os flavonoides C-glicosilados encontrados em espécies de *Passiflora* geralmente ocorrem como isômeros (vitexina e isovitexina, orientina e isoorientina, shaftosídeo e isoshaftosídeo) e uma maneira de diferenciá-los é utilizando técnicas CLAE-DIC/EM para produzir pseudos espectros EM/EM que fornecem dados de fragmentação incluindo medidas exatas de massa para diferenciar os pares. Um estudo realizado por Pereira et al. (2005) demonstrou a eficiente diferenciação dos isômeros vitexina e isovitexina, orientina e isoorientina do extrato hidroetanólico (2:1, v/v) de folhas de *P. alata*, *P. caerulea*, *P. edulis* e *P. incarnata* por CLAE-DIC/EM⁵².

Do gênero *Passiflora*, os flavonoides C- glicosilados de maior ocorrência são isoorientina, isovitexina, orientina, vitexina, isoschaftosídeo e schaftosídeo (Tabela 7). A grande maioria dos estudos sobre espécies de *Passiflora* foram realizadas em folhas e partes áreas.

Tabela 7 - Estrutura química dos flavonoides C-glicosilados relatados em espécies de *Passiflora*.



Flavonoide C-glicosilado	Aglicona	R ₁	R ₂	R ₃
Isovitexina	apigenina	glu	H	H
Vitexina	apigenina	H	glu	H
Isoorientina	luteolina	glu	H	OH
Orientina	luteolina	H	glu	OH
Isoschaftosídeo	apigenina	glu	ara	H
Schaftosídeo	apigenina	ara	glu	H

ara = arabinose; glu = glicose

Atualmente, a técnica mais utilizada, e uma das principais, para a detecção e quantificação de flavonoides de *Passiflora* é a CLAE usando coluna de fase reversa. Até 1978 haviam sido publicados poucos trabalhos detalhando a análise de flavonoides de *Passiflora* por CLAE e a sua utilização começou a crescer a partir de meados da década de 80, por ser uma ótima técnica para análise de substâncias não voláteis^{39,53}.

O acoplamento de diferentes técnicas instrumentais constituindo os instrumentos hifenados ou técnicas de segunda ordem, tais como a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM), ou detecção na região do UV-Vis através de um sistema de arranjo de diodos (CLAE-DAD) vem sendo cada vez mais aplicado na análise qualitativa e quantitativa de flavonoides de *Passiflora*, por permitir a obtenção de informações adicionais provenientes da correlação de diferentes respostas⁵⁴.

A caracterização química e quantificação de flavonoides C-glicosilados do extrato hidroetanólico 50% (v/v) de *P. bahiensis*, *P. coccinea*, *P. quadrangularis*, *P.*

sidifolia, *P. vitifolia* e glicosídeos cianogênicos no extrato de *P. quadrangularis* foram realizados por CLAE-DAD-ESI-EM/EM¹⁶.

O extrato metanólico das folhas de *P. alata*, *P. edulis*, *P. caerulea* e *P. incarnata* foram analisados por CCDA e CLAE-DAD/UV. O estudo demonstrou que estas técnicas são importantes ferramentas para a identificação do material vegetal, através do uso de flavonoides como marcadores. Além disso, foram identificados e quantificados os flavonoides vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina em todas as espécies. O flavonoide 2''-O-ramnosil-vitexina foi identificado na *P. alata*⁵⁵.

O processo de extração de flavonoides C-glicosilados em espécies de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* foi realizado com dióxido de carbono supercrítico, visando a otimização do processo, isto é, obtenção de maior rendimento, sendo verificado maior rendimento utilizando CO₂ - metanol 10% a 60° C. As análises por CLAE-DAD detectaram a presença de orientina, rutina e vitexina nos extratos⁵⁶.

Através de CLAE-EM foi identificado na espécie de *P. incarnata* os flavonoides isovitexina, isoschaftosídeo, isoorientina, 2''-O-β-glicopiranosil-isoorientina, 2''-O-β-glicopiranosil-isovitexina, orientina, schaftosídeo, swetisina, vitexina e vicenina-2⁵⁷.

Os extratos hidroetanólico 70% e aquoso de *P. incarnata* foram analisados por CLAE-UV/Vis, os quais demonstraram a presença dos flavonoides glicosilados hiperosídeo, vicenina e vitexina⁵⁸.

Em outro estudo com as folhas de *P. edulis*, foram obtidas novas flavonas C-glicosiladas a partir do extrato metanol:água (1:1, v/v). As análises por CLAE-DAD-EM/EM mostrou a presença de 15 flavonoides derivados da apigenina e luteolina⁵⁹.

As análises por CLAE-UV/DAD do extrato aquoso das cascas de *P. edulis* f. *edulis* demonstrou a presença dos flavonoides 3-O-glicosil-quercetina, 3-O-glicosil-kaempferol e 8-C-digitoxosil-luteolina⁶⁰.

A identificação de isoorientina e isovitexina presentes na polpa de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi realizada por CLAE-EM/EM e um método foi desenvolvido para a quantificação de isoorientina e flavonoides totais por CLAE-UV/DAD⁶¹.

O estudo das folhas de *P. foetida* levou a identificação por CLAE-UV dos flavonoides isovitexina e vitexina. Deste modo, a vitexina foi considerada o principal marcador de qualidade da espécie⁶².

O estudo com as folhas de *P. quadrangularis* coletadas no período pré-floração, extraídas com etanol 70% e analisadas por CLAE-UV, demonstrou a

presença de isoorientina, isovitexina, orientina e vitexina. Esse estudo também demonstrou a isoorientina como o flavonoide mais abundante, seguido de isovitexina, enquanto que orientina e vitexina apresentaram baixos níveis de detecção⁶³.

De um estudo realizado com o extrato metanólico, fração aquosa e frações obtidas por cromatografia com óxido de alumínio das folhas de *P. actinia* foi identificado por CLAE o flavonoide isovitexina⁶⁴. Em outro estudo, a isovitexina e traços de vitexina foram detectadas por CLAE-DAD nas frações ativas e tintura (0,27 mg/mL de isovitexina) de *P. actinia*⁶⁵.

A avaliação da qualidade das folhas e extratos fluidos de *P. alata* foi realizada por espectrofotometria UV-Vis (método da Farmacopeia Helvética) e CLAE, comparando as folhas de *P. alata* e *P. incarnata*. Foi verificada a presença de isovitexina (1,137g%) e traços de vitexina, e foi demonstrado que as duas substâncias não são majoritárias na fração flavonoídica da espécie⁶⁶.

Os estudos têm demonstrado que o conteúdo de flavonoides está sujeito a variações que pode ser devido à época da colheita, ao local do cultivo, metodologia de análise empregada e a degradação por fungos e bactérias.

O conteúdo de flavonoides na espécie *P. incarnata* foi verificado ser maior nos períodos que antecedem a floração do vegetal e diminuído rapidamente durante o período de estocagem. O conteúdo total de flavonoides expresso em % de isovitexina foi maior nas folhas do que em outras partes da planta⁶⁷.

Por meio de CLAE-EM/EM a determinação das substâncias químicas presentes no extrato metanólico das cascas de *P. edulis* mostrou a presença predominante de luteolina (20 µg/g). Além disso, o estudo demonstrou que o extrato metanólico (10 e 50 mg/kg) e luteolina (50 mg/kg) são capazes de reduzir a pressão sistólica em ratos hipertensos⁶⁸.

2.3.1.1. Métodos extrativos de flavonoides de *Passiflora*

Os flavonoides integram uma grande família de substâncias com estruturas e propriedades físico-químicas distintas. A polaridade dos flavonoides pode variar muito, apresentando-se desde substâncias polares, tais como os flavonoides glicosilados, até substâncias apolares, como os flavonoides esterificados, metilados ou não substituídos. Sendo assim, a escolha do solvente extrator é um fator

importante a ser considerado durante o processo de extração de drogas vegetais. Pois, quanto mais polar for o solvente extrator maior será a sua constante dielétrica e, conseqüentemente, substâncias ionizáveis e altamente polares serão dissolvidos e extraídos mais facilmente. O inverso também acontece, solventes apolares solubilizam substâncias com constantes dielétricas baixas. Desta forma, a escolha do solvente deve considerar as substâncias químicas de interesse e o objetivo de extração.

Para a extração de flavonoides em espécies de *Passiflora*, diversos estudos descrevem as condições de extração e técnicas de extração. Devido a estrutura e a diversidade dessas substâncias, não há um protocolo único para extraí-las. As técnicas de extração mais empregadas são soxhlet, extração sob refluxo, maceração, percolação e infusão.

Os solventes e mistura de solventes que têm sido empregados na obtenção de extratos de *Passiflora* em estudos de isolamento, identificação e quantificação de flavonoides estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Solventes e mistura de solventes na extração de flavonoides de *Passiflora*.

Solvente de extração	Ref.	Solvente de extração	Ref.
Água	69 - 73	Etanol:água (9:1, v/v)	87
Etanol	61, 74, 75	Etanol:água (9.5:0.5, v/v)	88
Metanol	61, 76 - 78	Metanol:água (4:6, v/v)	89,90
Etanol:água (4:6, v/v)	79-81	Metanol:água (5:5, v/v)	59, 91
Etanol:água (4.5:5.5, v/v)	64	Metanol:água (6:4, v/v)	61, 84
Etanol:água (5:5, v/v)	16, 82	Metanol:água (7:3, v/v)	92, 93
Etanol:água (6:4, v/v)	61, 83 - 85	Metanol:água (8:2, v/v)	94
Etanol:água (7:3, v/v)	58	Metanol:água (8.5:1.5, v/v)	95, 96
Etanol:água (8:2, v/v)	86		

Ref. = referências

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Extração acelerada com solventes (ASE)

A extração de substâncias químicas de drogas vegetais é um processo onde ocorrem diversos fenômenos, tais como: contato da droga vegetal com o solvente extrator fazendo com que o solvente penetre no interior da célula vegetal induzindo um momento dipolar nas moléculas das substâncias a extrair e associação forte às moléculas do solvente; solubilização dos constituintes químicos nesses solventes que estão dentro das células e transferência de massa dos constituintes químicos presentes na droga vegetal para o solvente por difusão ou processo osmótico^{97,98}.

Há uma grande variedade de técnicas de extração convencionais e modernas descritas na literatura. As técnicas de extração convencionais ou clássicas são a infusão, decocção, maceração, percolação e extração por Soxhlet. Atualmente, as técnicas mais modernas como a extração acelerada com solventes (ASE), extração em fluido supercrítico (SFE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração por micro-ondas focalizada (FMAE), turbo extração, extração assistida por ultrassom e maceração dinâmica tem sido amplamente estudadas com o objetivo de tornar os processos extrativos mais rápidos, utilizando menores quantidades de solventes, diminuindo a degradação das substâncias ativas e economia de tempo. Dentre as técnicas de extração citadas, a extração acelerada com solventes (ASE) foi a técnica utilizada neste trabalho para a extração dos constituintes químicos, principalmente flavonoides, presentes nas folhas de diferentes espécies de *Passiflora*.

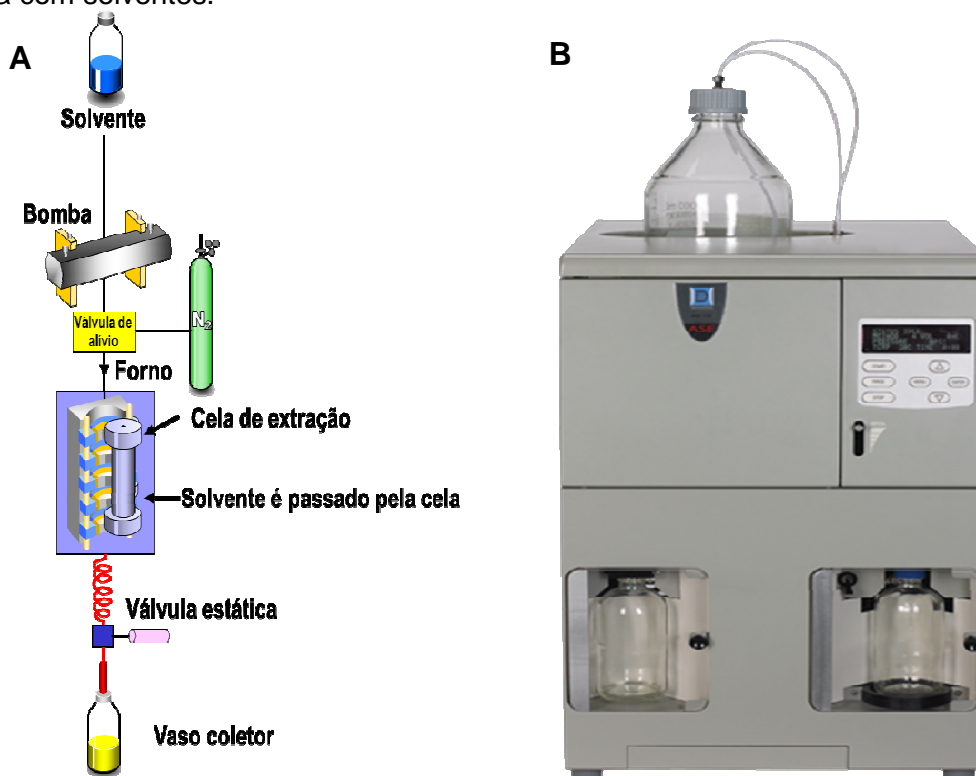
A extração acelerada com solventes (do inglês, *Accelerated Solvent Extraction* - ASE) é uma técnica totalmente automatizada que utiliza solventes convencionais para extrair rapidamente amostras sólidas e semi-sólidas⁹⁹. Desde o desenvolvimento do primeiro aparelho de extração acelerada com solventes, em 1995, poucas referências podem ser encontradas quanto à aplicação da mesma em extração de plantas¹⁰⁰.

Esta técnica emprega temperaturas que geralmente excedem o ponto de ebulição dos solventes, utilizando pressão para manter os solventes sob a forma líquida durante o processo de extração. Devido às altas pressões e temperaturas do processo há um incremento na capacidade de solubilização, na difusividade e na

cinética de extração, com diminuição dos tempos de extração e nos volumes de solventes^{99,101}.

No processo de extração acelerado com solventes (ASE), o solvente extrator é bombeado para dentro da cela de extração contendo a amostra, a qual é mantida sob aquecimento e pressão (1500 a 2000 psi) durante todo o tempo de extração. O extrato é liberado no vaso coletor sem que o solvente esteja saturado. A quantidade de ciclos e o tempo de extração em cada ciclo (tempo estático) podem ser fixados até a remoção completa das substâncias extraíveis da droga vegetal (Figura 11).

Figura 11 - (A) Etapas de extração com ASE e (B) Equipamento de extração acelerada com solventes.



Fonte –<http://www.directindustry.es/prod/dionex/extractores-por-solvente-28284-1124199.html>

O solvente extrator é um dos fatores que mais influenciam no processo de extração. Eles devem ser capazes de dissolver os constituintes químicos de interesse da planta. Os solventes mais empregados na extração acelerada com solventes são o metanol, etanol, acetona, água, hexano e diclorometano. Entre estes solventes, o metanol, etanol e água apresentam a maior capacidade de extrair substâncias fenólicas.

As principais vantagens da extração acelerada com solventes incluem exaustão da amostra, conservação de substâncias termolábeis, automização,

redução de tempo de extração e de solvente. As desvantagens da técnica são o alto investimento inicial e a necessidade de um tratamento das amostras para as análises cromatográficas.

Seis flavonoides C-glicosilados (isoschaftosídeo, isoorientina, isovitexina, orientina, schaftosídeo e vitexina) foram quantificados em 115 espécies de *Passiflora*. Os extratos das espécies de *Passiflora* foram preparados usando a técnica de extração acelerada com solventes (ASE), nas seguintes condições: 80% metanol, 40 °C, 3 ciclos e 10 min de tempo estático. O estudo demonstrou a maior concentração de isoschaftosídeo, schaftosídeo e isoorientina na espécie *P. filipes* Benth, isovitexina na espécie *P. manicata* (Juss.) Pers, orientina na *P. laurifolia* L. e vitexina na espécie *P. holosericea* L.⁹⁴.

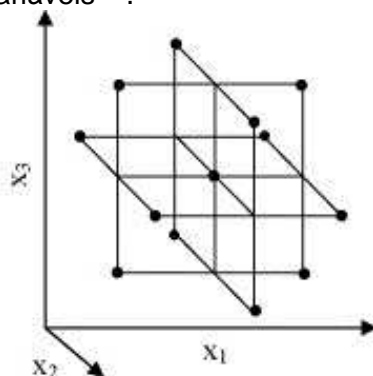
Um estudo sobre a composição química da semente de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi realizado empregando a técnica de extração acelerada por solvente para a preparação dos extratos usando éter de petróleo, 80 °C, 5 ciclos de extração e 7 min de tempo estático. As principais substâncias encontradas foram ω -6 ácido linoleico, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, δ -5 avenasterol, α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol¹⁰².

3.2. Planejamento Box-Behnken

O planejamento Box-Behnken foi apresentado por Box e Behnken em 1960¹⁰³, sendo uma das mais conhecidas em metodologia de superfícies de resposta (MSR). Esse tipo de planejamento é amplamente utilizado na química, principalmente, em química analítica, na otimização de processos envolvendo fatores experimentais, a fim de estabelecer as melhores condições para a análise. Atualmente, alguns trabalhos¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ tem demonstrado que esse tipo de planejamento é uma excelente ferramenta que pode ser aplicada na otimização de condições de extração de constituintes químicos de plantas.

O Box-Behnken são planejamentos rotacionais onde cada variável apresenta 3 níveis e os pontos experimentais estão distribuídos de forma equidistantes do ponto central. Essa classe de planejamento foi gerada a partir de uma combinação entre planejamentos fatoriais fracionários de três níveis, e a distribuição espacial dos pontos experimentais pode ser representada como na Figura 12 para um planejamento com três variáveis¹⁰⁸.

Figura 12 - Distribuição espacial dos pontos experimentais de um planejamento Box-Behnken para otimização de 3 variáveis¹⁰⁸.



As principais características desse modelo de planejamento experimental incluem:

- 1 - Requer um número de experimentos de acordo com a fórmula $N = 2k(k-1) + PC$, onde k representa o número de variáveis e PC o número de pontos centrais.
- 2 - Cada fator apresenta somente 3 níveis (-1, 0, +1) com distribuição equidistantes entre cada nível.

Em comparação com um planejamento fatorial completo de 3 variáveis e 3 níveis com 27 experimentos, o Box-Behnken com apenas 13 experimentos demonstra ser mais econômico por reduzir o número de experimentos e eficiente por gerar menos coeficientes, uma vez que a eficiência de um desenho experimental é avaliada pela razão entre o número de coeficientes gerados pelo número de experimentos executados. Comparado a um planejamento Composto Central, um planejamento Box-Behnken com 3 variáveis gera 13 pontos experimentais e um total de 10 coeficientes, e embora o Composto Central gere o mesmo número de coeficientes, apresenta 15 pontos experimentais, reduzindo assim a eficiência relativa do sistema quando aplicada a razão coeficientes/número de experimentos^{108,109}.

Um planejamento Box-Behnken foi aplicado para obter as melhores condições experimentais na determinação de fenólicos na espécie *Sparganii rhizoma*, uma planta tradicionalmente utilizada na medicina japonesa para o tratamento da dismenorrea. Foi avaliada a influência de três variáveis independentes na determinação de fenólicos totais e várias substâncias fenólicas presentes na espécie. Para avaliar a eficiência de extração, foram elegidas as variáveis, proporção hidroetanólica (%), tempo de extração (min) e razão solvente/material

(mL/g). Os experimentos foram executados em temperatura ambiente para evitar a degradação de substâncias sensíveis a temperatura. Devido a diferentes comportamentos entre fenólicos totais e seis substâncias fenólicas, foram estabelecidas duas condições ótimas de extração. O método apresentou um rendimento de extração mais elevado que os métodos de referência normalmente empregados, apresentando-se como um método potencial para extração de fenólicos em plantas¹⁰⁷.

3.2.1. Otimização multiresposta

A otimização multiresposta é uma estratégia utilizada quando se pretende avaliar simultaneamente mais de uma variável de resposta fornecidas por um mesmo planejamento e encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. Nesse caso, se o número de variáveis significativas permite a visualização gráfica dos fatores ajustados, e se o número de respostas não é muito grande, as superfícies podem ser sobrepostas permitindo encontrar uma região experimental que possa satisfazer todas as respostas estudadas¹⁰⁸.

Um dos métodos mais utilizados para realizar a otimização multiresposta é a função de desejabilidade desenvolvido por Derringe. Este método permite encontrar condições que fornecem a resposta mais desejada, a qual é a combinação de múltiplas respostas dentre de limites previamente estabelecidos evitando que alguma delas fique fora dos limites. Basicamente, a função desejabilidade permite transformar múltiplos problemas em um único utilizando-se de equações matemáticas^{110, 111}.

A otimização multiresposta foi aplicada para otimização simultânea da resolução e tempo de análise por CLAE de sete flavonoides na espécie *Satureja sahendica* Bornm. Desse modo, foi aplicado um planejamento Composto Central como ferramenta para otimização. Os fatores avaliados foram porcentagem de metanol: ácido fosfórico:THF na fase móvel, vazão e temperatura. A condição ideal para a separação dos flavonoides foi obtida utilizando metanol:0,4% de ácido fosfórico:THF na fase móvel, vazão de 1 mL/min e 30 °C¹¹².

4 OBJETIVOS

4.1. Gerais

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um método de extração de substâncias fenólicas, principalmente flavonoides, em folhas de espécies de *Passiflora*, utilizando extração acelerada com solvente (ASE) empregando o planejamento de experimentos Box-Behnken. Além disso, pretende-se também desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a quantificação dos marcadores químicos orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina em extratos padronizados no ASE de espécies cultivadas de *Passiflora*.

4.2. Específicos

1. Determinar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais durante a otimização do método de extração no extrator acelerado com solventes (ASE);
2. Desenvolver e validar um método de perfil cromatográfico (*fingerprint*), utilizando CLAE-DAD, para caracterização química de espécies de *Passiflora alata* Curtis, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. cispnana*, *P. cincinnata* Mast., *P. galbana* Mast., *P. gibertii* N. E. Br., *P. maliformis* L., *P. malacophylla* Mast., *P. morifolia* Mast., *P. mucronata* Sessé & Moc., *P. quadrangularis* L., *P. racemosa* Brot., *P. setacea* DC., *P. suberosa* L., *P. vitifolia* Kunth e *P. tenuifila* Killip;
3. Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de espécies de *Passiflora* através do método do sequestro radical livre DPPH;
5. Investigar a atividade citotóxica em extratos de folhas de espécies de *Passiflora*;
6. Avaliar o potencial anticolinesterásico dos extratos obtidos de folhas das espécies de *Passiflora*.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Materiais e Equipamentos

O etanol utilizado no preparo dos extratos foi de grau analítico e da marca Quemis[®].

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau CLAE (Sigma-Aldrich[®], EUA), filtrados à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade.

O ácido fórmico 98-100% utilizado no preparo do fase móvel foi grau analítico (Emsure[®]).

Os padrões secundários utilizados na validação do método analítico foram orientina (Sigma[®], ≥ 95%), isoorientina (Sigma[®], ≥ 98%), vitexina (Fluka[®], ≥ 95%), isovitexina (Chromadex[®], 95,2%) e rutina tri-hidratada (HWI Analytik[®], 96,37%).

Para o teste de atividade inibitória da acetilcolinesterase foram utilizados o iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma[®], 97%), tampão fosfato 0,1 M (Sigma[®]), albumina sérica bovina (Sigma[®], ≥ 96%), 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB) (Sigma[®]), enzima acetilcolinesterase tipo VI-S obtida de *Electroparaus electricous* (Sigma[®]) e eserina (Sigma[®], ≥ 99%).

O Folin-Ciocalteu (Spectrum[®]), carbonato de sódio (Ecibra[®]) e ácido gálico (Haloquímica[®], ≥ 98,99%) foram utilizados no ensaio para a determinação dos fenólicos totais.

Para a determinação dos flavonoides totais foram utilizados a quercetina (Sigma-Aldrich[®], ≥ 95%), cloreto de alumínio (Riedel-de-Hain[®]) e hidróxido de sódio (Synth[®]).

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) utilizado no teste de atividade antioxidante foi da marca Sigma[®].

A água ultrapura utilizada na composição da fase móvel e no preparo das soluções para extração em fase sólida (SPE) foi obtida em um sistema NANOpure Diamond[™] (Barnstead[®], Dubuque, Iowa, EUA).

A padronização da granulometria dos pós foi feita em peneira 16 mesh, abertura de malha 1,00 mm (Bertel[®]).

Para a realização das extrações em fase sólida (SPE) foram utilizados cartuchos C₁₈ de 3,00 mL/200 mg de sorvente da marca Agilent SampliQ[®]. As

extrações em fase sólida foram realizadas com o auxílio de um manifold (Agilent Technologies®) acoplado a uma bomba de vácuo.

As folhas coletadas foram secas em estufa de circulação mecânica de ar, modelo 320, Fanem® a 40 °C.

As amostras vegetais secas foram pulverizadas em liquidificador comum (Philips Walita®, RI2034).

Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Büchi®).

A homogeneização das amostras foi feita em agitador Vórtex de tubos, microtubos e frascos (Arsec®).

As pesagens foram feitas em balança analítica (AND®, modelo HR 200).

Para o preparo das soluções, os volumes de diluentes e reagentes foram pipetados com pipetas automáticas 2-20 µL (Eppendorf®), 20-200 µL (HTL®), 100-1000 µL e 1000-5000 µL (Tedia Pet®).

Os extratos foram preparados no extrator acelerado com solventes ASE 100 (Dionex®, Sunnyvale, EUA).

As leituras das absorvâncias nas análises para a determinação de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro Varian®, modelo Cary 50 Conc.

As leituras das absorvâncias do teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foram feitas em um leitor de ELISA (Biotek®), modelo EL800.

Sistema cromatográfico:

Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Dionex®, modelo UltiMate 3000, composto por uma bomba quaternária com desgaseificador “on-line” a vácuo de quatro canais, tolerante a vazões de até 10 mL/min. Mecanismo de duplo pistão em série com deslocamento variável de 20 a 100 µL, auto-injetor e detector UV com arranjo de diodos. O equipamento foi gerenciado pelo *software* Chromeleon®.

5.2. Coleta e processamento de amostras vegetais

As folhas de espécies de *Passiflora* foram coletadas nos dias 11 e 12 de julho de 2011, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas/BA. O material vegetal constou de dezessete acessos de *Passiflora*, pertencentes às seguintes espécies: *P. alata* Curtis, *P.*

capsularis L., *P. cincinnata* Mast., *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana* Mast., *P. gibertii* N. E. Br., *P. maliformis* L., *P. malacophylla* Mast., *P. morifolia* Mast., *P. mucronata* Sessé & Moc., *P. quadrangularis* L., *P. racemosa* Brot., *P. setacea* DC., *P. suberosa* L., *P. vitifolia* Kunth e *P. tenuifila* Killip do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* (BGP) mantidos em telados e nos campos experimentais da Embrapa.

As amostras foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante por sete dias, a 30 °C. Após esse período, foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e devidamente identificadas.

O material vegetal seco foi pulverizado em liquidificador e a granulometria foi padronizada com tamiz de 16 mesh (1,00 mm de malha), obtendo-se as quantidades descritas na Tabela 9.

A droga vegetal de cada espécie do gênero *Passiflora* foi guardada em sacos plásticos fechados, protegida do calor excessivo, umidade e luz.

Tabela 9 - Quantidade de material vegetal seco e triturado.

Espécie	Massa (g)
<i>P. alata</i>	96,88
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	48,64
<i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	85,15
<i>P. cispnana</i>	9,26
<i>P. cincinnata</i>	37,04
<i>P. galbana</i>	11,68
<i>P. gibertii</i>	14,71
<i>P. maliformis</i>	34,68
<i>P. malacophylla</i>	30,60
<i>P. morifolia</i>	8,54
<i>P. mucronata</i>	13,12
<i>P. quadrangularis</i>	18,82
<i>P. racemosa</i>	9,90
<i>P. setacea</i>	35,56
<i>P. suberosa</i>	14,31
<i>P. vitifolia</i>	4,32
<i>P. tenuifila</i>	4,90

5.3. Extração acelerada com solventes (ASE)

A planta pulverizada das dezessete espécies do gênero *Passiflora* foi submetida a extração empregando-se o equipamento de extração acelerada com solventes (ASE) equipado com cela extratora de aço inoxidável com capacidade de

34 mL com fechamento hermético e cartucho de papel 22 x 50 mm, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL.

O extrato de cada espécie de *Passiflora* foi preparado depois que foi selecionado o método de extração mais eficiente, obtido por planejamento experimental, em relação ao rendimento do extrato, teor de fenólicos totais e flavonoides totais.

5.3.1. Planejamento Box-Behnken

Um planejamento experimental de três fatores e três níveis experimentais tipo Box-Behnken foi empregado para a definição da etapa de preparação do extrato. Executou-se o planejamento mostrado na Tabela 11 e avaliaram-se as respostas: rendimento, teor de fenólicos totais (item 5.4) e flavonoides totais (item 5.5). No estudo, os fatores foram codificados em nível mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1). Os fatores em estudo incluíram a temperatura (°C), proporção da solução hidroetanólica (%) e nº de ciclos, como mostrados nas Tabelas 10 e 11. Foi fixado o tempo de extração de 10 min para cada ciclo e *flushing* de 100% (volume de lavagem da cela). Os experimentos foram realizados de forma aleatória e no mesmo dia.

Todos os ensaios foram realizados com 3,0 g do material vegetal da espécie *P. alata*.

O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o Software *Statistica 7.0*.

Tabela 10 - Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento Box-Behnken.

Fatores	Níveis		
	Valor mínimo (-)	Ponto central (0)	Valor máximo (+)
Temperatura (°C)	40	60	80
Proporção hidroetanólica (%)	40	70	100
Nº de ciclos	1	3	5

Tabela 11 - Matriz Box-Behnken para três variáveis.

Ensaio	Temperatura (°C)	Proporção hidroetanólica (%)	Nº de ciclos
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13 (PC)	0	0	0
14 (PC)	0	0	0
15 (PC)	0	0	0

PC = ponto central

5.3.2. Preparo dos extratos hidroetanólicos no ASE

Cada extrato foi preparado pesando-se exatamente 6,0 g *P. alata*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. malacophylla*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*. e 3,0 g de *P. vitifolia* e *P. tenuifila*. O material vegetal foi transferido para a cela extratora de 34 mL e submetido a extração com o sistema etanol:água (64:36 v/v), temperatura do forno de 80 °C, 5 ciclos de extração, tempo de extração de 10 min, *flushing* de 100%, sob pressão de 1500 psi (N₂), com purga de 60 s. Posteriormente, cada extrato foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 55 °C, até a completa remoção do solvente, resultando nos respectivos extratos brutos. Os extratos foram transferidos para frascos de vidro tampados, identificados, pesados e mantidos em freezer.

5.4. Determinação dos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos, foi utilizado o método convencional espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu modificado, desenvolvido por Singleton e Rossi (1965)¹¹³ e adaptado por Georgé et al. (2005)¹¹⁴, utilizando ácido gálico como padrão.

Preparo das amostras: O extrato (2,0 mg) foi dissolvido em 10 mL de água destilada em balão volumétrico de 10 mL (0,2 mg/mL) e agitado em Vórtex.

Curva de calibração: A solução estoque de ácido gálico foi preparada em água destilada, na concentração de 10 mg/mL, em balão volumétrico de 10 mL. Em seguida foram preparadas dez soluções-padrão, em água destilada, nas concentrações que variaram de 2 a 20 µg/mL.

Reação: Em 100 µL da amostra, foram adicionados 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada e, após 1 minuto, 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 15% (m/v) foi adicionado à mistura reacional. Após agitação de 30 segundos, foi adicionado água destilada até completar o volume de 10 mL, em balão volumétrico de 10 mL, e deixado em repouso por 2 horas. Decorrido esse tempo, realizaram-se as leituras espectrofotométricas a 750 nm.

O resultado do teor de compostos fenólicos foi expresso como equivalente de ácido gálico (mg AG/g), calculado por meio da construção de uma curva analítica utilizando as diferentes concentrações de ácido gálico. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados com valores de média e desvio padrão.

5.5. Determinação dos flavonoides totais

A determinação dos flavonoides totais presente no material vegetal, foi realizada por método espectrofotométrico modificado, após reação com cloreto de alumínio, desenvolvido por Fu et al. (2010)¹¹⁵.

Preparo das amostras: O extrato (2,0 mg) foi dissolvido em 10 mL de metanol em balão volumétrico de 10 mL (0,2 mg/mL) e agitado em Vórtex.

Curva de calibração: A solução estoque de quercetina foi preparada em metanol, na concentração de 1 mg/mL, em balão volumétrico de 50 mL. As soluções-padrão foram preparadas a partir da solução estoque, obtendo-se treze concentrações de quercetina que variaram de 2 a 26 µg/mL.

Reação: A 1 mL da amostra, foram adicionados 4 mL de água destilada e 200 µL de solução aquosa de nitrato de sódio (NaNO₃) 5% (m/v) e, após 6 minutos, 200 µL da solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) 10% (m/v) foi adicionado à mistura reacional. Após 5 minutos, foi adicionado 2 mL da solução

aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 10% e metanol para completar o volume no balão volumétrico de 10 mL. Aguardou-se o tempo de reação de 30 minutos após a adição do cloreto de alumínio e procederam-se as leituras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm.

O resultado do teor de flavonoides totais foi expresso como equivalente de quercetina (mg QUE/g), calculado por meio da construção de uma curva analítica utilizando as diferentes concentrações de quercetina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados com valores de média e desvio padrão.

5.6. Preparo das amostras para CLAE

5.6.1. Extração em fase sólida (SPE)

Para o pré-tratamento por extração em fase sólida (SPE) dos extratos, seguiu-se o método desenvolvido por Pereira et al. (2005)⁵² com pequenas modificações.

A amostra a ser aplicada no cartucho de SPE foi preparada solubilizando 10 mg do extrato em 2 mL de metanol grau CLAE. A solução foi colocada no ultrasom e depois aplicada no cartucho.

A extração em fase sólida foi realizada utilizando cartucho C₁₈ de 3 mL/200 mg de adsorvente, seguindo as seguintes etapas:

1. Condicionamento: 3 mL de metanol seguido de 3 mL de água ultrapura;
2. Adição da amostra: 2 mL do extrato;
3. Eluição: 3 mL de metanol 60% (v/v);
4. Limpeza: 3 mL de metanol.

Os extratos das dezessete espécies de *Passiflora* foram submetidas ao pré-tratamento em SPE, em triplicata, com repetição completa do processo acima descrito. Os experimentos foram realizados com o auxílio de um sistema Manifold de SPE acoplado a uma bomba de vácuo. A fração obtida por extração em fase sólida foi, posteriormente, utilizada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

5.7. Condições analíticas para o perfil cromatográfico de extratos de espécies de *Passiflora* e do método quantitativo

As amostras obtidas conforme o item 5.3.2 e preparadas conforme procedimento descrito no item 5.6.1 foram analisadas empregando-se uma coluna analítica Waters® XBridge™, BEH C₁₈ (100 x 3,0 mm d.i., 2,5 µm de diâmetro de partícula). Utilizou-se uma vazão de 0,6 mL/min, volume de injeção de 10 µL e temperatura do forno fixada em 30 °C.

As análises foram feitas em eluição gradiente no modo reverso, com fase móvel constituída de acetonitrila (**B**) e solução de ácido fórmico 0,2 % (v/v) (**A**), com seguinte inclinação: 5-20 % de **B** em 30 min ($\Delta\%B = 0,5$); o retorno do gradiente foi feito em 5 minutos (20-5% de **B**). A coluna foi condicionada em 5% de **B** por 30 minutos entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-400 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos na absorção de 337 nm.

As bandas cromatográficas referente aos flavonoides orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina foram determinadas pelo tempo de retenção obtido com análise de solução do padrão.

5.8. Validação do método cromatográfico

Para a validação do método foram determinados os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão. A amostra utilizada nos ensaios de validação foi o extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*, obtido conforme procedimento descrito no item 5.3.2.

5.8.1. Linearidade

A linearidade foi determinada pela curva analítica por padrão externo desenvolvida por CLAE, para os padrões orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina.

5.8.1.1. Preparo das soluções

A solução estoque de cada padrão (orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina) foi preparada na concentração de 200 mg/L, através da dissolução de 1 mg do padrão em 5 mL de metanol, em balão volumétrico de 5 mL.

5.8.1.2. Curva analítica por padrão externo

Para a construção das curvas de calibração, foram preparadas soluções-padrão a partir da solução estoque, em metanol, nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mg/L, em triplicata.

As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e as concentrações das amostras. A linearidade foi determinada para orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina em sete níveis de concentração (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mg/L). Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900.

5.8.2. Exatidão

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de recuperação utilizando o extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo esta fortificada com os padrões orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina nas concentrações de 1,0; 7,5 e 15,0 mg/L, correspondentes a três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), respectivamente. As amostras foram submetidas a todo o procedimento de pré-tratamento de amostra em SPE (item 5.6.1), em triplicata. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

$$\% \text{ Recuperação} = [(\text{concentração medida}) / (\text{concentração esperada})] \times 100.$$

5.8.3. Precisão

5.8.3.1. Repetibilidade

Para a avaliação da repetibilidade do método, foi realizada a análise, em triplicata, das soluções-padrão nas concentrações de 1,0; 7,5 e 15,0 mg/L para os padrões orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina. Todas as soluções-padrão foram submetidas a cinco diferentes preparações, sendo, então, estimado o coeficiente de variação (CV) correspondente a cada nível de concentração.

5.8.3.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em triplicata, em quatro dias não consecutivos, das soluções-padrão nas concentrações de 1,0; 7,5 e 15,0 mg/L para os padrões orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina, correspondentes a três níveis de concentração (baixa, média e alta), respectivamente. O coeficiente de variação (CV) foi estimado ao final das sucessivas repetições.

5.8.4. Limite de detecção

Para a determinação do limite de detecção (LD), foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte relação matemática:

$LD = 3 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

5.8.5. Limite de quantificação

Para a determinação do limite de quantificação (LQ), foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica, utilizando a seguinte relação matemática:

$LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

5.9. Testes de atividade biológica

5.9.1. Atividade antioxidante - Teste do sequestro do radical livre DPPH

A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v), obtidos conforme o item 5.3.2, de dezessete espécies do gênero *Passiflora*, foram avaliados pelo ensaio do sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) de acordo com o método descrito por Rufino et al. (2007)¹¹⁶.

Uma alíquota de 0,3 mL de amostra, contendo diferentes concentrações de extratos (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg/mL), foi adicionada em 2,7 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 µg/mL. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais foram feitas em 515 nm, no tempo 0 e após 30 minutos. Foi utilizado como controle positivo solução metanólica de ácido gálico. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem antioxidante). O percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), foi calculado como:

$\%SRL = [(C-A)/C] \times 100$, onde C é a absorvância do controle e A é a absorvância da amostra em solução.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi calculada por regressão linear dos gráficos em que o eixo da abscissa representou as concentrações da amostra (mg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, o percentual de sequestro de radical livre (%SRL).

5.9.2. Atividade inibidora da acetilcolinesterase

A quantificação da atividade inibidora da acetilcolinesterase dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) das dezessete espécies de *Passiflora* foi realizada usando leitor de ELISA para microplaca de 96 cavidades, baseado no método de Ellman et al. (1996)¹¹⁷ e Atta-ur-Rahman et al. (2001)¹¹⁸.

As amostras foram preparadas pesando 10 mg do extrato e dissolvendo em 1 mL de metanol com agitação em Vórtex, obtendo uma concentração de 10 mg/mL.

Para a realização do teste, foram adicionados nas cavidades das microplacas 140 µL de tampão fosfato (0,1 M) pH 7,5 com 0,1% de albumina sérica bovina, 20 µL da amostra e 20 µL da enzima acetilcolinesterase (AChE) 5,0 U/mol. Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (ACTI) 75 mM e 10 µL de ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) 10mM, sendo, em

seguida, realizada a leitura em 405 nm no tempo 0, 30 e 60 minutos. O percentual de inibição foi obtido através da equação:

$\%I = [(AChE - AChI) / AChE] \times 100$, onde AChI é a atividade obtida na presença do inibidor e AChE na ausência de inibidor.

5.9.3. Atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células tumorais

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, com os extratos das dezessete espécies de *Passiflora*.

A citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de *Passiflora* foram analisados pelo método colorimétrico de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium) descrito por Mosman (1983)¹¹⁹.

Neste estudo foram utilizadas as linhagens tumorais OVACAR-8 (ovário - humano), HCT-116 (carcinoma de cólon) e SF-295 (glioblastoma) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). Estas linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Os extratos foram diluídos em DMSO puro estéril e preparados na concentrações de 10 mg/mL. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL.

Todas as linhagens celulares foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ células/mL. Os extratos foram acrescidos em concentração de 50 µg/mL, em dose única. Em seguida, as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 mL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorvância foi lida após dissolução do precipitado com 150 mL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Cada amostra vegetal foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata. Os extratos foram selecionados de acordo com o percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90% nas linhagens de

células utilizadas em MTT. Para a amostra considerada ativa, foi realizado o cálculo da CI_{50} com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear (curva dose resposta) a partir de uma duplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Coleta e processamento de amostras de *Passiflora* spp

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007)¹²⁰, os parâmetros de qualidade das matérias-primas vegetais, principalmente com relação aos metabólitos secundários, podem variar consideravelmente dependendo de vários fatores, tais como: procedência do material vegetal, condições de cultivo, estágio do desenvolvimento, sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutriente no solo, radiação ultravioleta, uso de defensivos agrícolas e métodos de coleta, secagem e armazenamento, dentre outros.

A Diretiva 2004/24/EC publicada pela União Europeia, esclarece que a qualidade de produtos vegetais apenas pode ser garantida se as matérias-primas são definidas de maneira rigorosa e detalhada, incluindo a identificação botânica da planta, a região geográfica, as condições climáticas e de colheita, assim como o preparo das amostras e as técnicas de extração, separação e as técnicas analíticas¹²¹.

Sendo assim, as etapas para a obtenção da droga vegetal de diferentes espécies de *Passiflora* foram padronizadas, a fim de reduzir a influência dos inúmeros fatores na produção de metabólitos secundários.

As amostras vegetais das dezessete espécies de *Passiflora* foram coletadas em julho de 2011 na Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. A cidade está situada a 12°04'19" de latitude Sul e 39°06'22" de longitude W.Gr. De acordo com a classificação de Köppen, o clima é uma transição entre as zonas Am (clima tropical de monção) e Aw (clima tropical com estação seca de inverno), enquanto pela classificação de Thornthwaite é do tipo C, seco e subúmido. A altitude é de 220 m, precipitação pluviométrica anual média de 1.224 mm, temperatura média anual de 23,8 °C e umidade relativa do ar de 80,0%, tendo os meses de abril a julho como o período mais chuvoso e agosto a março como o período mais seco¹²².

A Embrapa Mandioca e Fruticultura mantém um Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* spp (BGP) com 323 acessos de maracujazeiro, sendo parte deles pertencentes às espécies silvestres. As espécies silvestres podem ser

utilizadas como fontes de resistência às principais doenças do maracujazeiro, para fins ornamentais, fitoterápicos ou como alimentos funcionais¹²³.

O objetivo principal do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* é a caracterização e avaliação preliminar dos acessos, utilizando caracteres morfoagronômicos e resistência a doenças, para fornecer opções de atributos desejáveis para o programa de melhoramento, bem como conservar parte da variabilidade existente.

As mudas foram produzidas em sacos de polietileno, no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, usando como substrato uma mistura de terra, esterco de curral curtido e vermiculita (3:1:1, v/v).

Na Tabela 12 e Figuras 13 e 14 estão relacionadas as espécies silvestres que foram coletadas, as quais compõem os acessos constantes do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora*.

Tabela 12 - Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora* (BGP) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Acesso	Nome comum	Procedência
08 – <i>P. gibertii</i> N. E. Br.		UNESP/Jaboticabal - SP
25 – <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	Maracujá roxo Mogi	CENARGEN/Brasília - DF
32 – <i>P. maliformis</i> L.		IAPAR/Londrina - PR
77 – <i>P. cincinnata</i> Mast.		Andaraí-BA
104 – <i>P. vitifolia</i> Kunth		Instituto Plantarum
105 – <i>P. tenuifila</i> Killip		Instituto Plantarum
107 – <i>P. morifolia</i> Mast.		Instituto Plantarum
109 – <i>P. galbana</i> Mast.	Maracujá galbano	Instituto Plantarum
114 – <i>P. mucronata</i> Sessé & Moc.	Maracujá pintado	Instituto Plantarum
125 – <i>P. capsularis</i> L.		UNESP/Jaboticabal - SP
152 – <i>P. suberosa</i> L.	Maracujá de cortiça	Instituto Plantarum
157 – <i>P. quadrangularis</i> L.	Maracujá – açu, maracujá-de-quilo	Catu-BA
163 – <i>P. alata</i> Curtis	Maracujá doce	Supermercado Carrefour
170 – <i>P. malacophylla</i> Mast.		Instituto Plantarum
172 – <i>P. racemosa</i> Brot.		Instituto Plantarum
205 – <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Maracujá amarelo Sul Brasil	ESALQ-USP
237 – <i>P. setacea</i> DC.	Maracujá sururuca	Lagedinho - BA

Figura 13 - Fotos dos acessos de *Passiflora*: (08) – *P. gibertii*; (25) – *P. edulis* f. *edulis*; (32) – *P. maliformis*; (77) – *P. cincinnata*; (104) – *P. vitifolia*; (105) – *P. tenuifolia*; (109) – *P. galbana*; (114) – *P. mucronata*; (125) – *P. capsularis*; (152) – *P. suberosa*; (157) – *P. quadrangularis*; (163) – *P. alata*.

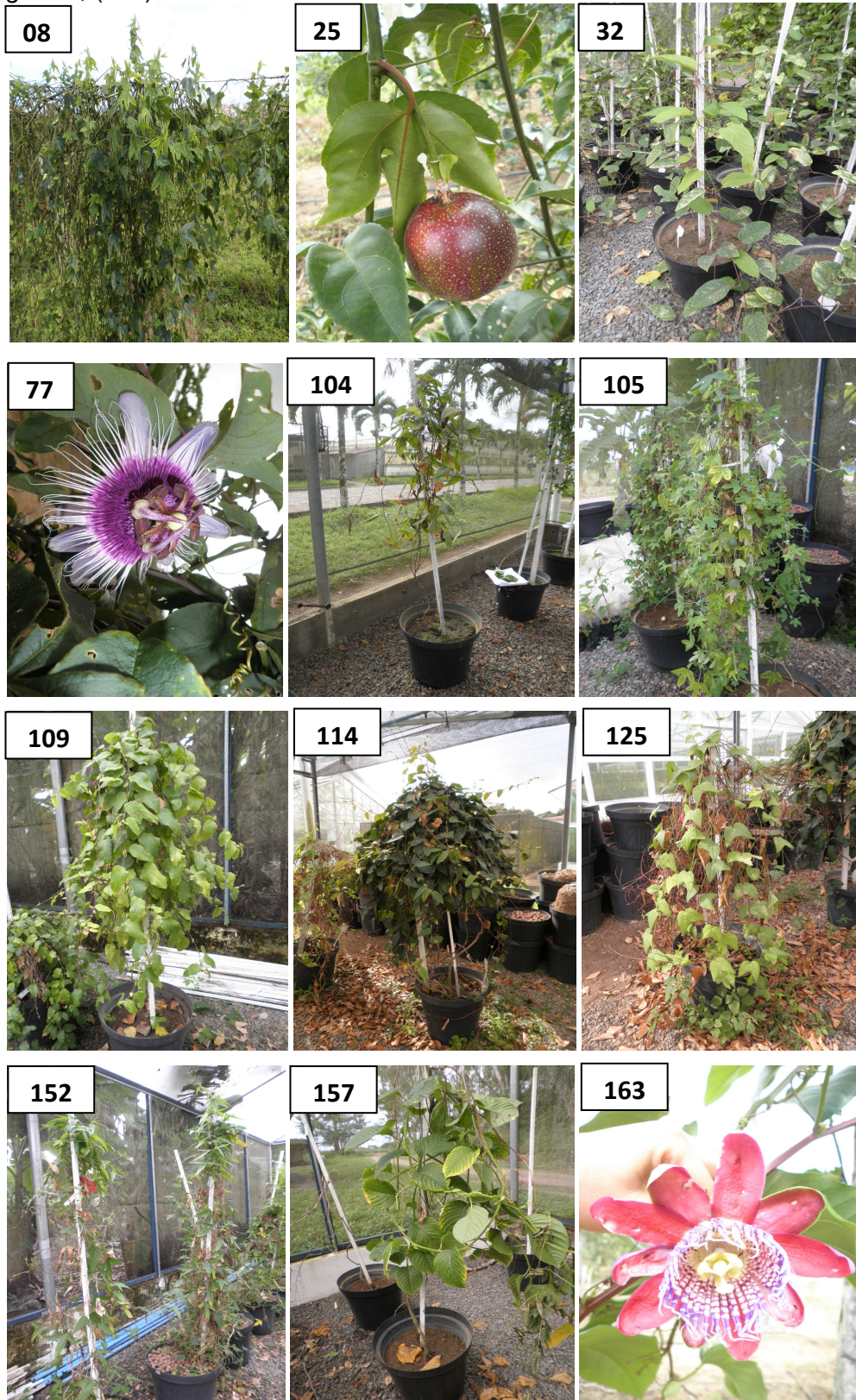


Figura 14 - Fotos dos acessos de *Passiflora*: (170) – *P. malacophylla*; (172) – *P. racemosa*; (205) – *P. edulis* f. *flavicarpa*; (237) – *P. setacea*.



As amostras vegetais foram coletadas no período da manhã, na mesma época do ano, utilizando tesoura própria para jardinagem e recebidas em sacos de papel limpos e secos. Em seguida, foram submetidas à secagem a 30 °C e, após esse processo, foi realizada a trituração do material vegetal (folhas), seguida de tamização para a padronização da granulometria dos pós de até 1,0 mm (16 mesh) a serem posteriormente extraídos (item 5.2 do procedimento experimental).

6.2. Extração acelerada com solventes (ASE)

A escolha do método de extração, da técnica de extração e do solvente extrator pode influenciar de maneira significativa na composição química do extrato. Por isso, a escolha deve ser rigorosa, visando uma metodologia eficiente, que apresente boa reprodutibilidade e que possa ser representativo das substâncias ativas e/ou característicos do vegetal.

Inúmeros são os fatores que afetam os processos extrativos, tais como: divisão da droga – quanto menor o tamanho das partículas maior a superfície de

contato; estado da droga – fresca ou seca; agitação; massa utilizada da droga; natureza dos solventes; mistura dos solventes em diferentes proporções; volume de solvente; temperatura – elevações de temperatura provocam aumento da solubilidade de princípios ativos; influência do pH e tempo de extração^{124,125}.

A extração dos constituintes químicos presentes nas folhas de espécies de *Passiflora* pode ser realizada por diversos métodos extrativos convencionais, tais como, maceração, percolação e extração por Soxhlet. No entanto, optou-se por um sistema de extração moderno, automatizado, rápido, que utiliza menor quantidade de solventes, controle de temperatura e tempo de extração. No extrator acelerado com solventes (ASE), a quantidade de ciclos de extração, com renovação do solvente em cada ciclo, pode ser fixada até que o material vegetal possa ser esgotado.

Com o objetivo de se obter a melhor condição de extração na quantificação de substâncias fenólicas totais, flavonoides totais e rendimento (%) em folhas de espécies de *Passiflora*, foi aplicado um planejamento Box-Behnken para a otimização do procedimento de extração usando o extrator acelerado com solventes (ASE).

O uso de planejamento experimental na extração de amostras vegetais é de suma importância no desenvolvimento e modernização de processos para preparação de extratos padronizados. A padronização permite garantir que haja a quantidade necessária dos constituintes ativos da planta, a fim de se obter produtos com consistência em termos de composição química⁵.

Há dois estudos na literatura que utilizam planejamento experimental para determinar o conteúdo de flavonoides totais em espécies de *Passiflora*, os quais serão apresentados a seguir.

Alves et al.⁸⁴ (2011) avaliaram o efeito de diferentes fatores inerentes à extração das partes aéreas de *P. alata* sobre o teor de flavonoides totais, utilizando um planejamento fatorial completo 2³. Os fatores avaliados no planejamento foram: solvente (água e etanol 60%), tempo de extração (30 e 60 min) e tipo de extração (sonicação e shaker). Os valores ótimos de extração de flavonoides totais foram obtidos com água, usando shaker durante 30 minutos.

Noriega et al.¹²⁶ (2012) realizaram um planejamento experimental para avaliar o efeitos de diferentes fatores na extração de flavonoides nas folhas de *P. alata* e *P. edulis*. No estudo, os fatores avaliados foram proporção da solução hidroetanólica

(25%, 50%, 75% e 100%) e método de extração (maceração e percolação). De acordo com os autores, os valores ótimos de extração de flavonoides totais foram obtidos utilizando a maceração com 75% de etanol para a *P. edulis* e 50% etanol para a *P. alata*.

6.2.1. Otimização multiresposta

Neste trabalho, foi aplicado um planejamento Box-Behnken para otimização do procedimento de extração usando o extrator acelerado com solventes (ASE). O procedimento baseia-se na obtenção simultânea dos parâmetros rendimento do extrato (%), teor de fenólicos totais (mg AG/g) e flavonoides totais (mg QUE/g), através de uma otimização multiresposta onde estes parâmetros foram determinados.

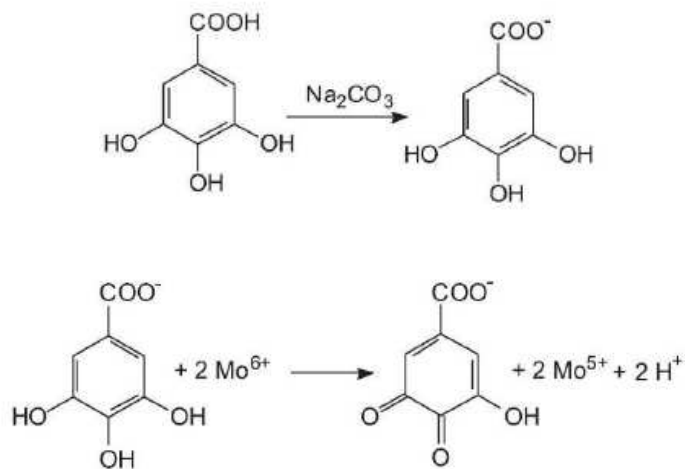
Todos os ensaios foram realizados com 3,0 g do material vegetal da espécie *P. alata*. O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o *Software Statistica 7.0*.

6.2.1.1. Determinação dos fenólicos totais

A quantificação das substâncias fenólicas totais em produtos naturais utiliza técnicas espectrofotométricas, sendo a mais empregada o ensaio de Folin-Ciocalteu.

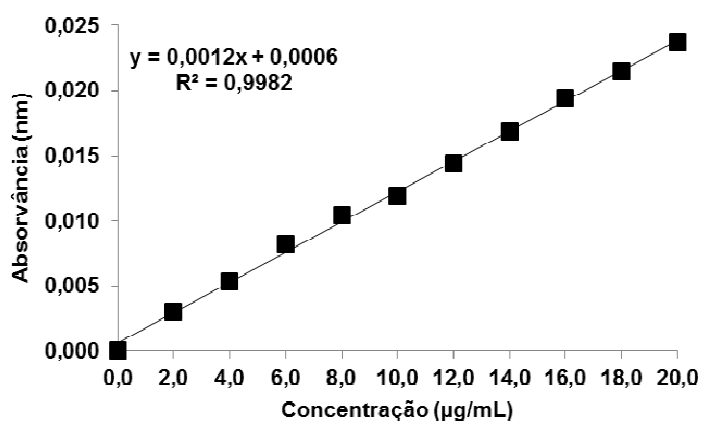
Este método espectrofotométrico, foi desenvolvido por Singleton et al. (1999)¹¹³ e AOAC (1965)¹²⁷, o qual fundamenta-se na redução dos ácidos fosfomolibdico-fosfotungstico pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}) de colorações azuis, cuja a absorvância pode ser medida em λ_{max} em 760 nm¹²⁸. A reação ocorre em meio básico, onde, inicialmente, as substâncias fenólicas são desprotonados, gerando ânions (Figura 15). O aparecimento da coloração azulada produzida é diretamente proporcional ao teor de fenólicos presentes no material analisado.

Figura 15 - Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



A Figura 16 apresenta a curva de calibração elaborada através de dez concentrações (2,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$) de soluções-padrão de ácido gálico, em triplicata, e uma amostra branco. O preparo da solução estoque, soluções-padrão e reação estão descritos no item 5.4 do procedimento experimental.

Figura 16 - Curva de calibração para os fenólicos totais utilizando-se o ácido gálico como padrão.

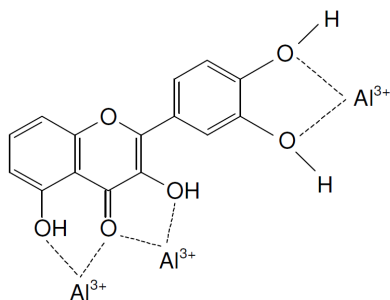


O método de quantificação de fenólicos totais se mostra linear com o valor do coeficiente de correlação de 0,9982. Através da equação da reta ($y = 0,0012x + 0,0006$), foram calculados o teor de substâncias fenólicas expressos como equivalente de ácido gálico (mg AG/g), os quais estão apresentados na Tabela 13.

6.2.1.2. Determinação dos flavonoides totais

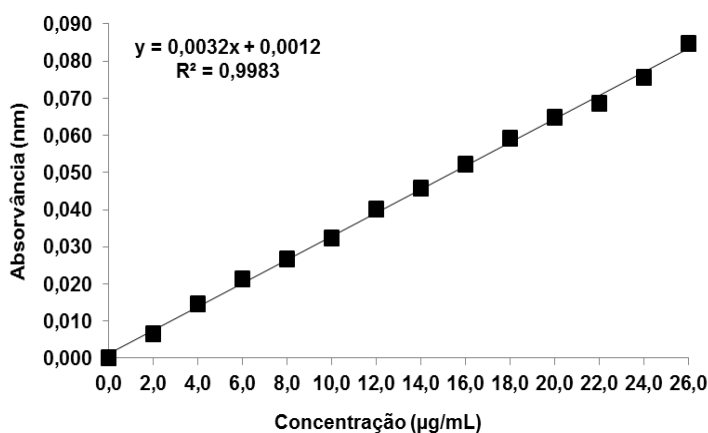
A determinação do teor de flavonoides totais nos extratos das amostras vegetais foi realizada por método espectrofotométrico modificado, após reação com cloreto de alumínio, utilizando-se metodologia desenvolvida por Fu et al. (2010)¹¹⁵, descrita no item 5.5 do procedimento experimental. O procedimento baseia-se na formação de complexos estáveis com o íon Al^{3+} e as hidroxilas livres dos flavonoides. O íon Al^{3+} em solução neutra, pode formar complexos em três possíveis sítios quelantes normalmente encontrados nos flavonoides: grupo 3-OH, 5-OH com C=O e 3', 4'- O – diOH¹²⁹, como demonstrado na Figura 17.

Figura 17 - Esquema representativo da complexação do íon Al^{3+} e flavonoides¹³⁰.



A Figura 18 apresenta a curva de calibração construída a partir das treze concentrações de quercetina (2,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata, e uma amostra branco.

Figura 18 - Curva de calibração para a determinação dos flavonoides totais a partir da quercetina.



Pode-se verificar pela curva de calibração que o método de quantificação proposto para flavonoides totais também se mostra linear com o valor do coeficiente de correlação de 0,9983. Através da equação da reta ($y = 0,0032x + 0,0012$), foram calculados o teor de flavonoides totais expressos como equivalente de quercetina (mg QUE/g), os quais estão apresentados na Tabela 13.

6.2.1.3. Planejamento Box-Behnken

Na etapa de otimização foram realizados estudos com o objetivo de se obter as melhores condições para o método proposto. Assim, estudou-se os seguintes fatores para a otimização do sistema: temperatura de extração (°C), proporção da solução hidroetanólica (%) e número de ciclos. Para isso, foram realizados testes preliminares para a escolha do melhor método de extração e posteriormente empregou-se um planejamento Box-Behnken com objetivo de obter o modelo que mais se ajusta ao processo, os efeitos principais, de interação e quadráticos entre as variáveis independentes e de resposta, bem como as melhores condições para a obtenção do melhor rendimento de extração e determinação de fenólicos totais e flavonoides totais na espécie *P. alata*, avaliando simultaneamente as respostas processadas.

Para realizar a otimização multiresposta do processo de extração simultânea de fenólicos totais, flavonoides totais e do rendimento da extração, foi utilizada uma ferramenta matemático-estatística desenvolvida por Derringe¹¹¹, que baseia-se no emprego de uma função de desejabilidade. Esta função permite combinar em uma única resposta (a desejabilidade global) as três respostas particulares de interesse. A desejabilidade global pode variar de 0 a 1. Desta forma, quanto mais próximo de 1 for o valor obtido, mais próximo estarão os valores ótimos relacionados a cada resposta individual.

Os níveis selecionados para os fatores e a matriz requerida para os experimentos do Box-Behnken junto aos resultados obtidos, expressos como equivalente de ácido gálico (mg AG/g) para a determinação de fenólicos totais, equivalente de quercetina (mg QUE/g) para a determinação dos flavonoides totais e rendimento de extração (%), encontram-se na Tabela 13. A esse planejamento foram adicionados mais 2 pontos centrais, resultando em um planejamento com 15 experimentos.

Tabela 13 - Matriz e resultados do planejamento Box-Benhken para determinação do rendimento, fenólicos totais e flavonoides totais da espécie *P. alata*.

Experimento	T (°C)	P.H. (%)	NC	R (%)	mg AG/g	mg QUE/g
01	40 (-)	40 (-)	3 (0)	39,68	463,89 ± 4,416	49,22 ± 2,351
02	80 (+)	40 (-)	3 (0)	47,73	502,78 ± 3,127	41,46 ± 1,064
03	40 (-)	100 (+)	3 (0)	11,07	452,78 ± 3,127	110,89 ± 1,130
04	80 (+)	100 (+)	3 (0)	24,85	241,67 ± 1,250	101,61 ± 2,540
05	40 (-)	70 (0)	1 (-)	26,86	555,56 ± 0,867	72,60 ± 0,802
06	80 (+)	70 (0)	1 (-)	37,13	538,89 ± 0,241	79,43 ± 0,716
07	40 (-)	70 (0)	5 (+)	37,46	587,50 ± 1,102	65,78 ± 1,094
08	80 (+)	70 (0)	5 (+)	45,12	611,11 ± 2,836	84,53 ± 2,319
09	60 (0)	40 (-)	1 (-)	40,44	502,78 ± 1,463	58,54 ± 1,452
10	60 (0)	100 (+)	1 (-)	19,38	259,72 ± 2,055	85,83 ± 0,393
11	60 (0)	40 (-)	5 (+)	54,26	461,11 ± 1,879	60,21 ± 0,781
12	60 (0)	100 (+)	5 (+)	20,76	347,22 ± 0,481	80,31 ± 0,361
13 (PC)	60 (0)	70 (0)	3 (0)	38,64	462,50 ± 1,667	60,57 ± 0,325
14 (PC)	60 (0)	70 (0)	3 (0)	39,25	494,44 ± 0,241	63,70 ± 0,239
15 (PC)	60 (0)	70 (0)	3 (0)	40,57	408,33 ± 0,417	60,89 ± 0,239

T = temperatura em °C; P.H. = proporção hidroetanólica (%); NC: número de ciclos; R = rendimento (%).

A significância dos efeitos relacionados às variáveis estudadas foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) para cada resposta e os efeitos foram verificados utilizando-se os valores *p*. Valores de *p* menores que 0,05 indica que a variável é significativa dentro do domínio experimental estudado, com um nível de confiança de 95%. As Tabelas 14 a 16 apresentam os resultados da ANOVA para o rendimento de extração, fenólicos totais e flavonoides totais, respectivamente. Os termos significativos estão destacados em vermelho.

Tabela 14 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para o rendimento de extração.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	Valor <i>p</i>
(1)T L+Q	0,204950	2	0,102475	117,1807	0,008462
(2) PH L+Q	1,376403	2	0,688202	786,9629	0,001269
(3) NC L+Q	0,128526	2	0,064263	73,4849	0,013426
(1) X (2)	0,007387	1	0,007387	8,4475	0,100796
(1) X (3)	0,001533	1	0,001533	1,7527	0,316591
(2) X (3)	0,034801	1	0,034801	39,7950	0,024220
Falta de ajuste	0,004069	3	0,001356	1,5511	0,415087
Erro Puro	0,001749	2	0,000875		
SQ total	1,753081	14			

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor *p*: nível de probabilidade; L: linear; Q: quadrático. Fatores: T: temperatura (°C); PH: Proporção hidroetanólica (%); NC: número de ciclos.

Tabela 15 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para fenólicos totais.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	Valor p
(1)T L+Q	21698,9	2	10849,43	5,72549	0,148688
(2) PH L+Q	94308,8	2	47154,41	24,88447	0,038633
(3) NC L+Q	11249,2	2	5624,58	2,96822	0,252002
(1) X (2)	15625,0	1	15625,00	8,24567	0,102896
(1) X (3)	405,6	1	405,57	0,21403	0,689081
(2) X (3)	4171,0	1	4171,01	2,20114	0,276164
Falta de ajuste	5335,2	3	1778,39	0,93850	0,552935
Erro Puro	3789,9	2	1894,93		
SQ total	162528,8	14			

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor p: nível de probabilidade; L: linear; Q: quadrático. Fatores: T: temperatura (°C); PH: Proporção hidroetanólica (%); NC: número de ciclos.

Tabela 16 - ANOVA dos dados apresentados na Tabela 13 para flavonoides totais.

Fator	SQ	g.l.	MQ	F	Valor p
(1)T L+Q	322,912	2	161,456	54,5047	0,018016
(2) PH L+Q	3666,468	2	1833,234	618,8676	0,001613
(3) NC L+Q	83,665	2	41,833	14,1220	0,066129
(1) X (2)	0,570	1	0,570	0,1925	0,703665
(1) X (3)	35,564	1	35,564	12,0057	0,074148
(2) X (3)	12,915	1	12,915	4,3599	0,172033
Falta de ajuste	919,883	3	306,628	103,5121	0,009584
Erro Puro	5,924	2	2,962		
SQ total	4994,469	14			

SQ: soma quadrática; g.l.: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor p: nível de probabilidade; L: linear; Q: quadrático. Fatores: T: temperatura (°C); PH: Proporção hidroetanólica (%); NC: número de ciclos.

As tabelas ANOVA apresentadas forneceram para a variável rendimento um valor de $R^2 > 0,99$ e coeficiente de ajuste do modelo também maior que 0,99. Para fenólicos totais, o valor de $R^2 > 0,84$ e ajuste do modelo maior que 0,84. Em ambos casos, os modelos apresentaram ajustes aceitáveis a um nível de confiança de 95%. Para os flavonoides foi encontrado o valor de $R^2 > 0,81$ e embora o ajuste do modelo não tenha sido satisfatório com um valor de 0,48097, isso ocorreu, provavelmente, pela indicação da necessidade de uma temperatura maior e uma proporção da solução hidroetanólica maior do que as utilizadas no domínio experimental (Figuras 19 e 20).

As superfícies de resposta foram sobrepostas e um gráfico de desejabilidade global do sistema mostrou que há dentro do domínio experimental estudado condições onde se pode obter a máxima resposta do sistema para esse domínio, com uma desejabilidade global de 0,7384. Dessa forma, mostrando que a extração pode ser realizada simultaneamente sem perdas significativas (Figura 21). Os

valores utilizados como otimizados foram 80 °C, 64% para a proporção da solução hidroetanólica e 5 ciclos de extração.

Figura 19 - Superfícies de respostas para a desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos e PH = proporção hidroetanólica.

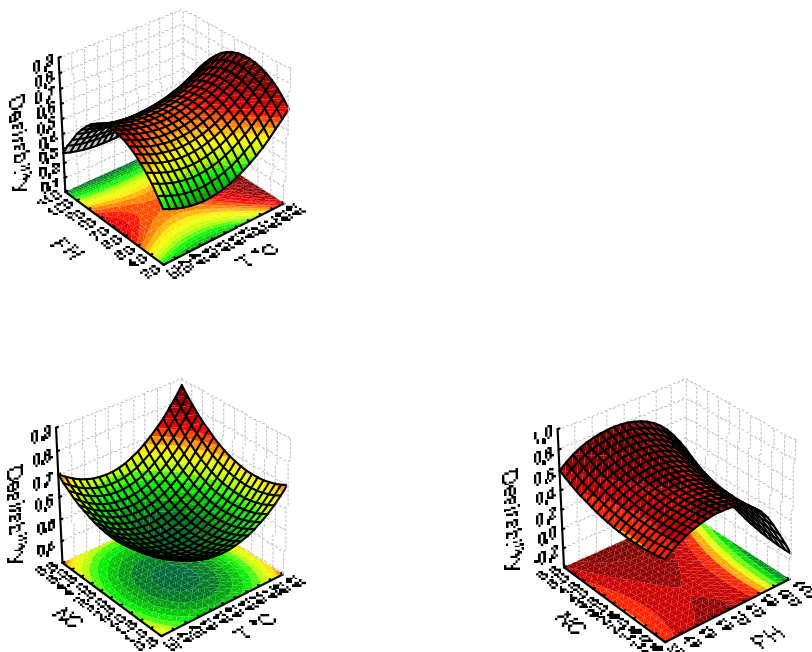


Figura 20 - Superfícies de contorno para a desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos e PH = proporção hidroetanólica.

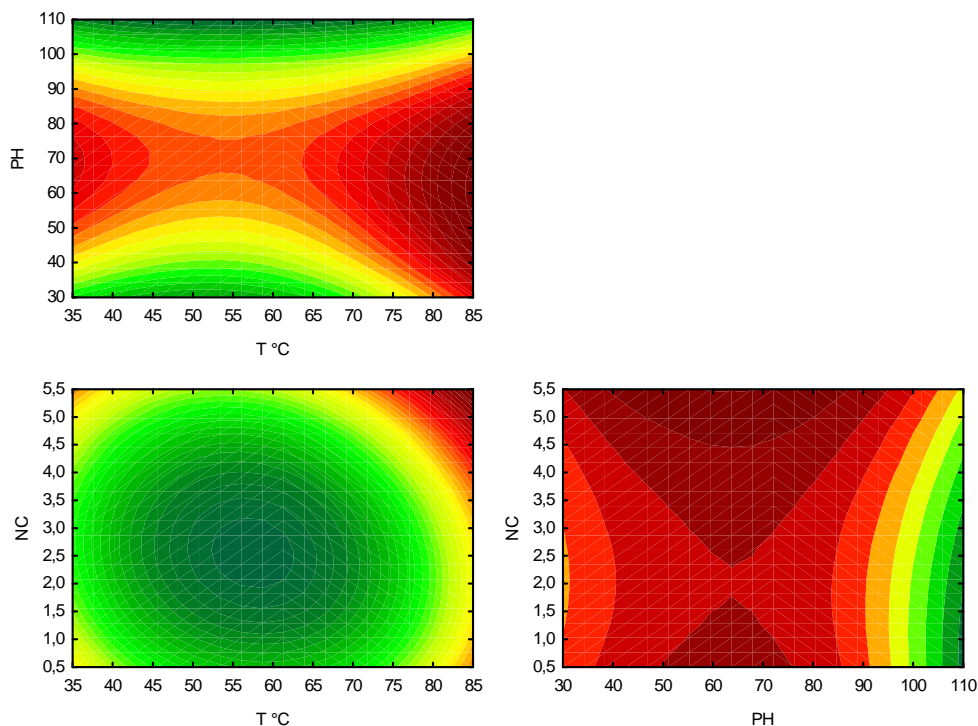
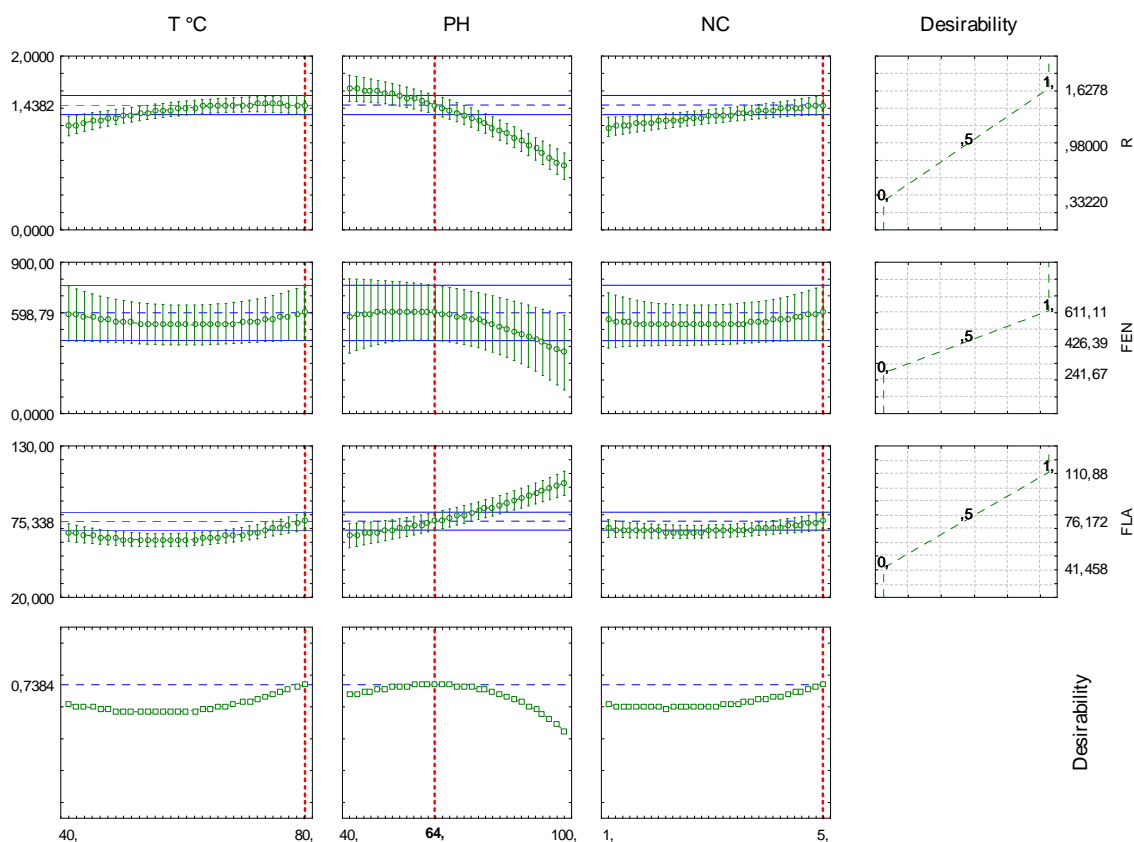


Figura 21 - Gráfico com valores preditos e desejabilidade global do sistema. T = temperatura; NC: número de ciclos; PH = proporção hidroetanólica; R = rendimento; FEN = fenólicos totais e FLA = flavonoides totais.



6.2.2. Preparo dos extratos

Após a obtenção da melhor condição de extração foram realizadas as extrações das dezessete espécies de *Passiflora* no extrator acelerado com solventes (ASE). Os extratos obtido no ASE foram concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório até completa remoção do solvente, obtendo-se os extratos brutos (item 5.3.2). Os valores de rendimento (%) de cada extrato estão apresentados na Tabela 17. Como pode ser observado na Tabela 17, todos os extratos apresentaram excelentes rendimentos, destacando-se o extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. alata* (48,16%) e *P. morifolia* (43,05%).

Tabela 17 - Rendimentos dos extratos de *Passiflora*.

Amostra	Rendimento (%)
<i>P. alata</i>	48,16
<i>P. capsularis</i>	23,03
<i>P. cincinnata</i>	33,89
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	35,95
<i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	38,94
<i>P. galbana</i>	29,34
<i>P. gibertii</i>	34,37
<i>P. malacophylla</i>	15,59
<i>P. maliformis</i>	38,27
<i>P. morifolia</i>	43,05
<i>P. mucronata</i>	34,58
<i>P. quadrangularis</i>	39,87
<i>P. racemosa</i>	29,33
<i>P. setacea</i>	38,99
<i>P. suberosa</i>	24,30
<i>P. tenuifolia</i>	32,57
<i>P. vitifolia</i>	29,81

6.3. Pré-tratamento das amostras

A análise cromatográfica de extratos de plantas, em geral, requer um pré-tratamento da amostra para a eliminação das substâncias interferentes provenientes da matriz e presentes no extrato, os quais podem interferir com o método analítico a ser utilizado.

O uso de um método de pré-tratamento de amostra empregando-se extração em fase sólida (SPE) poderia constituir-se em uma alternativa para separar substâncias com diferentes características químicas presentes em amostras complexas, como extratos de plantas¹³².

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de separação que se emprega fases estacionárias empacotados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e o mecanismo de retenção é idêntico àquele envolvido em cromatografia líquida em coluna. As fases estacionárias são na sua maioria, à base de sílica modificada com grupos octadecil (C₁₈), octil (C₈), amino (NH₂), ciano (CN) ou à base de resinas poliméricas, carbono grafitizado e alumina¹³².

Para a análise dos flavonoides, geralmente utiliza-se a extração em fase sólida (SPE) com fase reversa (C₁₈, C₈, C₄ ou C₂). Neste caso, a amostra vegetal é dissolvida em um solvente polar como, por exemplo, metanol, e é introduzida no cartucho contendo a fase estacionária não polar. Os analitos ou interferentes não

polares ficam retidos na fase estacionária e, as substâncias de interesse, sendo polares, são eluídos com o eluente polar. Posteriormente, os analitos não polares são removidos da fase estacionária com uma pequena quantidade de solvente apolar. Desta forma, as substâncias de interesse estão livres dos interferentes.

Com o objetivo de reter na fase estacionária os interferentes da matriz (clorofila), eluindo-se os flavonoides, foi utilizado o método de pré-tratamento em SPE desenvolvido por Pereira et al. (2005)⁵², descrito no item 5.6.1 do procedimento experimental.

A eluição dos flavonoides presentes nos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de *Passiflora*, ocorreu quando o mesmo foi adicionado no cartucho C₁₈ e eluído usando metanol 60% (v/v). A fração flavonoídica obtida por SPE foi, posteriormente, utilizada nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

6.4. Otimização das condições cromatográficas do perfil cromatográfico

As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando-se a amostra obtida após extração em fase sólida (item 5.6.1). Para a otimização das condições cromatográficas de separação foram avaliadas a influência dos seguintes fatores: diferentes fases estacionárias, volume de injeção, temperatura da coluna e parâmetros de eluição gradiente. As otimizações foram feitas com o extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa* e estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*, com detecção em $\lambda = 337$ nm.

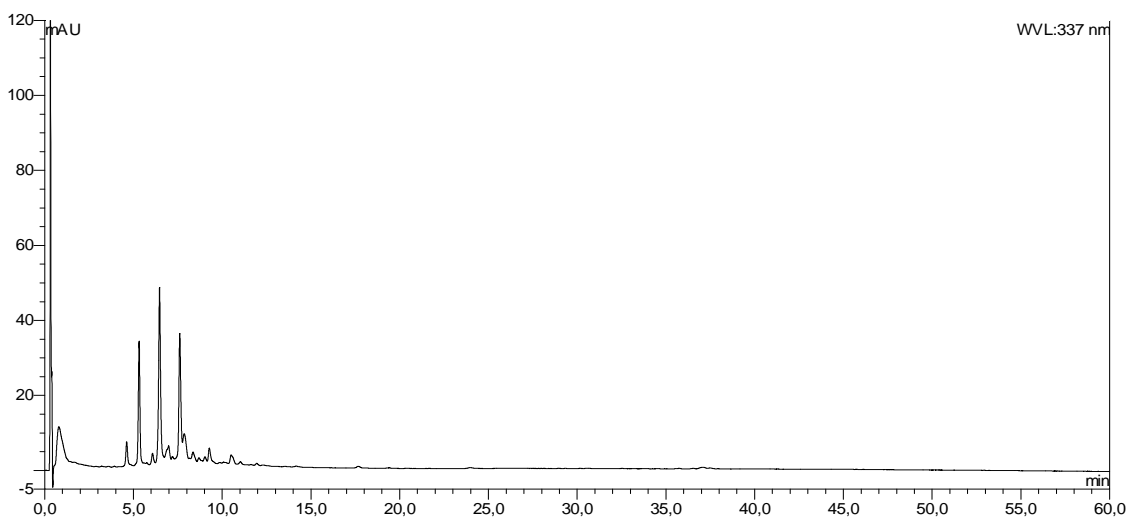
Fase estacionária	Análise	Condição cromatográfica
C₁₈ Dionex® (100 x 2,1 mm, 5 μ m)	1	5-100% ACN: água por 60 min ($\Delta\%B/\text{min} = 1,58$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 1,0 mL/min; T = 30°C.
	2	5-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 20 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,75$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 1,0 mL/min; T = 30°C.
	3	12-18% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,6$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 1,0 mL/min; T = 30°C.
	4	10-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 20 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,5$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 1,0 mL/min; T = 30°C.
	5	10-14% ACN: ácido fórmico 0,2% por 5 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,8$); 14-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 15 min ($\Delta\%B = 0,4$); vol. inj. 0,8 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 30°C.
BEH C₁₈ XBridge™ Waters® (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m)	6	5-100% ACN: ácido fórmico 0,2% por 60 min ($\Delta\%B/\text{min} = 1,58$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 30°C.
	7	5-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 20 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,75$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 30°C.
	8	12-17% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,5$); isocrático em 17% ACN por 5 min; vol. inj. 10 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 35°C.
	9	14-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,6$); vol. inj. 10 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 30°C.
	10	12-15% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,3$); 15-18% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B = 0,3$); vol. inj. 0,8 μ L; vazão = 1,0 mL/min; T = 30°C.
	11	15-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,3$); vol. inj. 0,8 μ L; vazão = 0,8 mL/min; T = 30°C.
	12	5-32% ACN: ácido fórmico 0,2% por 20 min ($\Delta\%B = 1,35$); vol. inj. 0,8 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	13	5-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,5$); 20-35% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B = 1,5$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	14	5-13% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,8$); 13-17% ACN: ácido fórmico 0,2% por 20 min ($\Delta\%B = 0,2$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	15	5-15% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,33$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	16	5-17% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,4$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	17	5-30% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,4$); 30-35% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B = 0,5$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	18	5-28% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,76$); 28-32% ACN: ácido fórmico 0,2% por 10 min ($\Delta\%B = 0,4$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	19	5-25% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,66$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.
	20	5-20% ACN: ácido fórmico 0,2% por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,5$); vol. inj. 0,6 μ L; vazão = 0,6 mL/min; T = 30°C.

vol. inj. = volume de injeção; T = temperatura.

Segundo Synder e Dolan¹³³, o desenvolvimento de um método cromatográfico utilizando CLAE no modo reverso é melhor iniciado com o emprego de uma eluição gradiente exploratória, em condições de ampla faixa de força de fase móvel, para fornecer um cromatograma do tipo *fingerprint* (impressão digital) da amostra em análise. O desenvolvimento do método é iniciado utilizando água e acetonitrila (ACN), com intervalo de 5-100% de ACN em 60 minutos. Relatam que a ACN na fase móvel geralmente é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para a detecção das substâncias.

Desta forma, o primeiro passo foi a utilização de um gradiente exploratório binário usando uma mistura ACN (**B**) e água (v/v) (**A**) como solventes, em uma coluna C₁₈ Dionex[®] (100 x 2,1 mm, 5 µm). Foi variada a concentração do modificador orgânico (ACN) de 5% a 100% durante 60 minutos, com vazão de 1 mL/min, acompanhado pelo detector de arranjo de diodos com seleção da faixa de comprimento de onda entre 190-400 nm na região do UV para se fazer a determinação das absorvâncias das substâncias presentes na amostra (Figura 22).

Figura 22 – Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) de eluição gradiente do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*, referente à condição 1 da Tabela 18.



A partir dessa primeira análise (condição 1) foi possível determinar as próximas condições experimentais para a otimização da separação gradiente, utilizando a relação entre o intervalo de variação da concentração do modificador orgânico ($\Delta\%B$) e o tempo de análise (t_g) obtendo-se o valor da inclinação do

gradiente ($\Delta\%B/\text{min}$). Esta medida é usada para descrever mudanças na separação decorrentes do aumento ou diminuição na inclinação do gradiente¹³⁴.

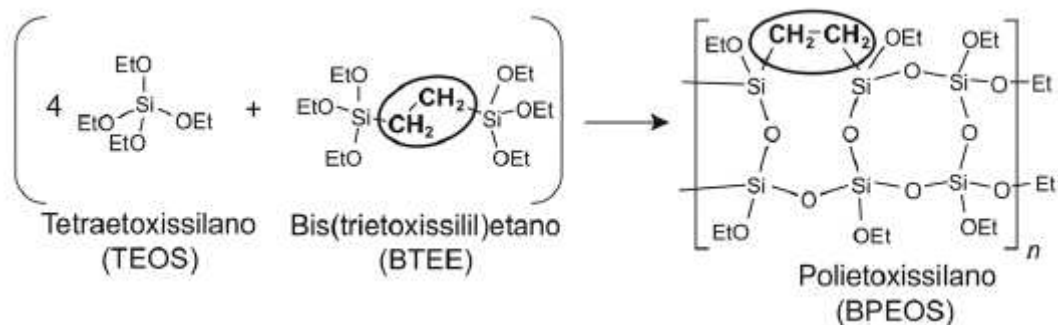
A utilização de solução ácida na composição da fase móvel tem sido bastante utilizada em diversos trabalhos, uma vez que em extratos vegetais obtidos a partir de solventes polares é comum a presença de flavonoides, substâncias fenólicas diversos e ácidos carboxílicos, que podem estar parcial ou totalmente ionizados em solução aquosa. Nesses casos, a supressão da ionização é uma condição muitas vezes desejável, pois as tornam mais hidrofóbicas, aumentando a sua retenção. Sendo assim, as análises cromatográficas foram feitas usando na fase móvel solução de ácido fórmico 0,2% (v/v), com o intuito de obter melhor retenção e resolução das substâncias presentes no extrato.

Durante os estudos de otimização foram avaliadas alterações na vazão e modificações no gradiente, como concentração inicial e final do modificador orgânico, tempo e inclinação ($\Delta\%$ de solvente/minuto). A redução da vazão utilizada visou avaliar a melhor interação dos constituintes da amostra com a fase estacionária.

As análises cromatográficas usando a coluna C₁₈ Dionex[®], permitiu verificar que as substâncias presentes na amostra apresentavam baixa interação com a fase estacionária, além disso não foi possível obter uma adequada separação das bandas cromatográficas.

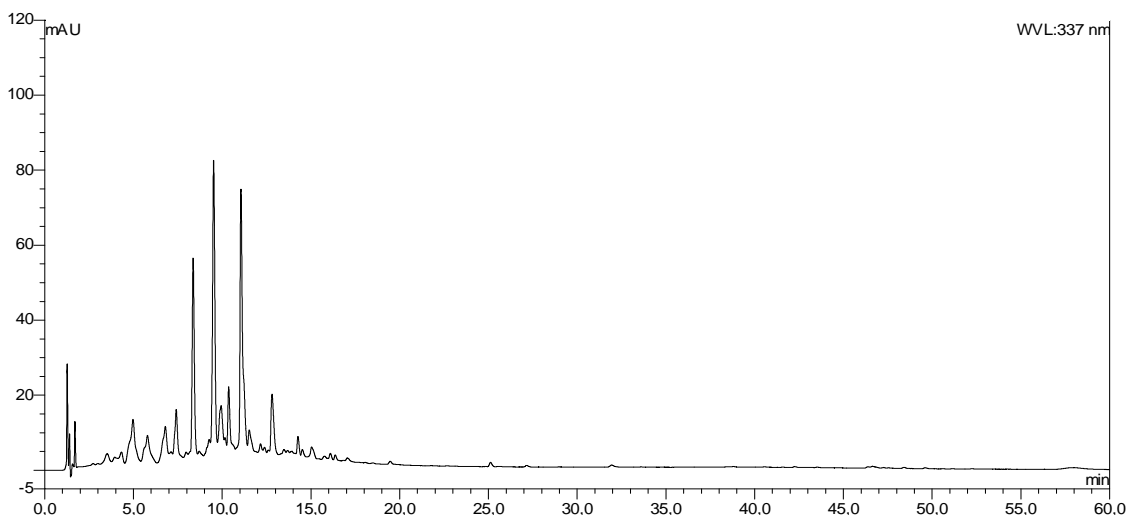
Com o intuito de melhorar a seletividade, a eficiência e a resolução na análise cromatográfica foram realizadas análises em coluna de fase estacionária com partículas híbridas de segunda geração de 2,5 μm da Waters[®], denominadas XBridge[™] BEH (BEH – *ethylene bridged hybrid*), as quais são produzidas pela reação de bis(trietoxissililetano) e tetraetoxissilano, que possui partícula de sílica com pontes de etano (Si-CH₂-CH₂-Si) inseridas na sua estrutura (polietoxissilano) (Figura 23). Essas partículas XBridge[™] fornecem boa simetria de pico, devido à quantidade reduzida de silanóis residuais, e portanto, eficiências mais altas^{135,136}.

Figura 23 - Reação química de síntese da sílica híbrida de segunda geração¹³⁵.



A condição cromatográfica gradiente no modo reverso utilizada inicialmente foi de 5-100% de ACN e solução de ácido fórmico 0,2% (v/v) por 60 min, com vazão de 0,8 mL/min e volume de injeção de 10 μ L (Figura 24).

Figura 24 – Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) de eluição gradiente do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*, referente à condição 6 da Tabela 18.



Esta condição apresentou melhores resultados (melhor separação e distribuição das substâncias) do que os obtidos anteriormente (condição 1) com a coluna C₁₈ Dionex[®]. Desta forma, diferentes otimizações de condições de separação, usando coluna BEH XBridge[™] (Waters[®]) foram testadas variando os fatores inicialmente mencionados, com o intuito de melhorar a separação das substâncias.

Dentre as condições testadas, a condição considerada adequada para análise do perfil cromatográfico de extratos de *Passiflora* foi coluna de fase estacionária BEH C₁₈ XBridge[™] (Waters[®]), utilizando vazão de 0,6 mL/min, volume de injeção de

10 µL e eluição gradiente linear no modo reverso, com fase móvel constituída de ACN (**B**) e solução de ácido fórmico 0,2% (v/v) (**A**): 5-20% de ACN por 30 min ($\Delta\%B/\text{min} = 0,5$), permanecendo isocrático em 20% de ACN em 5 min; 20-5% de ACN por 5 min (retorno do gradiente) e 5% de ACN por 15 min (condicionamento da coluna), apresentado na Figura 25.

A escolha do melhor comprimento de onda para a análise dos flavonoides, foi realizada através do monitoramento da faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm, por meio do sistema de detecção por arranjo de diodos. O comprimento de onda selecionado para as análises foi de 337 nm, o qual obteve-se boa sensibilidade para a maioria das substâncias presentes no extrato.

A presença de flavonoides pode ser evidenciada em espectros de absorção no UV das bandas cromatográficas (Figura 25). Observou-se que as bandas selecionadas no cromatograma apresentaram dois máximos de absorção no espectro, sendo um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250-280 nm e o outro em torno de 310-350 nm, indicativo que os flavonoides são da classe das flavonas¹³⁰.

Após a otimização das condições cromatográficas de análise, os extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de *P. alata*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. malacophylla*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. vitifolia* e *P. tenuifila* foram analisados para obtenção do perfil cromatográfico, como mostrado nas Figuras 26 a 41 .

Figura 25 – Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis f. flavicarpa* e espectros de absorção no UV das bandas cromatográficas assinaladas (1 a 6). $t_{R1} = 10,3 \text{ min}$; $t_{R2} = 12,6 \text{ min}$; $t_{R3} = 15,2 \text{ min}$; $t_{R4} = 15,7 \text{ min}$; $t_{R5} = 18,2 \text{ min}$; $t_{R6} = 18,7 \text{ min}$.

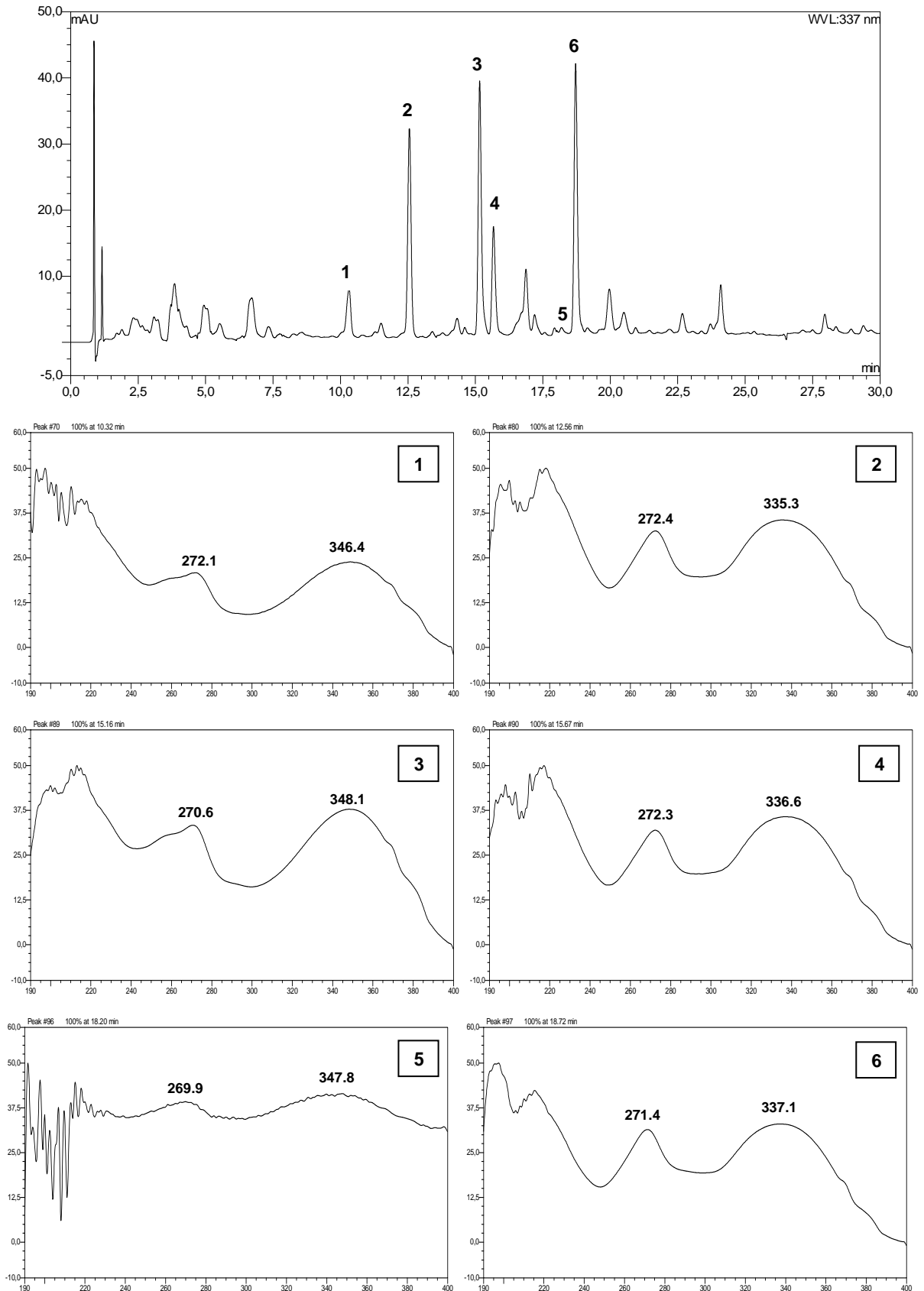


Figura 26 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. alata* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (7 a 11). $t_{R7} = 15,2$ min; $t_{R8} = 15,7$ min; $t_{R9} = 16,4$ min; $t_{R10} = 18,2$ min; $t_{R11} = 18,7$ min.

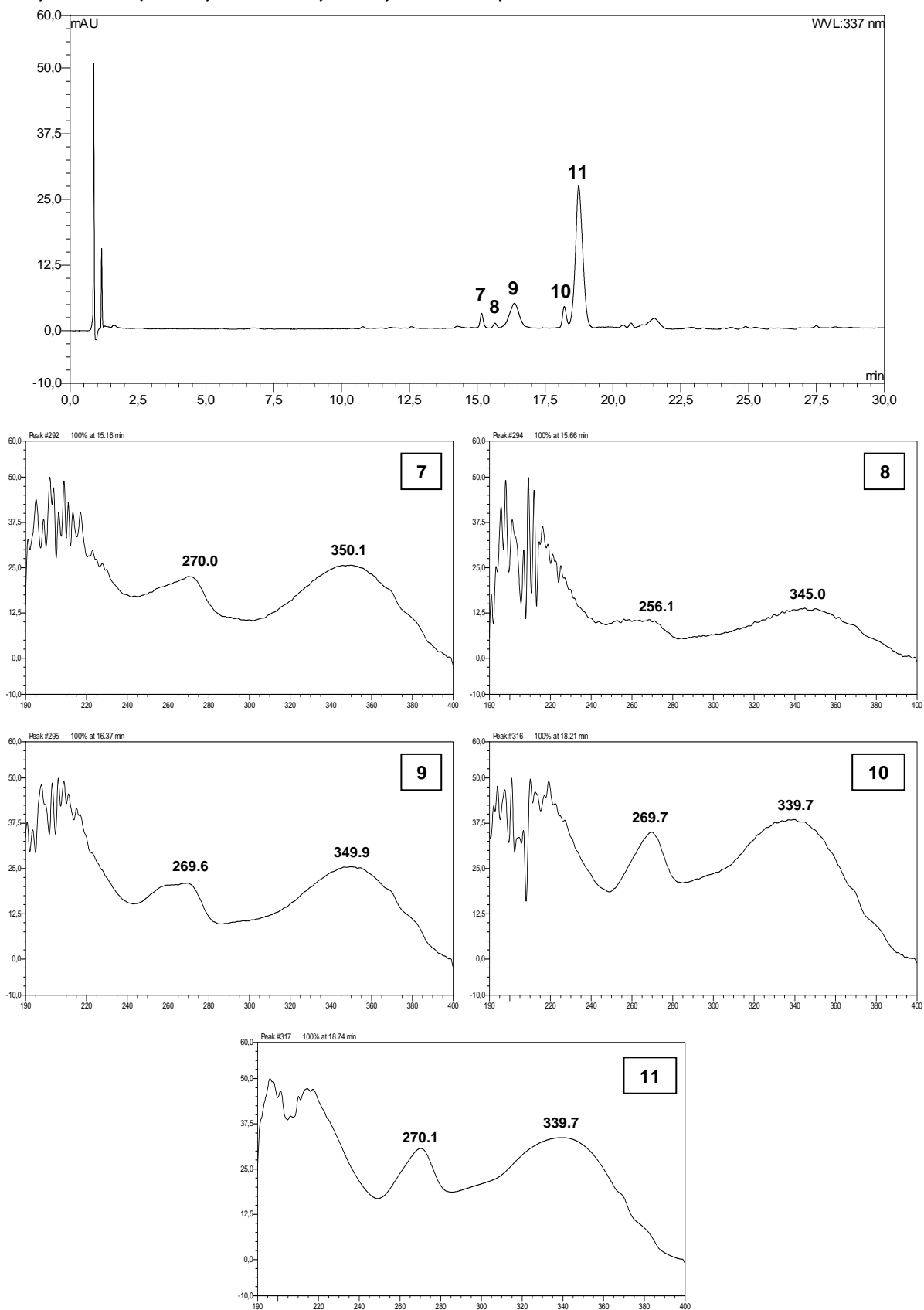


Figura 27 - Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato de *P. capsularis* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (12 a 17). $t_{R12} = 15,1 \text{ min}$; $t_{R13} = 15,6 \text{ min}$; $t_{R14} = 15,8 \text{ min}$; $t_{R15} = 17,3 \text{ min}$; $t_{R16} = 17,8 \text{ min}$; $t_{R17} = 18,6 \text{ min}$.

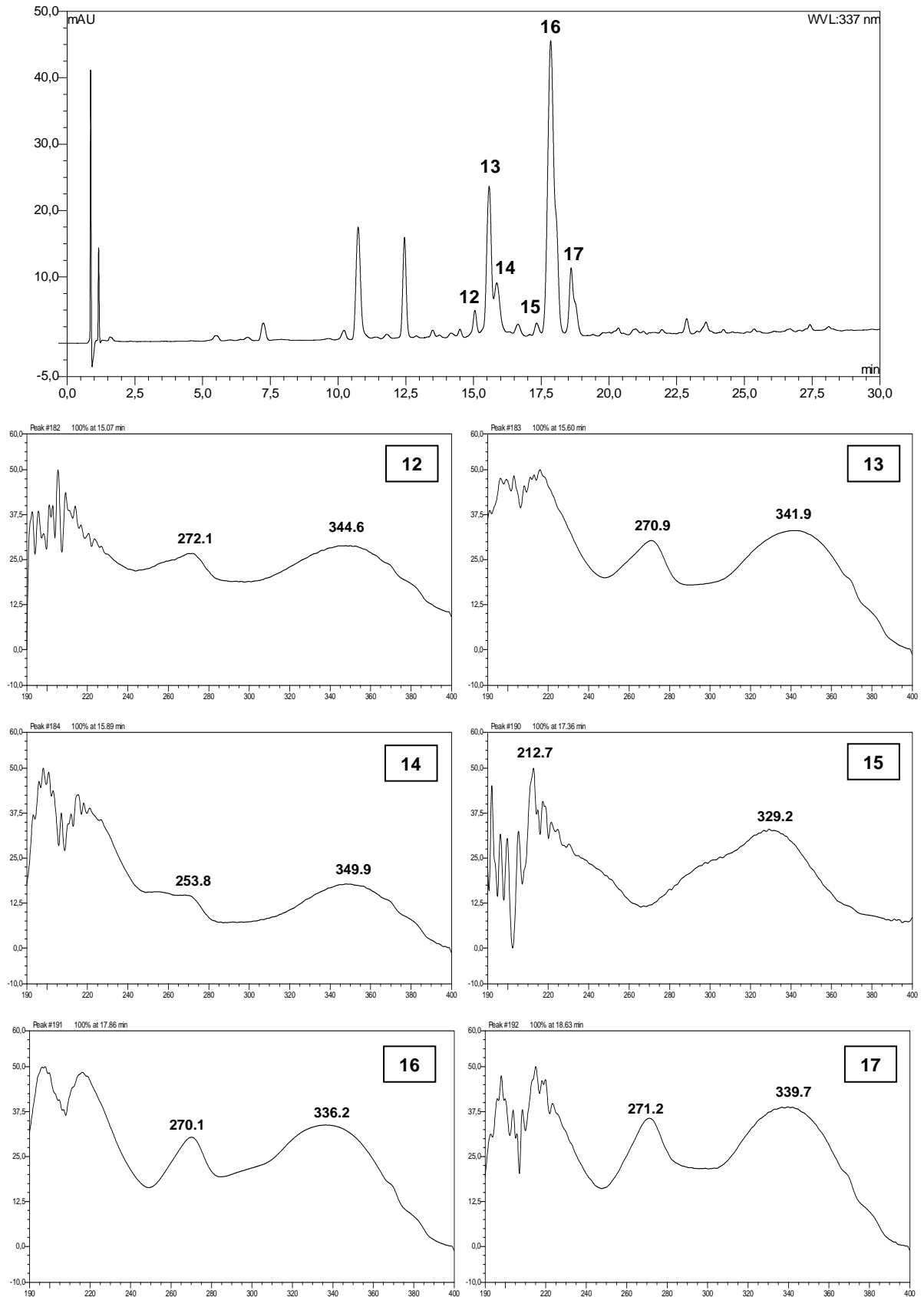


Figura 28 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. cincinnata* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (18 a 23). $t_{R18} = 15,1$ min; $t_{R19} = 15,6$ min; $t_{R20} = 16,5$ min; $t_{R21} = 17,3$ min; $t_{R22} = 18,2$ min; $t_{R23} = 18,7$ min.

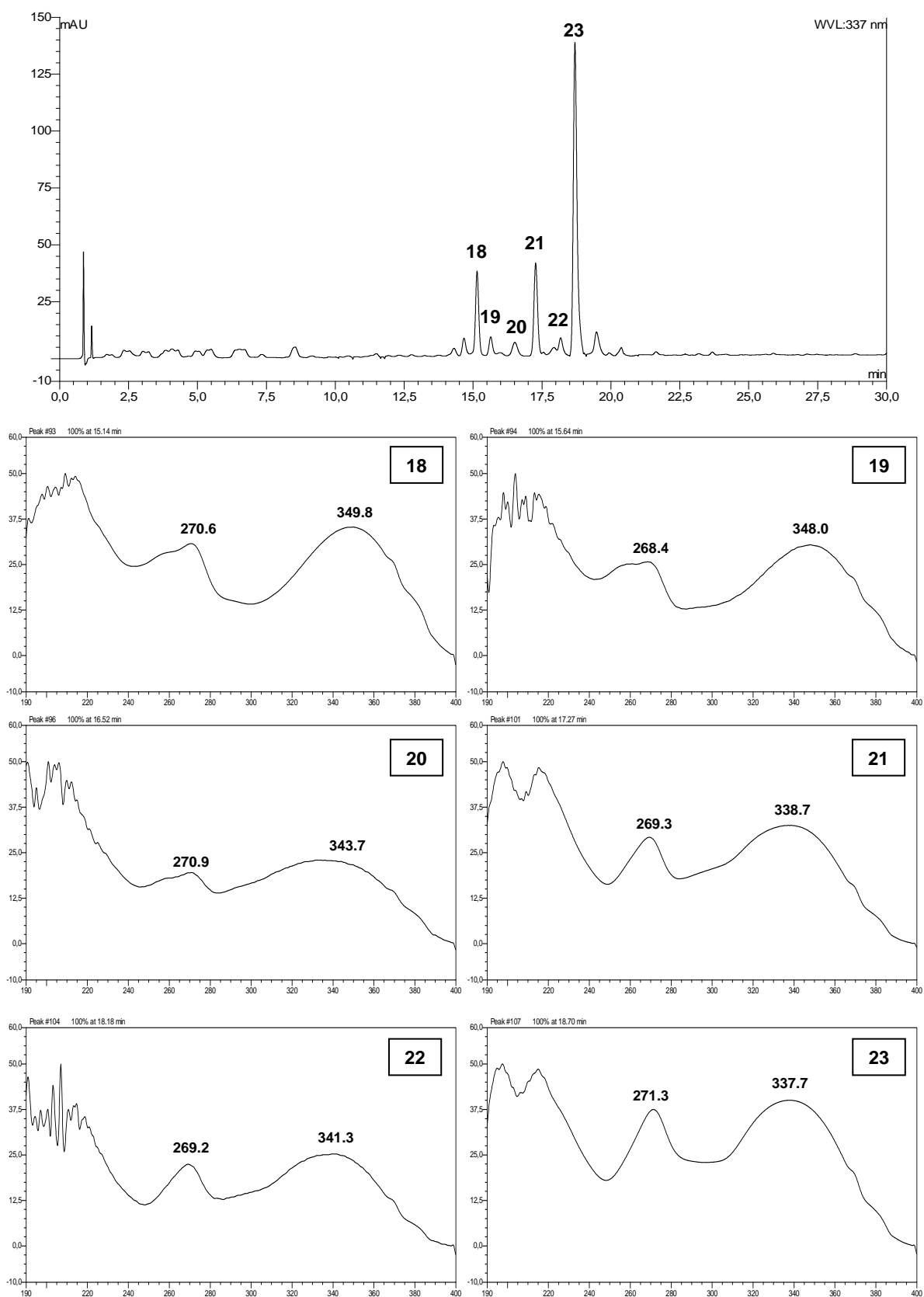


Figura 29 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. edulis f. edulis* e espectros de absorção no UV das bandas cromatográficas assinaladas (24 a 29). $t_{R24} = 10,3$ min; $t_{R25} = 12,5$ min; $t_{R26} = 15,2$ min; $t_{R27} = 15,7$ min; $t_{R28} = 18,2$ min; $t_{R29} = 18,7$ min.

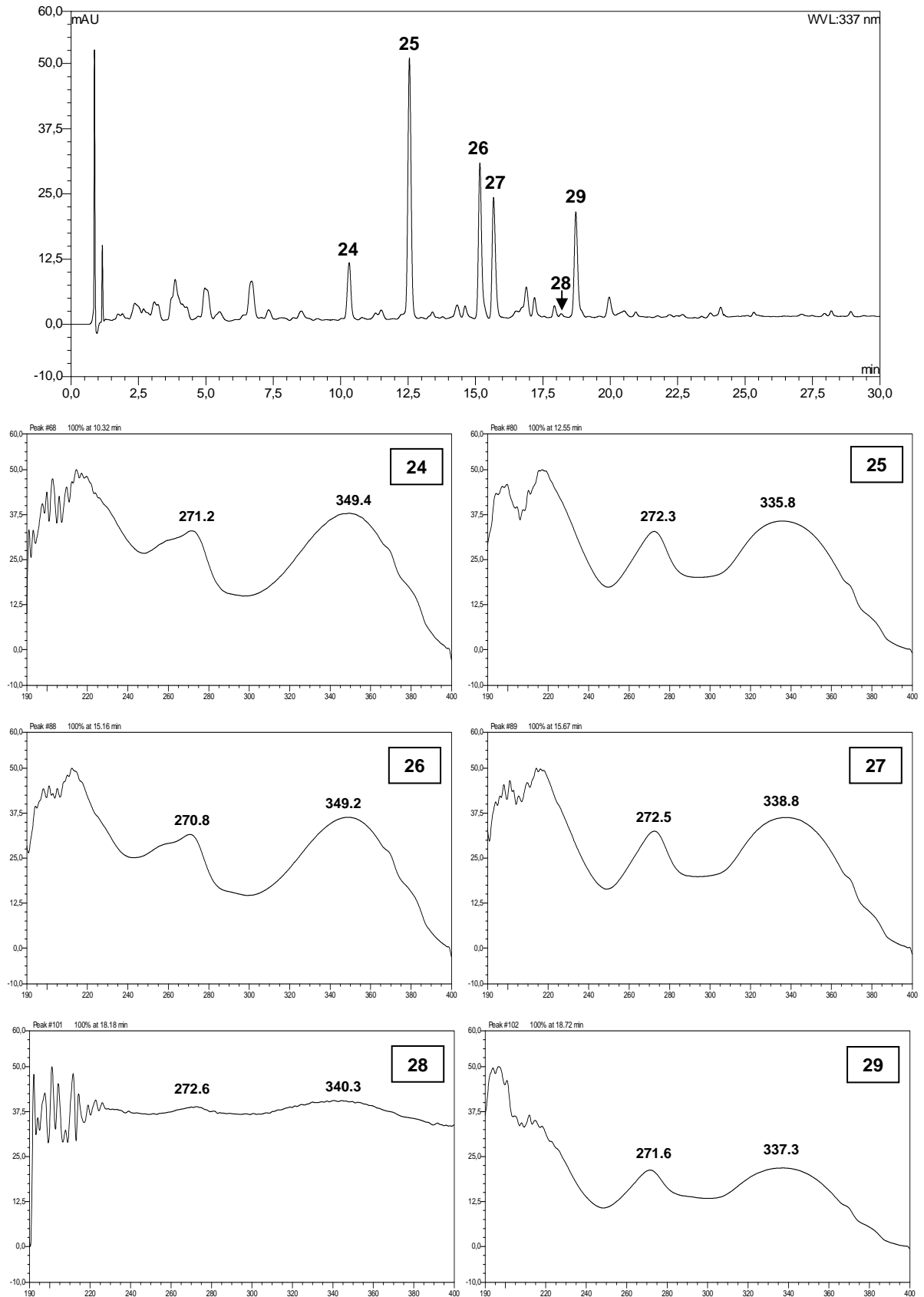


Figura 30 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. galbana* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (30 a 35). $tR30 = 15,1$ min; $tR31 = 15,9$ min; $tR32 = 17,5$ min; $tR33 = 18,6$ min; $tR34 = 19,1$ min; $tR35 = 20,1$ min.

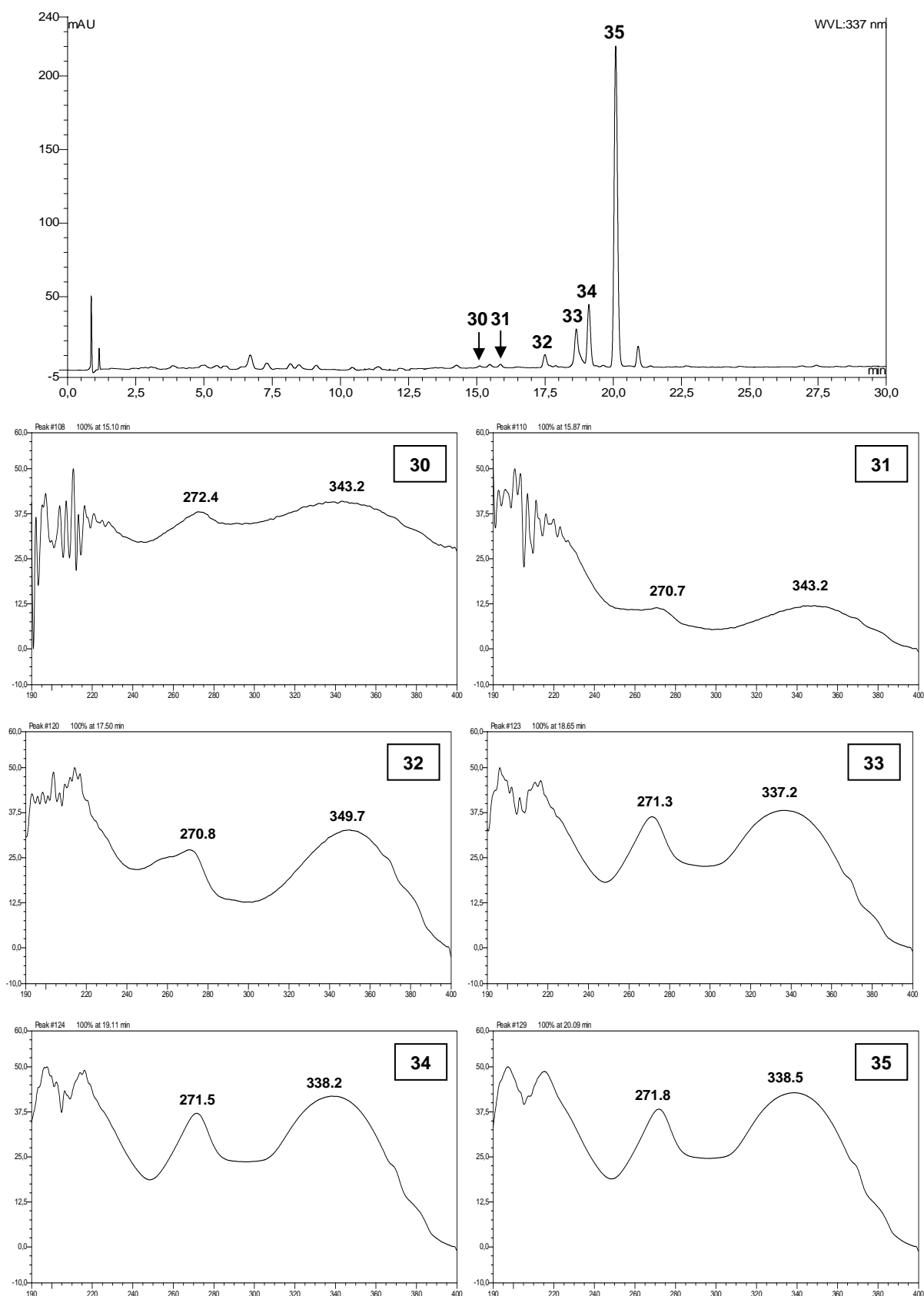


Figura 31 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. gibertii* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (36 a 41). $t_{R36} = 15,8$ min; $t_{R37} = 16,4$ min; $t_{R38} = 18,1$ min; $t_{R39} = 18,6$ min; $t_{R40} = 18,9$ min; $t_{R41} = 20,8$ min.

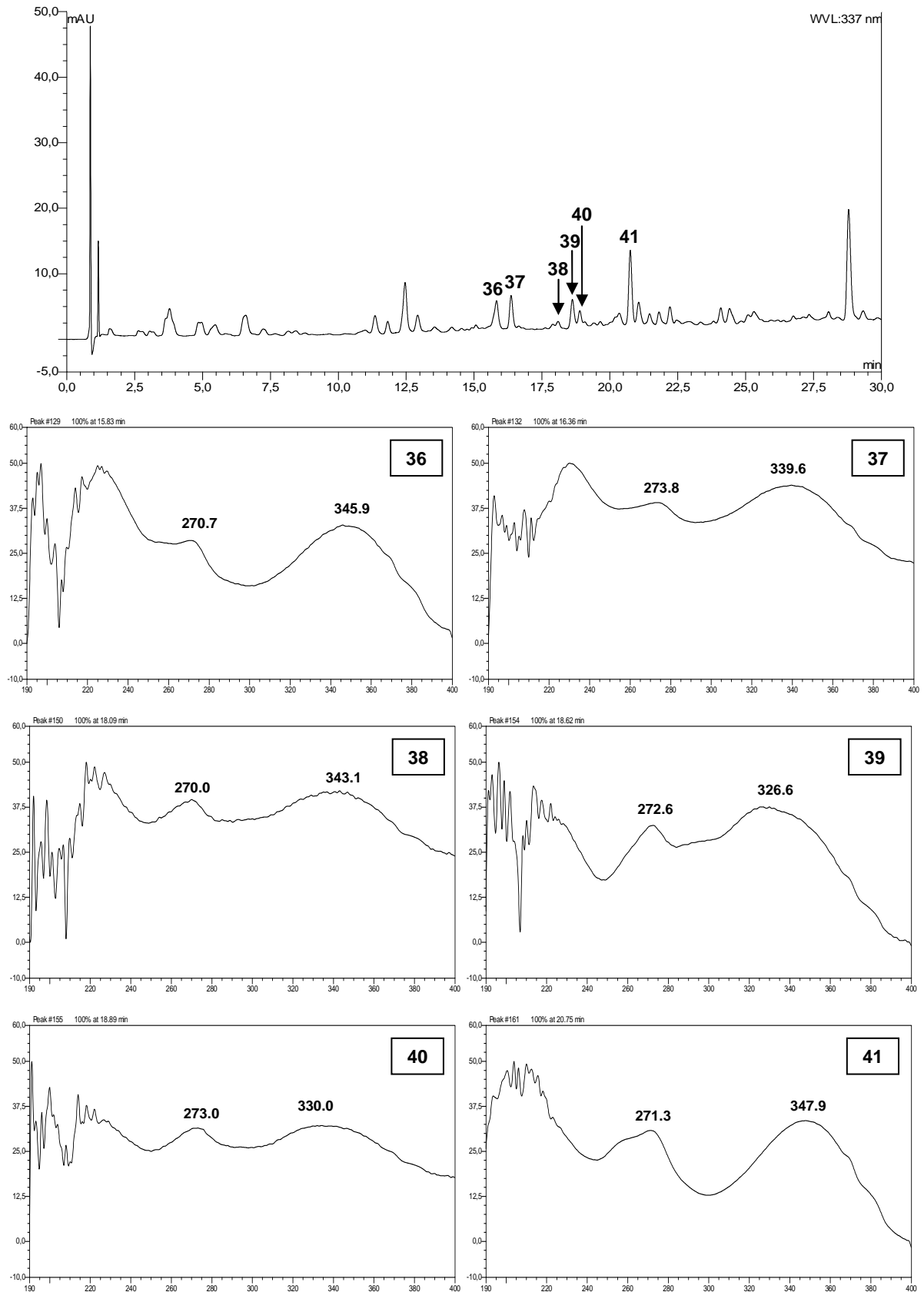


Figura 32 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. malacophylla* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (42 a 47). $t_{R42} = 12,5$ min; $t_{R43} = 14,3$ min; $t_{R44} = 15,2$ min; $t_{R45} = 15,7$ min; $t_{R46} = 18,2$ min; $t_{R47} = 18,7$ min.

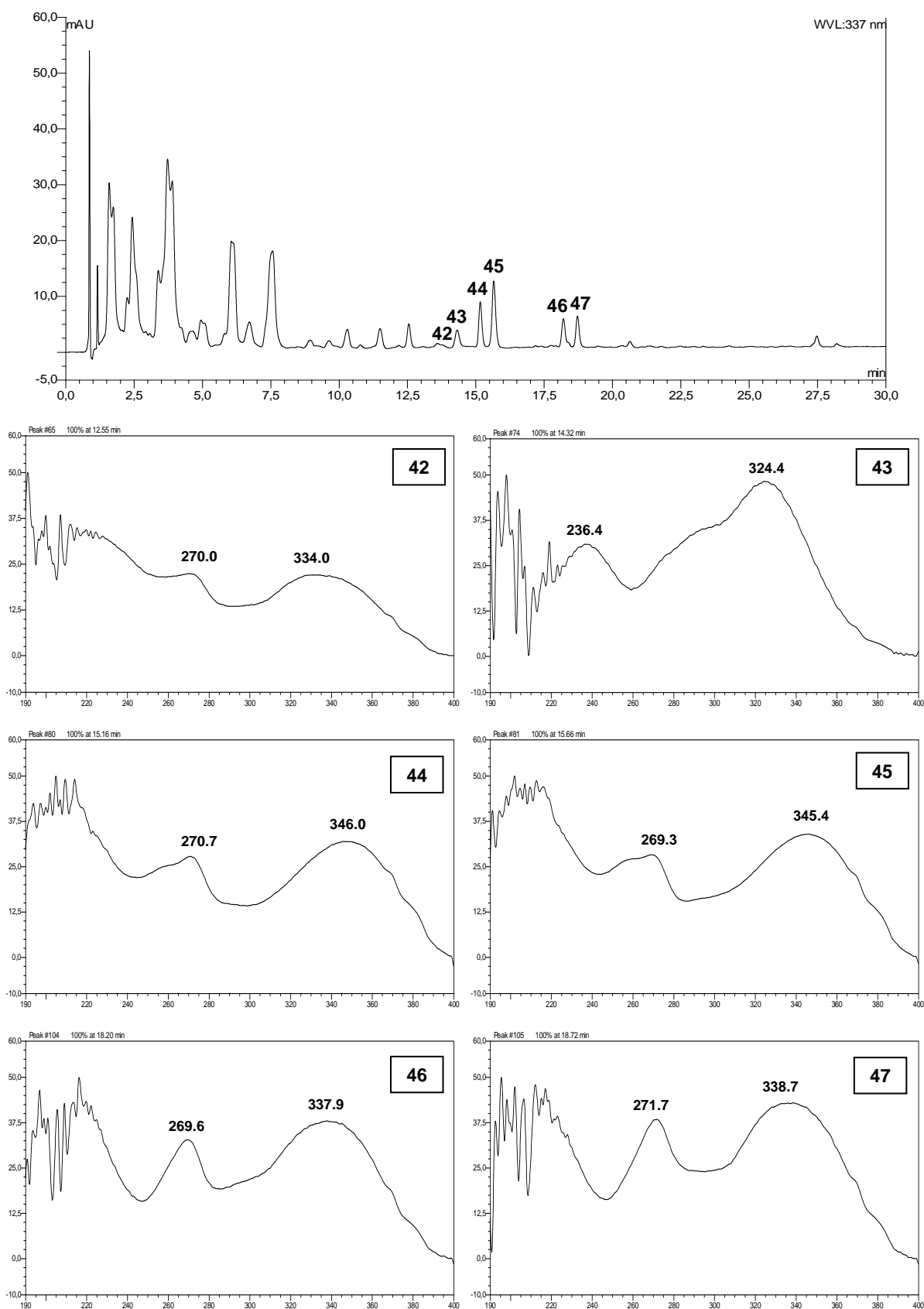


Figura 33 - Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato de *P. maliformis* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (48 a 53). $t_{R48} = 14,3 \text{ min}$; $t_{R49} = 15,1 \text{ min}$; $t_{R50} = 15,6 \text{ min}$; $t_{R51} = 16,5 \text{ min}$; $t_{R52} = 17,3 \text{ min}$; $t_{R53} = 18,7 \text{ min}$.

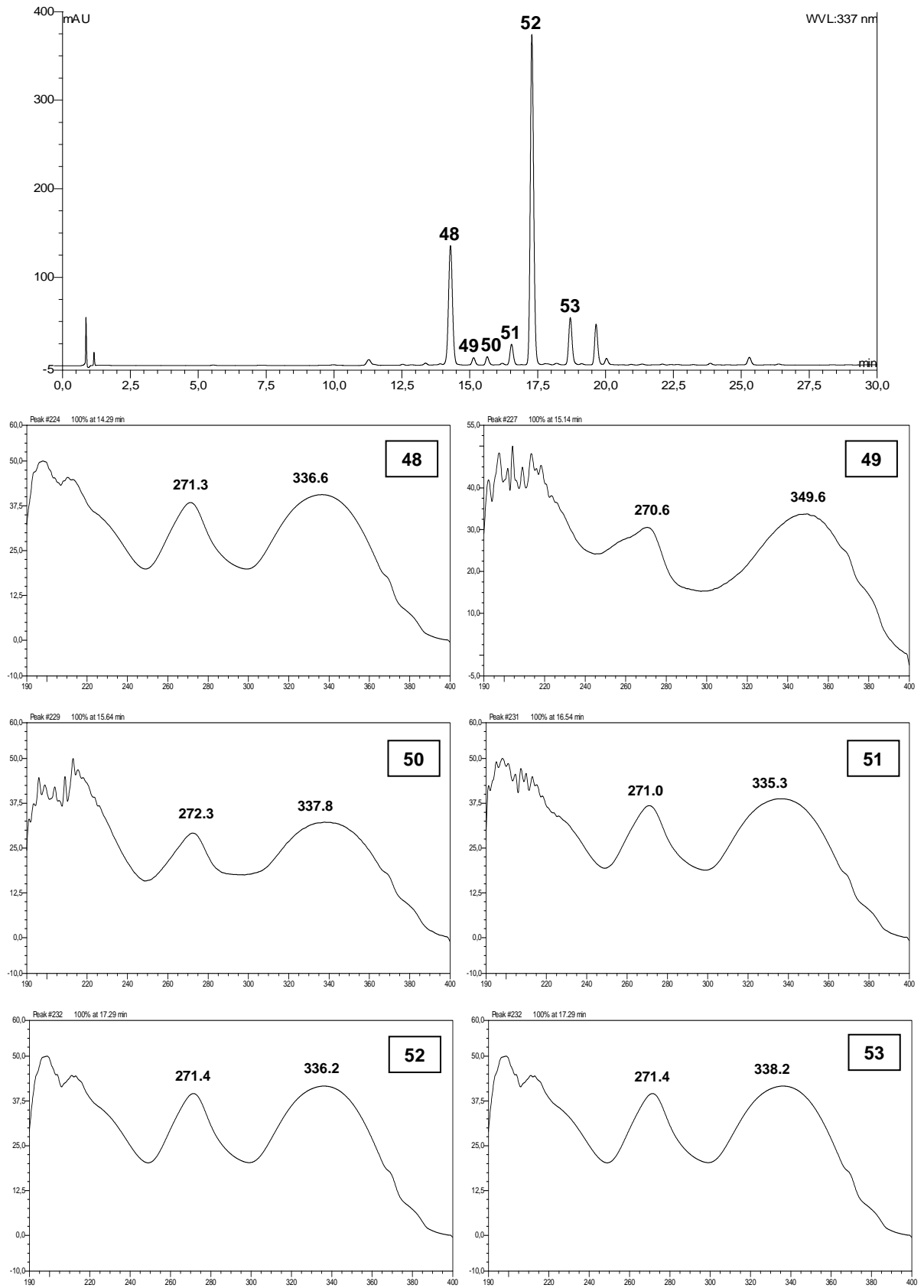


Figura 34 - Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato de *P. morifolia* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (54 a 59). $t_{R54} = 14,3 \text{ min}$; $t_{R55} = 15,1 \text{ min}$; $t_{R56} = 15,6 \text{ min}$; $t_{R57} = 18,1 \text{ min}$; $t_{R58} = 18,7 \text{ min}$; $t_{R59} = 27,0 \text{ min}$.

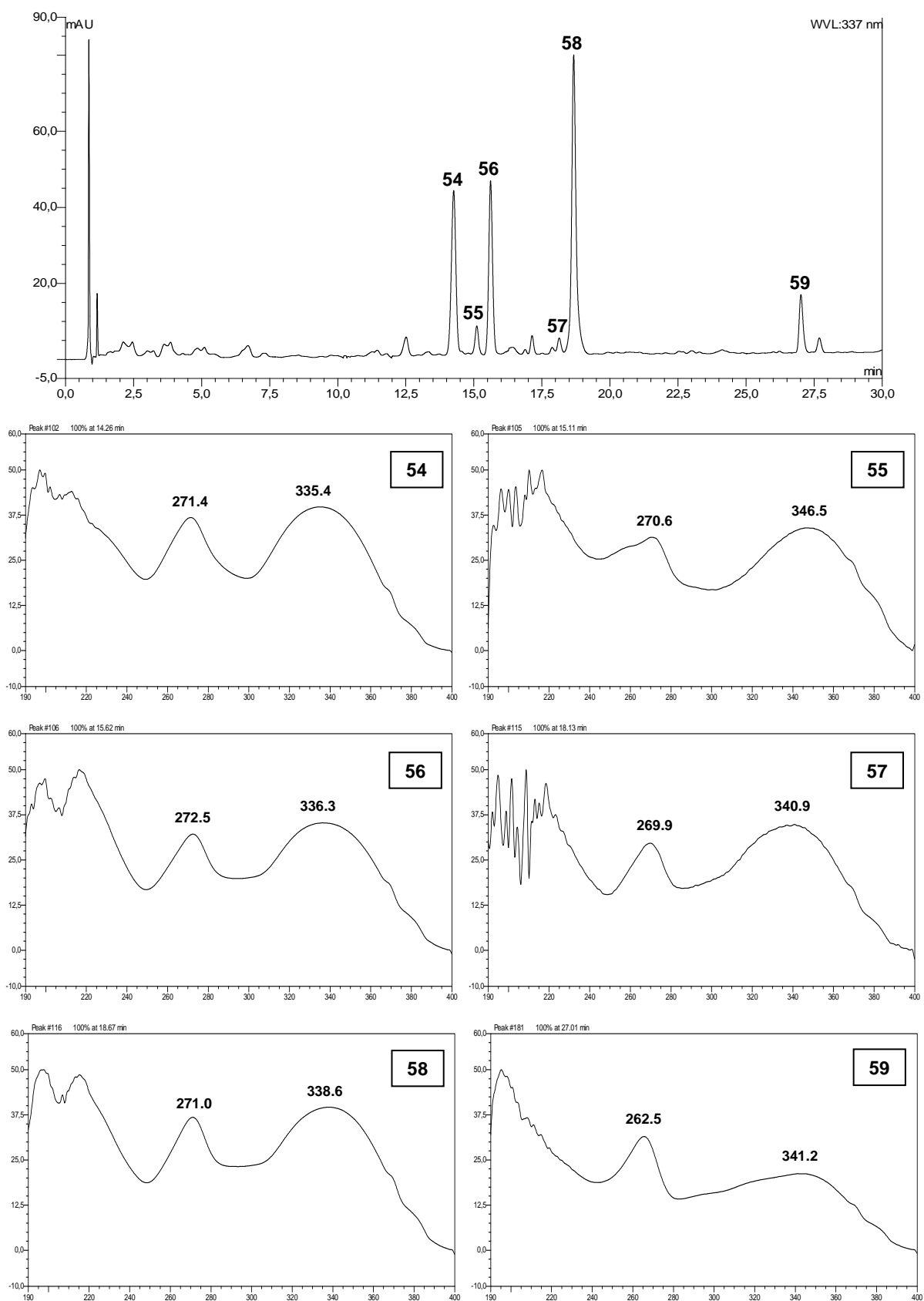


Figura 35 - Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato de *P. mucronata* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (60 a 65). $t_{R60} = 15,5 \text{ min}$; $t_{R61} = 15,9 \text{ min}$; $t_{R62} = 17,5 \text{ min}$; $t_{R63} = 18,8 \text{ min}$; $t_{R64} = 19,1 \text{ min}$; $t_{R65} = 20,1 \text{ min}$.

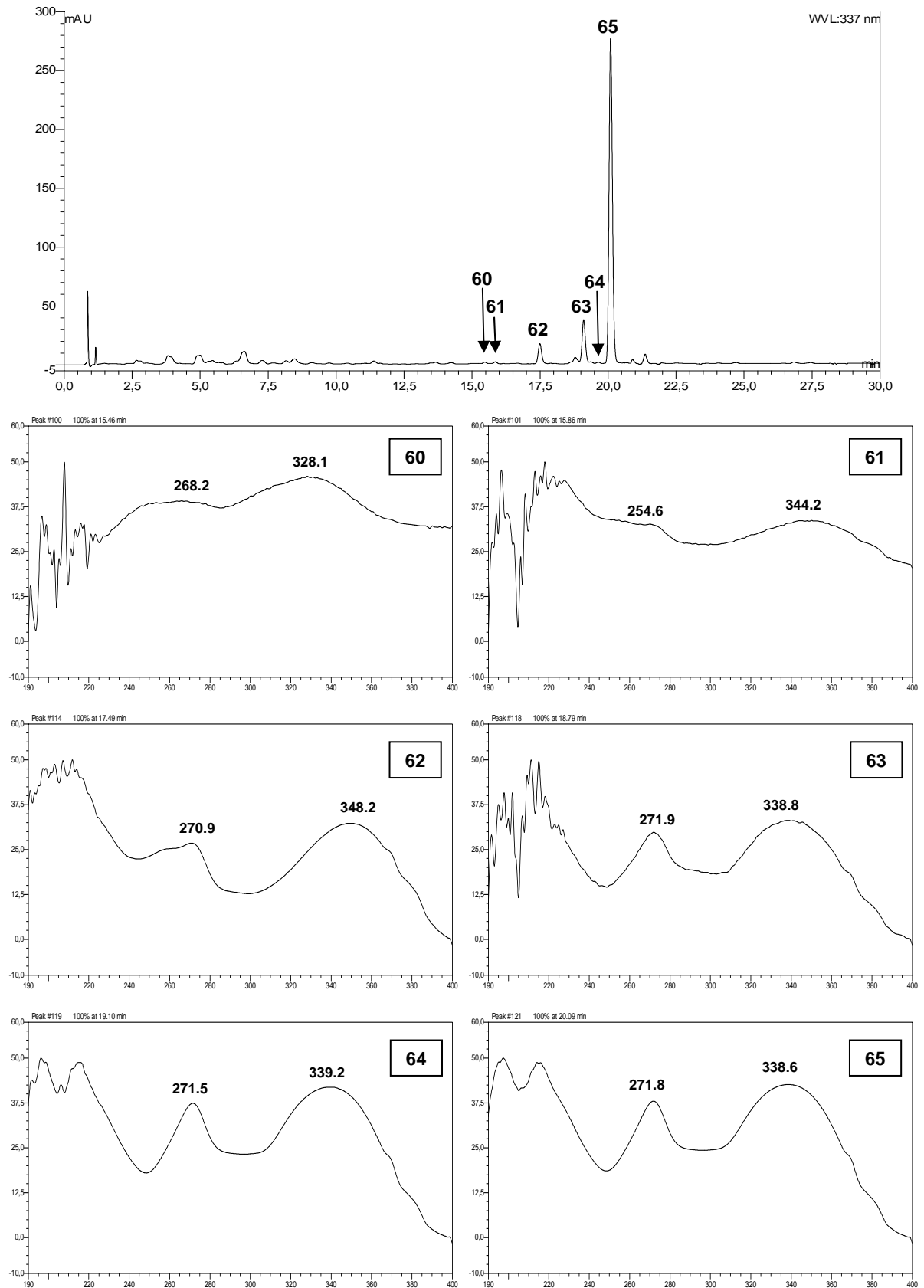


Figura 36 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. quadrangularis* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (66 a 71). $t_{R66} = 15,5$ min; $t_{R67} = 15,8$ min; $t_{R68} = 16,4$ min; $t_{R69} = 17,9$ min; $t_{R70} = 18,1$ min; $t_{R71} = 18,7$ min.

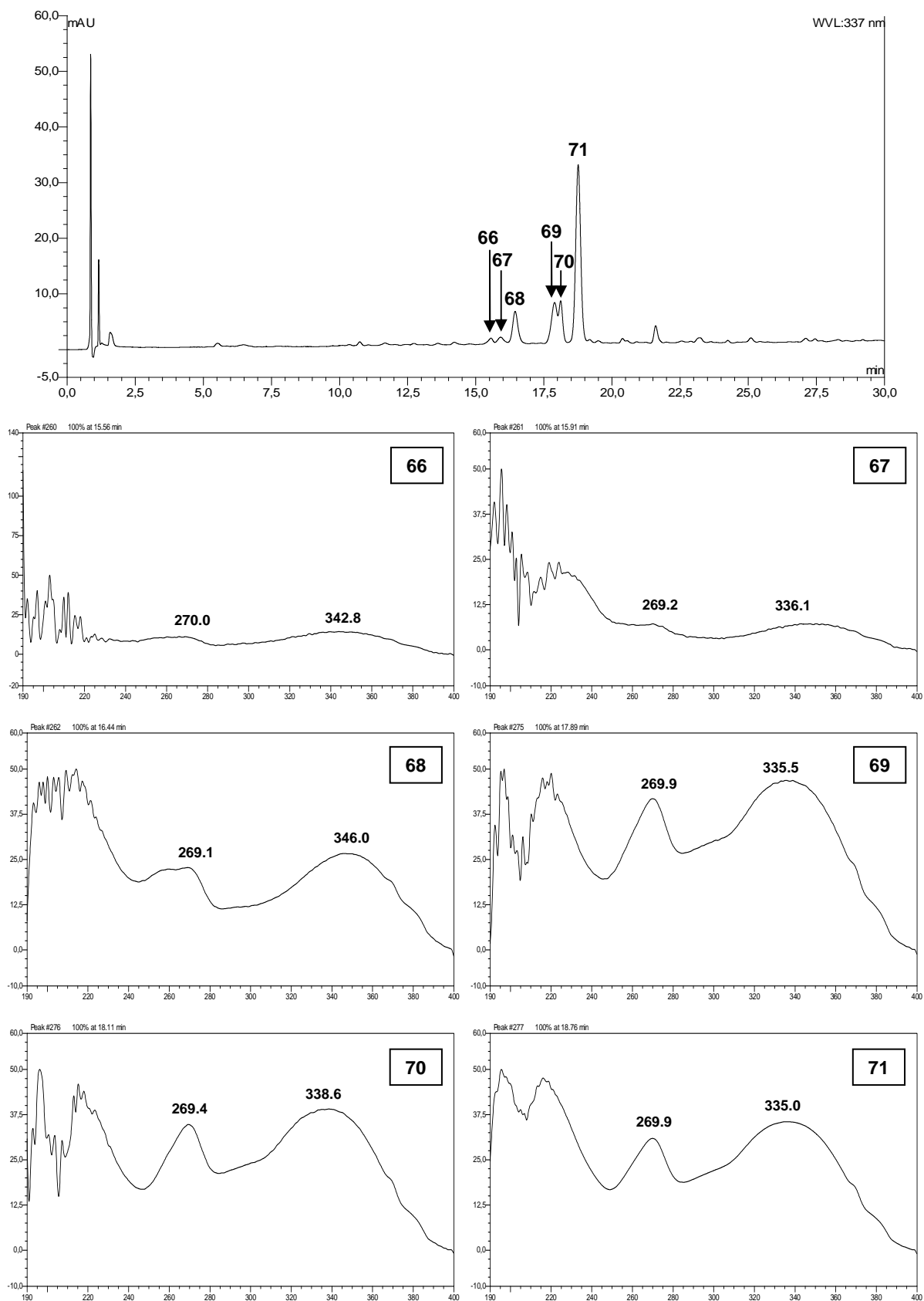


Figura 37 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. racemosa* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (72 a 77). $t_{R72} = 12,5$ min; $t_{R73} = 14,2$ min; $t_{R74} = 15,6$ min; $t_{R75} = 18,1$ min; $t_{R76} = 18,7$ min; $t_{R77} = 18,9$ min.

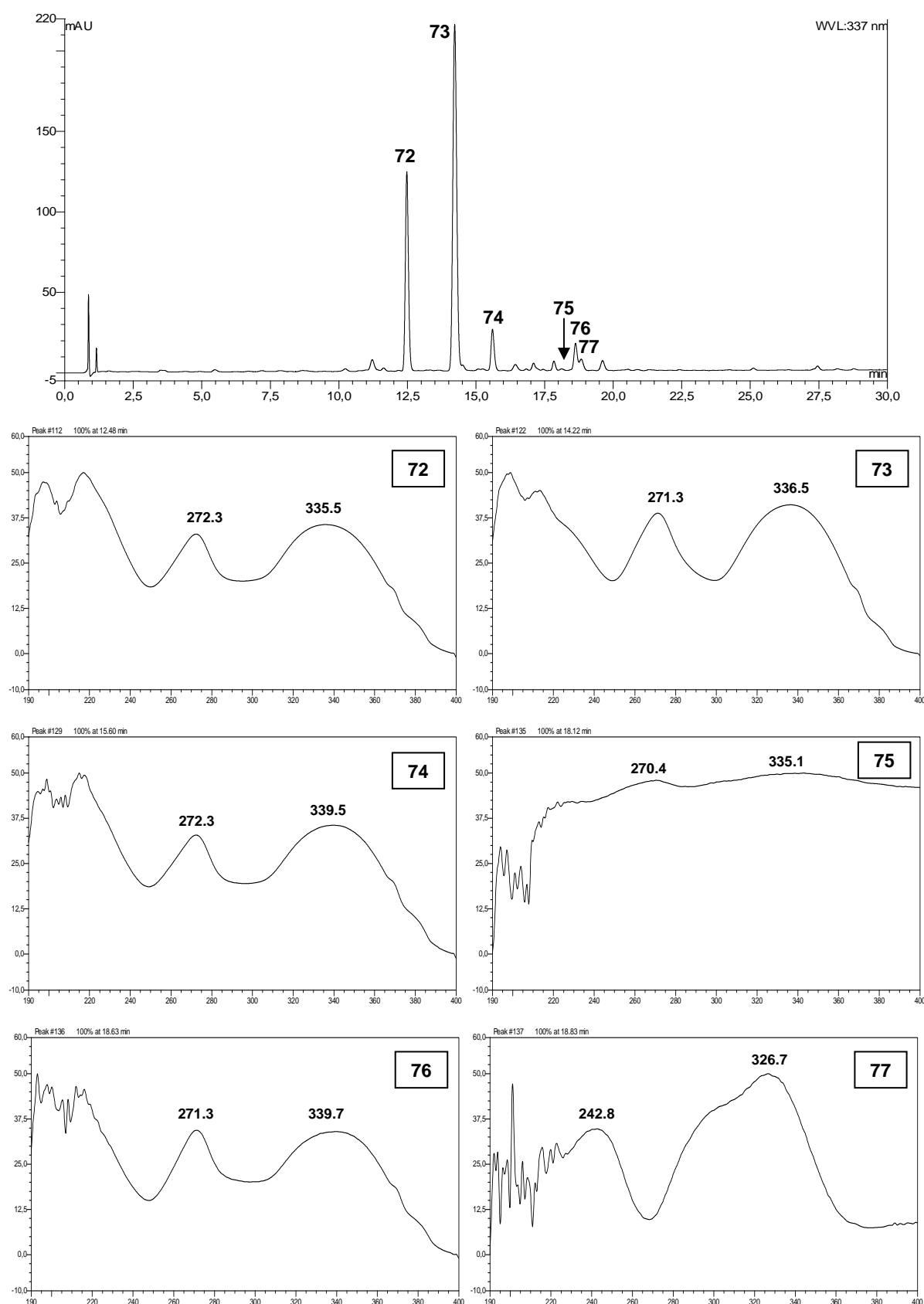


Figura 38 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. setacea* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (78 a 83). $t_{R78} = 12,5$ min; $t_{R79} = 15,1$ min; $t_{R80} = 15,6$ min; $t_{R81} = 17,5$ min; $t_{R82} = 18,1$ min; $t_{R83} = 18,6$ min.

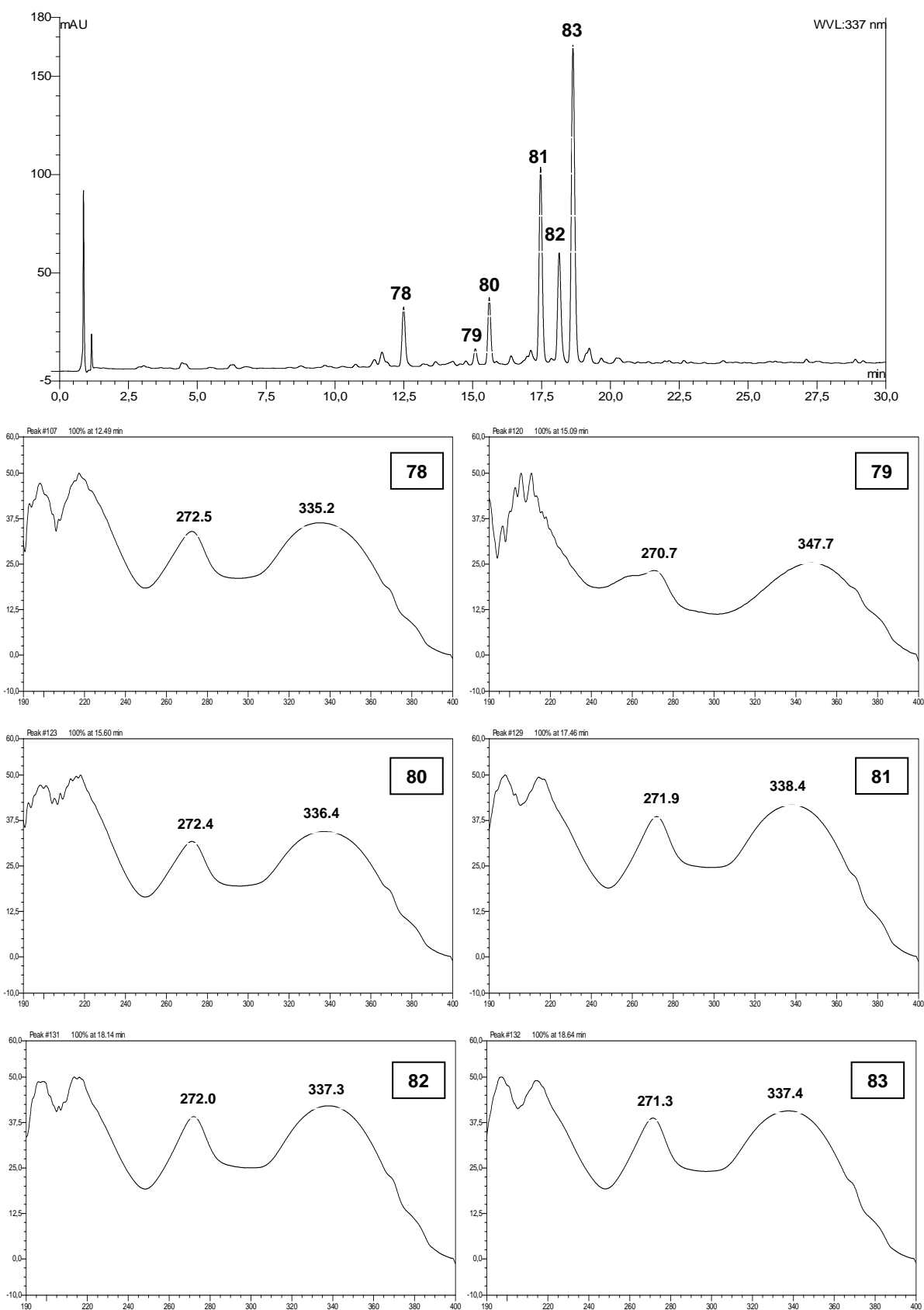


Figura 39 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. suberosa* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (84 a 89). $t_{R84} = 12,2$ min; $t_{R85} = 15,1$ min; $t_{R86} = 15,4$ min; $t_{R87} = 18,2$ min; $t_{R88} = 18,6$ min; $t_{R89} = 18,9$ min.

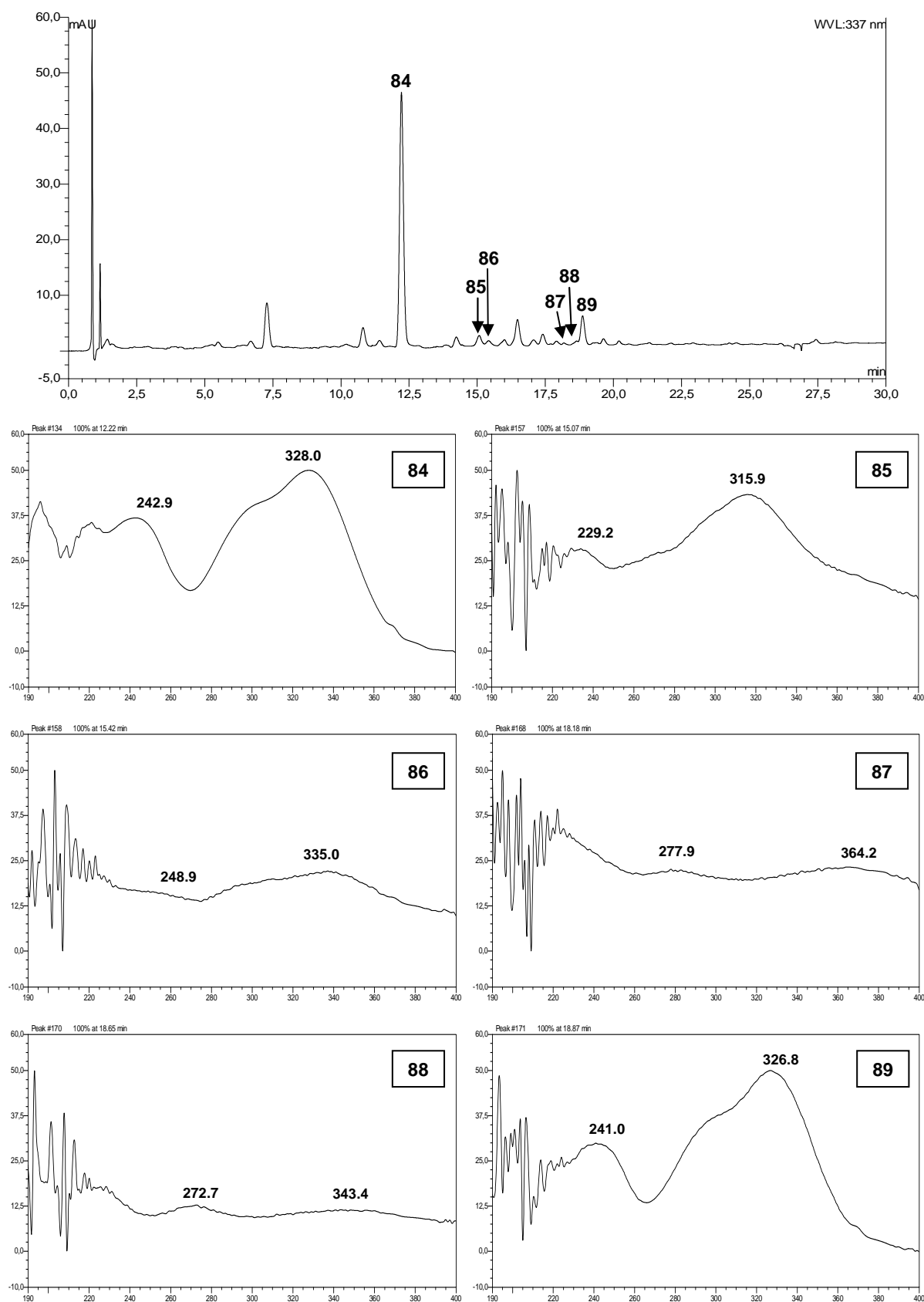


Figura 40 - Cromatograma ($\lambda = 337$ nm) do extrato de *P. tenuifila* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (90 a 95). $tR_{90} = 15,1$ min; $tR_{91} = 15,8$ min; $tR_{92} = 18,7$ min; $tR_{93} = 18,9$ min; $tR_{94} = 19,1$ min; $tR_{95} = 20,8$ min.

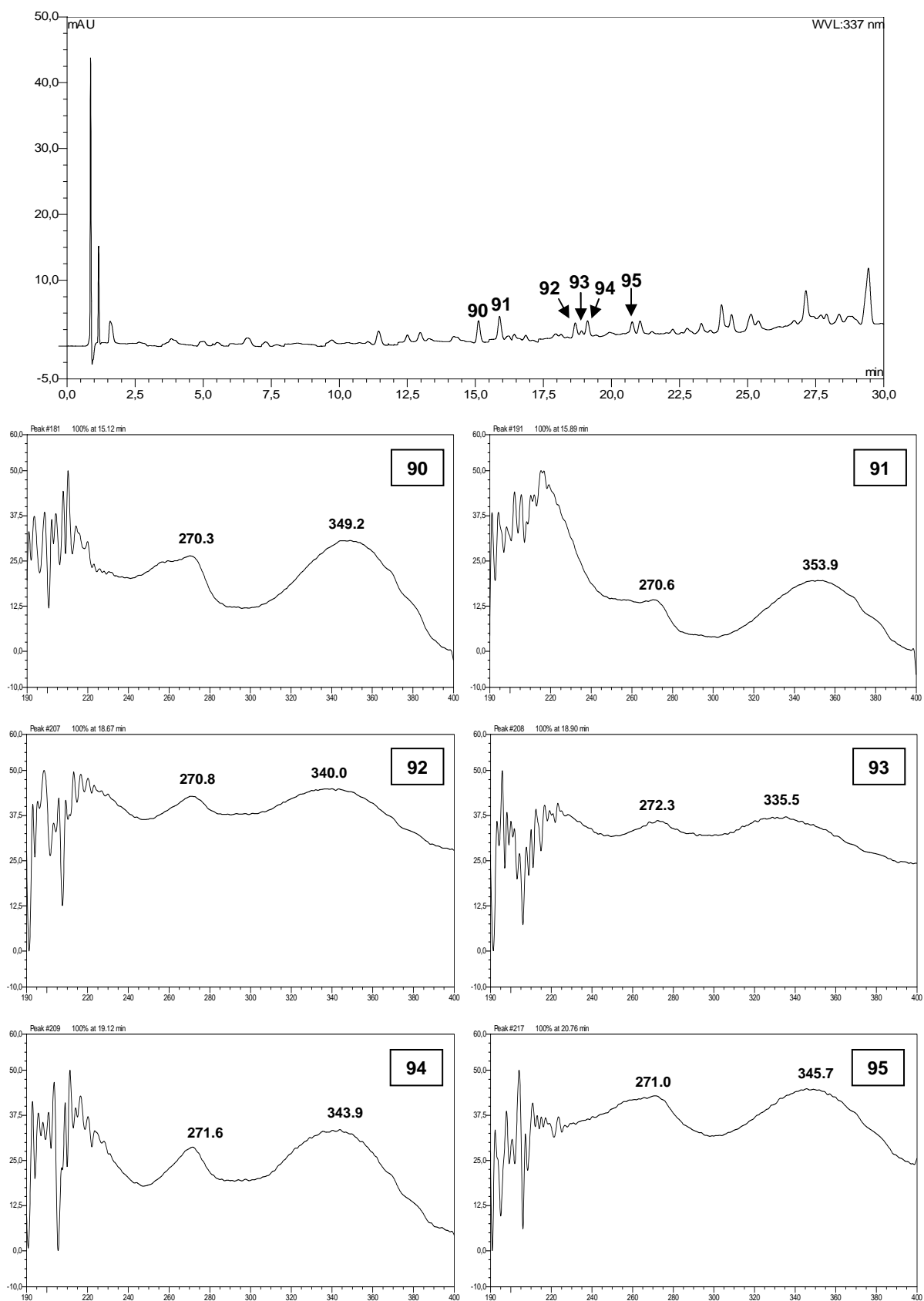
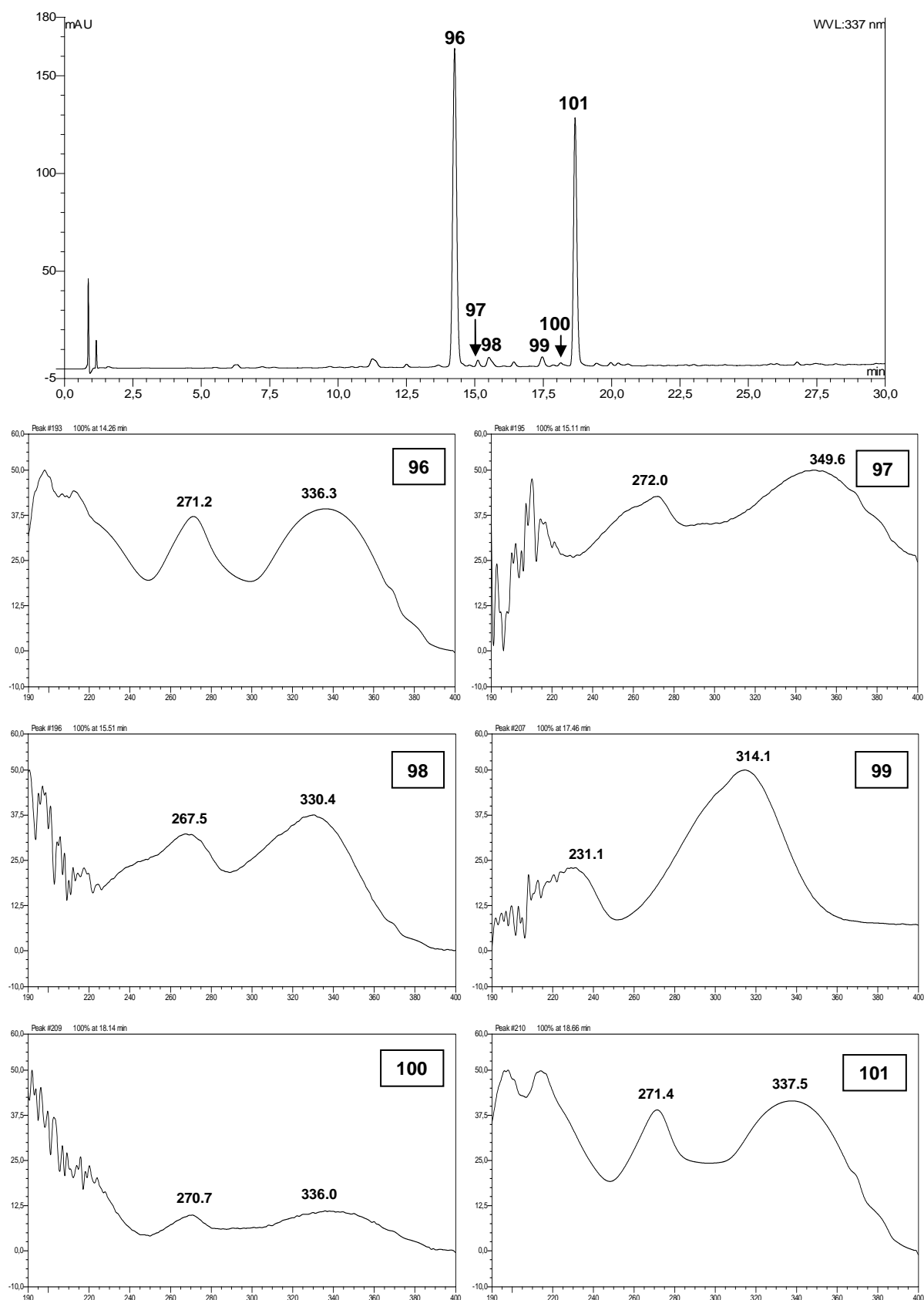


Figura 41 - Cromatograma ($\lambda = 337 \text{ nm}$) do extrato de *P. vitifolia* e espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas (96 a 101). $t_{R96} = 14,3 \text{ min}$; $t_{R97} = 15,1 \text{ min}$; $t_{R98} = 15,5 \text{ min}$; $t_{R99} = 17,5 \text{ min}$; $t_{R100} = 18,1 \text{ min}$; $t_{R101} = 18,7 \text{ min}$.



Pela análise dos perfis cromatográficos (ou *fingerprints*) por CLAE-DAD obtidos para as dezessete espécies de *Passiflora* pode-se verificar que os cromatogramas são visualmente bastante diferentes entre si. Esses cromatogramas podem permitir a sua aplicação no controle de qualidade químico, na identificação e determinação da autenticidade de fitoterápicos produzidos a partir de diferentes espécies de *Passiflora* de nossa flora.

6.5. Validação do método analítico para o perfil cromatográfico de espécies de *Passiflora*

Uma vez que os perfis cromatográficos são métodos qualitativos, para que se possam validar tais métodos, é necessário que alguns parâmetros sejam avaliados, como por exemplo, a repetibilidade e a precisão de injeção^{137,138}.

Sendo assim, amostras vegetais de *P. alata*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. malacophylla*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. vitifolia* e *P. tenuifila* foram preparadas em triplicata, conforme procedimento experimental descrito no item 5.6.1, obtendo um total de 51 amostras que foram analisadas no sistema CLAE/DAD (item 5.7), visualizadas nas Figuras 42 a 44.

Com as análises obtidas a partir das replicatas (n=3) avaliou-se a repetibilidade, baseado nos valores de tempo de retenção (tR) e área das bandas cromatográficas. Além disso, uma das amostras (*P. edulis* f. *flavicarpa*) foi analisada em quintuplicata, para que se pudessem avaliar a precisão da injeção.

Para avaliar a repetibilidade foram considerados três ou quatro bandas cromatográficas, que estão presentes em todas as espécies estudadas em tR entre 15,1 e 15,5; tR entre 15,5 e 15,9; tR entre 18,1 e 18,2 e tR entre 18,6 e 18,8.

Neste estudo foi estabelecido como critério de aceitação da repetibilidade um coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 15%, que está de acordo com o que preconiza o Guia da Anvisa, para quantificação em métodos bioanalítico¹³⁹.

Figura 42 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de *P. alata* (A), *P. capsularis* (B), *P. cincinnata* (C), *P. edulis* f. *flavicarpa* (D), *P. edulis* f. *edulis* (E), *P. galbana* (F), *P. gibertii* (G), *P. malacophylla* (H).

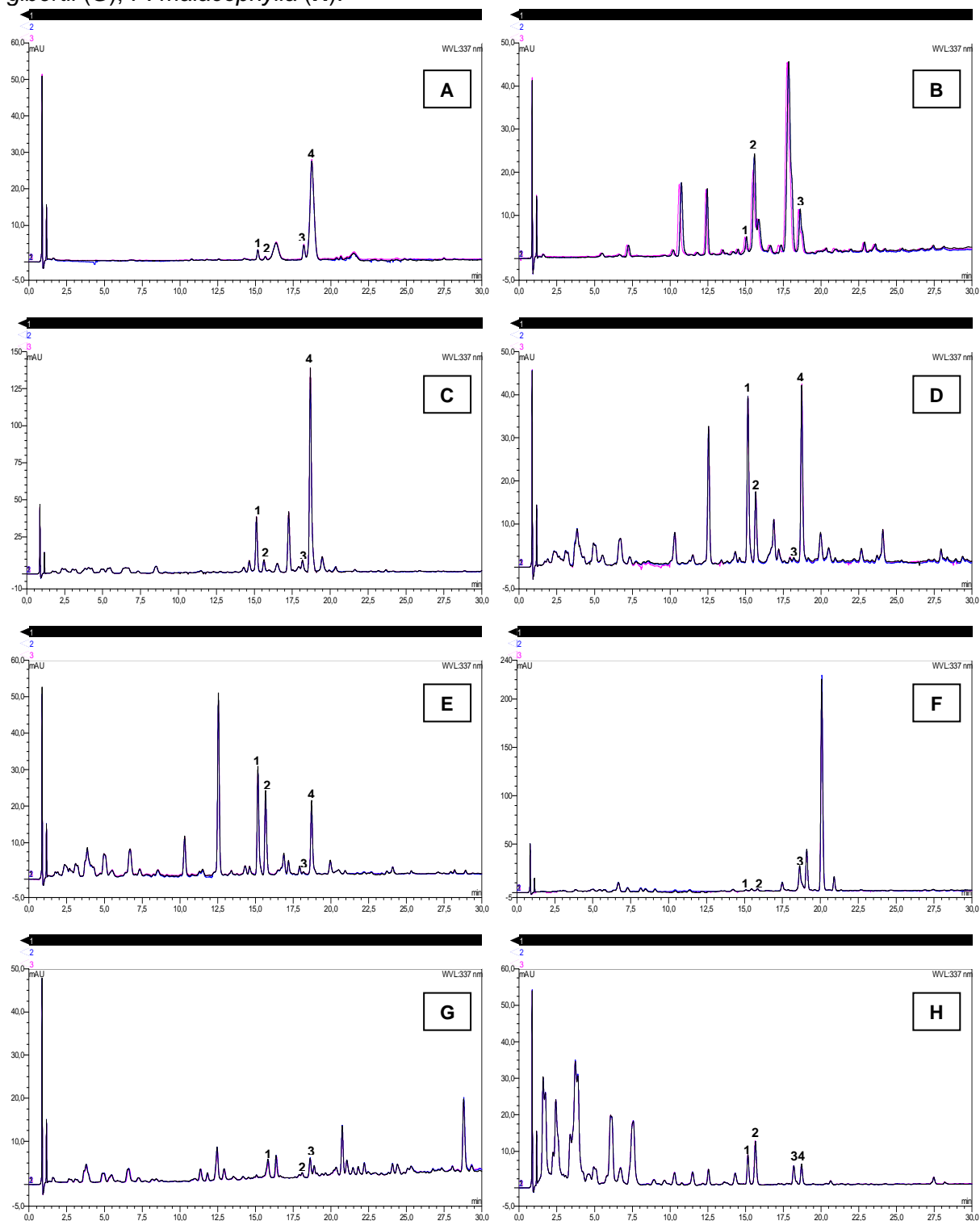


Figura 43 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de *P. maliformis* (I), *P. morifolia* (J), *P. mucronata* (K), *P. quadrangularis* (L), *P. racemosa* (M), *P. setacea* (N), *P. suberosa* (O), *P. tenuifila* (P).

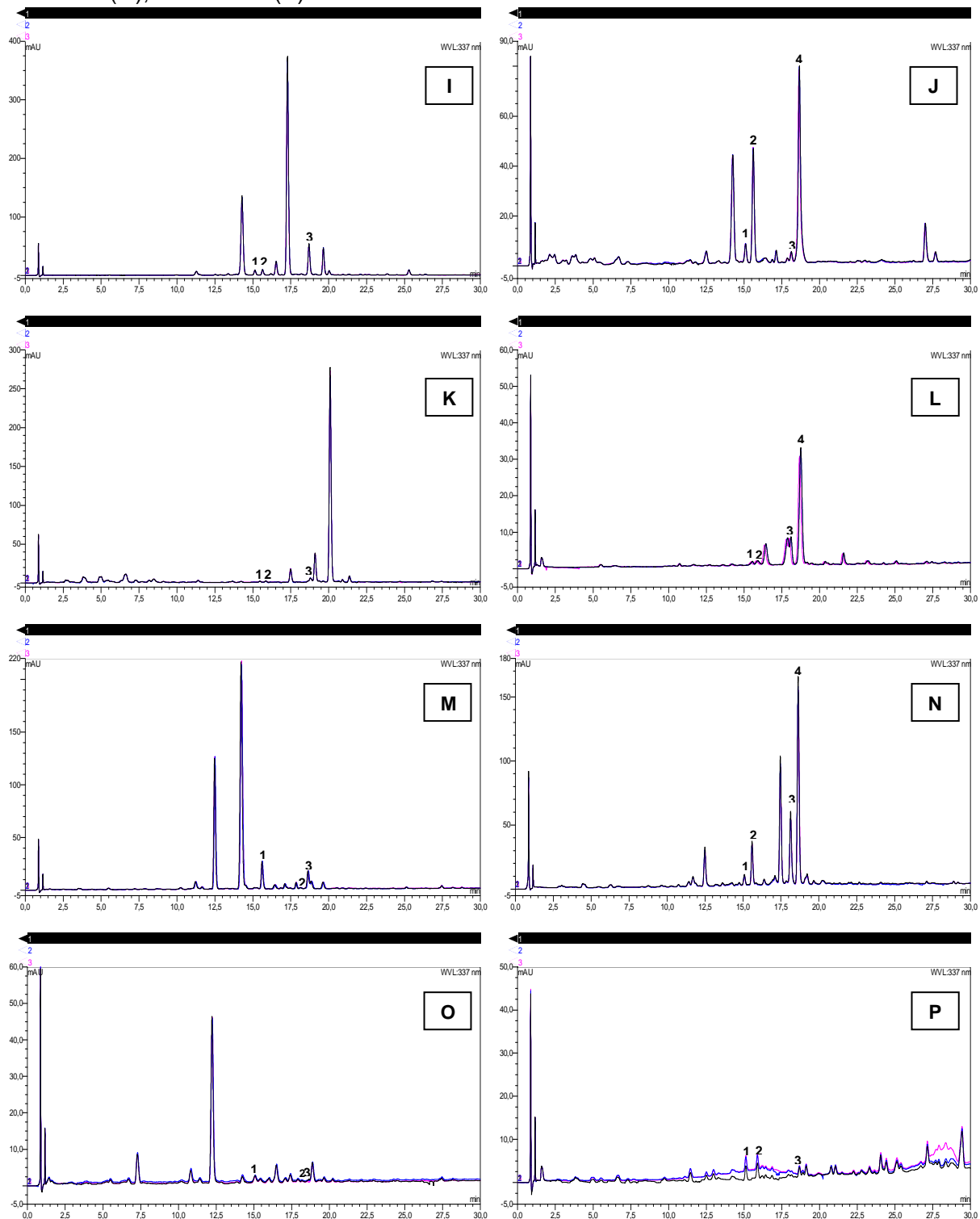
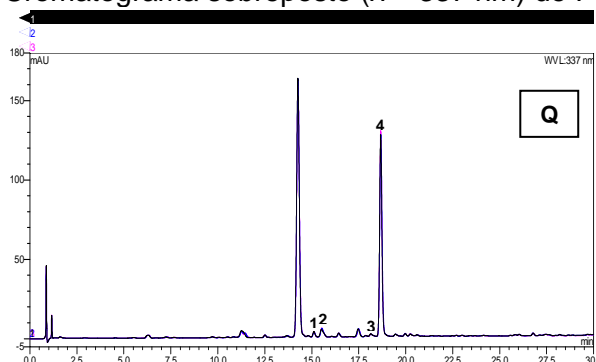


Figura 44 - Cromatograma sobreposto ($\lambda = 337$ nm) de *P. vitifolia* (Q).

Pelos resultados obtidos, apresentados na Tabela 19, os valores encontrados para o coeficientes de variação estão abaixo do limite de 15% para todos as amostras vegetais analisadas, conforme é recomendado. Esses valores representam tanto a variabilidade instrumental quanto a reprodutibilidade do preparo de amostras.

Tabela 19 - Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (tR) e as áreas das bandas cromatográficas, numeradas nas Figuras 42 a 44, avaliadas nas análises de amostras de *Passiflora* (repetibilidade).

Espécie	Banda	Média (n=3)	CV (%)
<i>P. alata</i>	1 tR	15,2	0,03
	1 área	0,39	3,39
	2 tR	15,7	0,07
	2 área	0,12	3,47
	3 tR	18,2	0,05
	3 área	0,54	0,73
	4 tR	18,7	0,03
	4 área	8,13	0,63
<i>P. cincinnata</i>	1 tR	15,1	0,10
	1 área	4,74	3,53
	2 tR	15,6	0,11
	2 área	1,04	5,80
	3 tR	18,2	0,11
	3 área	0,63	2,02
	4 tR	18,7	0,09
	4 área	20,50	2,26
<i>P. capsularis</i>	1 tR	15,1	0,40
	1 área	0,49	1,70
	2 tR	15,6	0,28
	2 área	3,23	3,58
	3 tR	18,6	0,33
	3 área	0,85	3,75
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	1 tR	15,2	0,02
	1 área	8,07	0,88
	2 tR	15,7	0,03
	2 área	3,66	1,72

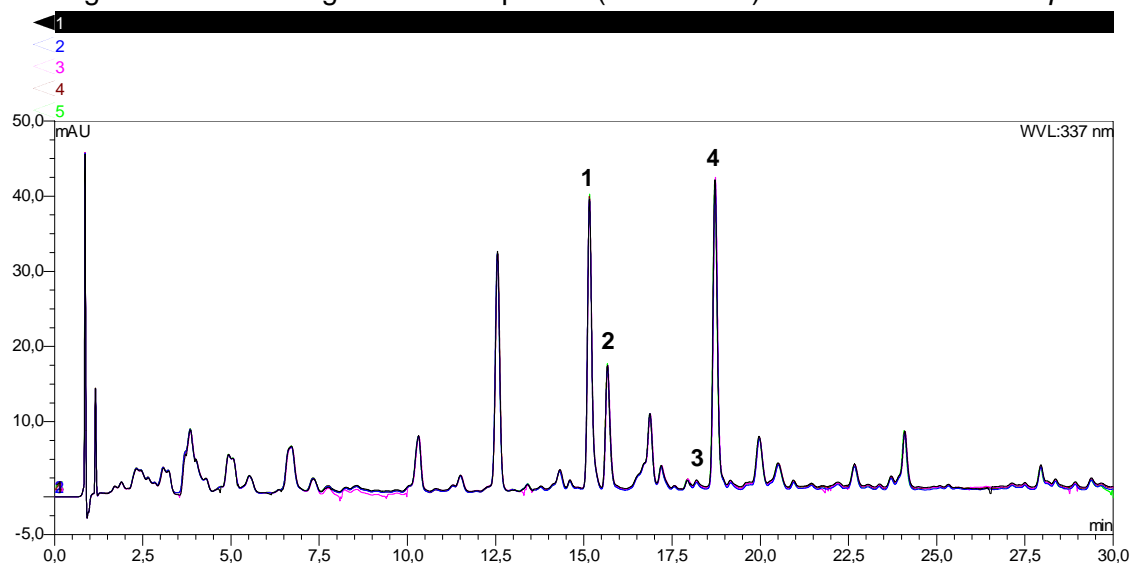
Continua

	3	tR	18,2	0,04
		área	0,56	0,13
	4	tR	18,7	0,03
		área	11,66	1,45
<i>P. edulis f. edulis</i>	1	tR	15,2	0,04
		área	3,98	4,26
	2	tR	15,7	0,03
		área	3,23	3,40
	3	tR	18,2	0,02
		área	0,13	5,97
	4	tR	18,7	0,02
		área	2,90	0,25
<i>P. galbana</i>	1	tR	15,1	0,02
		área	0,13	2,98
	2	tR	15,5	0,01
		área	0,25	4,02
	3	tR	18,6	0,02
		área	5,00	4,23
<i>P. gibertii</i>	1	tR	15,8	0,10
		área	0,99	4,34
	2	tR	18,1	0,08
		área	0,19	0,00
	3	tR	18,6	0,05
		área	0,67	4,58
<i>P. malacophylla</i>	1	tR	15,2	0,04
		área	1,09	1,57
	2	tR	15,7	0,06
		área	1,88	0,59
	3	tR	18,2	0,04
		área	0,84	2,31
	4	tR	18,7	0,04
		área	0,82	2,85
<i>P. maliformis</i>	1	tR	15,1	0,04
		área	1,07	2,68
	2	tR	15,6	0,02
		área	1,21	0,67
	3	tR	18,7	0,02
		área	7,44	0,49
<i>P. morifolia</i>	1	tR	15,1	0,04
		área	1,22	7,36
	2	tR	15,6	0,04
		área	7,62	0,68
	3	tR	18,1	0,09
		área	0,70	3,22
	4	tR	18,7	0,10
		área	15,08	0,70
<i>P. mucronata</i>	1	tR	15,5	0,03
		área	0,15	2,71
	2	tR	15,9	0,03
		área	0,20	4,75
	3	tR	18,8	0,03
		área	0,42	4,88

Continua

<i>P. quadrangularis</i>	1	tR	15,8	0,36
		área	0,20	0,81
	2	tR	18,1	0,31
		área	1,28	1,71
	3	tR	18,7	0,25
		área	6,80	3,15
<i>P. racemosa</i>	1	tR	15,6	0,11
		área	3,57	0,62
	2	tR	18,1	0,13
		área	0,14	4,00
	3	tR	18,7	0,12
		área	1,65	1,01
<i>P. setacea</i>	1	tR	15,1	0,03
		área	1,19	7,04
	2	tR	15,6	0,04
		área	4,36	5,34
	3	tR	18,1	0,04
		área	8,19	5,89
	4	tR	18,6	0,05
		área	22,62	4,69
<i>P. suberosa</i>	1	tR	15,1	0,05
		área	0,39	1,93
	2	tR	18,2	0,04
		área	0,03	2,24
	3	tR	18,6	0,37
		área	0,03	0,83
<i>P. tenuifila</i>	1	tR	15,1	0,01
		área	0,46	1,48
	2	tR	15,8	0,00
		área	0,51	11,07
	3	tR	18,7	0,01
		área	0,31	5,35
<i>P. vitifolia</i>	1	tR	15,1	0,04
		área	0,48	3,19
	2	tR	15,5	0,08
		área	1,03	2,09
	3	tR	18,1	0,03
		área	0,34	3,02
	4	tR	18,7	0,03
		área	18,40	0,23

Nas análises de precisão de injeção (n=5), foram utilizadas quatro bandas cromatográficas (Figura 45), da amostra vegetal de *P. edulis* f. *flavicarpa*, e os seus resultados estão apresentados na Tabela 20.

Figura 45 - Cromatogramas sobrepostos ($\lambda = 337$ nm) de *P. edulis* f. *flavicarpa*.Tabela 20: Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (tR) e as áreas das bandas cromatográficas avaliadas nas análises de amostra de *P. edulis* f. *flavicarpa* (precisão de injeção).

Espécie	Banda	Média (n=5)	CV (%)
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1	tR	15,2
		área	8,07
	2	tR	15,7
		área	3,68
	3	tR	18,2
		área	0,56
	4	tR	18,7
		área	11,59

Os resultados da repetibilidade e precisão de injeção demonstraram que o preparo das amostras apresentam boa reprodutibilidade e que o método qualitativo de análise proposto oferece boa precisão e excelente desempenho analítico.

6.6. Certificação do método analítico

A validação garante através de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados¹⁴⁰.

Com esse intuito, foram realizados procedimentos para validação do método, sendo avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, precisão, exatidão, estabilidade de curta duração, limites de quantificação e de detecção. A validação do

método seguiu as normas estabelecidas pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, publicado pela Anvisa em 2003¹⁴⁰.

6.6.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de um determinado intervalo de aplicação¹⁴¹. O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método^{141,142}.

Para isso, são utilizados soluções-padrão para a verificação da relação entre a concentração e a resposta analítica, pois na prática a linearidade é verificada através da curva de calibração¹⁴³. O gráfico da curva de calibração deve ser construído com no mínimo cinco valores de concentração, representado por uma reta, que relaciona a resposta do equipamento com as várias concentrações das substâncias em estudo^{141,142}.

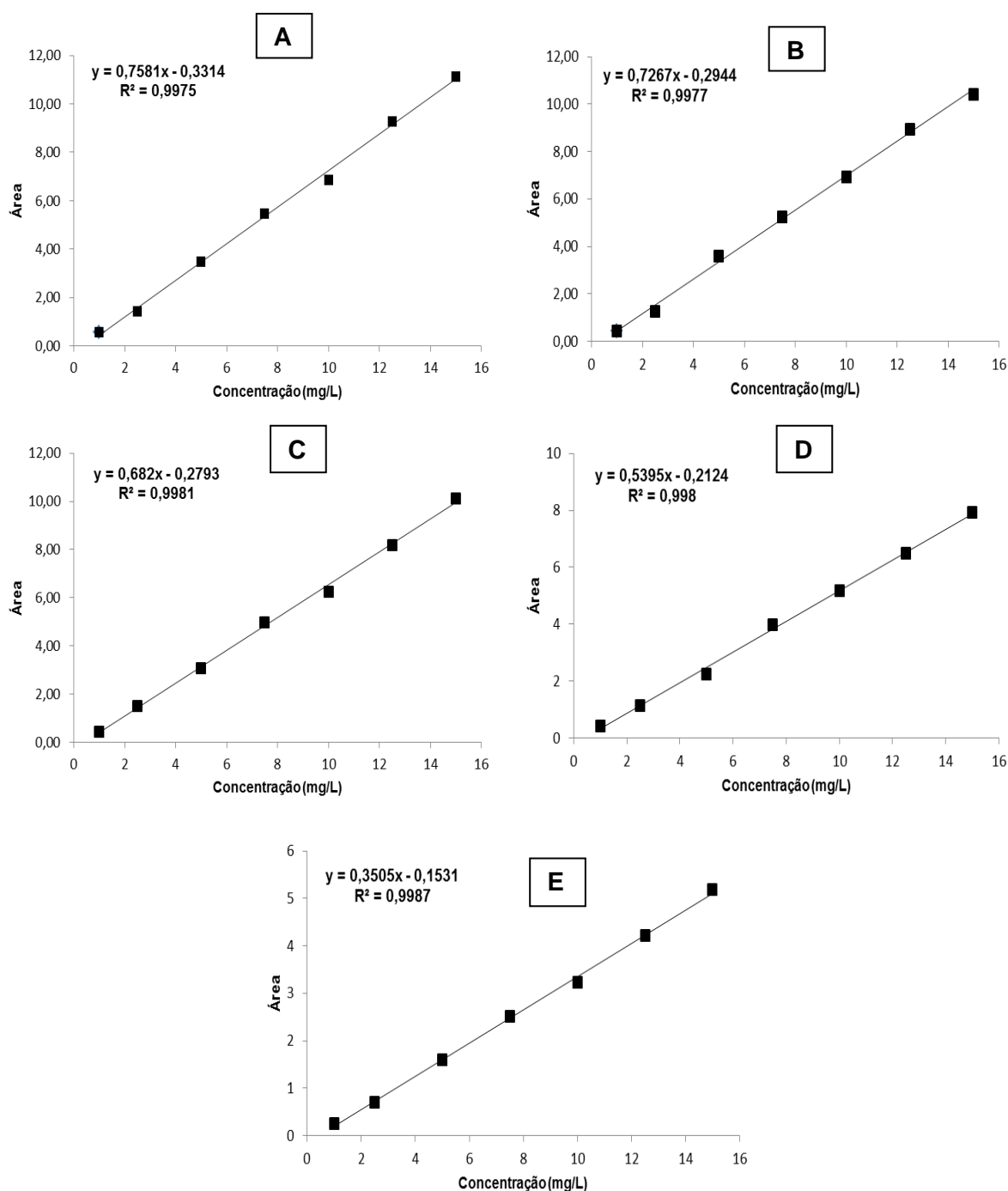
A linearidade foi determinada pelo método de padronização externa, onde a curva de calibração foi feita através de soluções-padrão de concentração conhecidas de cinco analitos (orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina), todas preparadas em metanol.

A relação matemática entre os sinal e a concentração de cada espécie de interesse foi expressa por meio da equação da reta e os respectivos coeficientes de correlação. Um coeficiente maior ou igual a 0,9900 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. De acordo com a Anvisa, valores de R iguais a 0,99 são considerados satisfatórios¹⁴⁰.

Curva de calibração: padrão externo

A linearidade foi avaliada utilizando-se as curvas de calibração ($y = ax + b$) construídas a partir do preparo e análise de sete concentrações (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mg/L) dos analitos, em triplicata. A regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e as concentrações das amostras. O preparo da solução estoque e soluções-padrão estão descritos no item 5.8.1.

Figura 46 - Curvas de calibração por padronização externa para o método de quantificação de orientina (A), isoorientina (B), vitexina (C), isovitexina (D) e rutina (E) em extratos de *Passiflora*.



Como pode ser observado na Figura 46, os coeficientes de correlação obtidos na padronização externa foram respectivamente 0,9987, 0,9981, 0,9980, 0,9977 e 0,9975, para rutina, vitexina, isovitexina, isoorientina e orientina. Esses valores demonstram a forte correlação linear entre a concentração das substâncias analisadas e as áreas das bandas cromatográficas, com valores iguais ou maiores a

0,99, conforme preconizado pela Anvisa. Desta forma, o método cromatográfico é linear para a quantificação dos analitos na faixa de concentração avaliada.

A regressão obtida por padronização externa foi avaliada quanto a sua validade, ajuste e eficiência, através de testes estatísticos de análise de variância¹⁴⁴. Uma maneira de verificar o ajuste do modelo linear é através da comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ ($F = MQ_a/MQ_{ep}$) e F_{tabelado} . Para que a reta seja linear, o ideal é que o valor de $F_{\text{calculado}}$ seja, no mínimo, maior que dez vezes o valor de F_{tabelado} ¹⁴⁴.

As Tabelas 21 a 25 apresentam os resultados da análise de variância das curvas analíticas de orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina, para o ajuste do modelo linear proposto pelo método de padronização externa.

Tabela 21 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de orientina.

Fonte de variação	Soma Quadrática	nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	277,31	1	277,31
Resíduos	1,56	19	0,08
Falta de ajuste	0,69	5	0,14
Erro puro	0,87	14	0,06
Total	278,86	20	

MQ_{ta} = média quadrática devido à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devido ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Tabela 22 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de isorientina.

Fonte de variação	Soma Quadrática	nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	254,86	1	254,86
Resíduos	1,69	19	0,09
Falta de ajuste	0,60	5	0,12
Erro puro	1,09	14	0,08
Total	256,55	20	

MQ_{ta} = média quadrática devido à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devido ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Tabela 23 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de vitexina.

Fonte de variação	Soma Quadrática	nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	224,47	1	224,47
Resíduos	1,36	19	0,07
Falta de ajuste	0,43	5	0,09
Erro puro	0,92	14	0,07
Total	225,82	20	

MQ_{ta} = média quadrática devido à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devido ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Tabela 24 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de isovitexina.

Fonte de variação	Soma Quadrática	nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	140,52	1	140,52
Resíduos	0,94	19	0,05
Falta de ajuste	0,27	5	0,05
Erro puro	0,67	14	0,05
Total	141,47	20	

MQ_{ia} = média quadrática devido à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devido ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Tabela 25 - Resultados da análise da variância da curva de calibração de rutina.

Fonte de variação	Soma Quadrática	nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	60,63	1	60,63
Resíduos	0,33	19	0,02
Falta de ajuste	0,11	5	0,02
Erro puro	0,22	14	0,02
Total	60,95	20	

MQ_{ia} = média quadrática devido à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devido ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Para a análise do ajuste do modelo linear, os valores de $F_{calculado}$ foram 2,23; 1,53; 1,31; 1,14 e 1,33 para as curvas analíticas de orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina, respectivamente, os quais são inferiores ao $F_{crítico}$ ($F_{5,14} = 2,96$) com 95% de confiança, portanto a linearidade do método é aceita e o ajuste do modelo pode ser considerado satisfatório.

Na análise da validade da regressão, os valores de $F_{calculado}$ ($F = MQR/MQ_r$) foram de 3388,20; 2864,85; 3145,88; 2825,61; 3513,11 para as curvas analíticas de orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina, respectivamente, os quais são bastante superiores ao valor de $F_{crítico}$ ($F_{1,19} = 4,38$) com 95% de confiança, portanto a regressão pode ser considerado bastante significativa.

Os valores da eficiência da regressão, calculado pelo coeficiente de determinação R ($R = SQR/SQT$) foram de 0,9947; 0,9944; 0,9940; 0,9934; 0,9933 para as curvas analíticas de rutina, orientina, vitexina, isorientina e isovitexina, respectivamente.

6.6.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental^{140,141}.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental^{140,141}.

O LD e LQ pode ser calculado de três formas diferentes, tais como, método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado no parâmetro da curva analítica. Para a determinação do LD e LQ foram considerados os parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando as seguintes equações: $LD = 3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o método analítico de quantificação variaram de 0,710 a 0,848 mg/L e 2,368 a 2,827 mg/L, respectivamente (Tabela 26).

Tabela 26 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para as substâncias orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina.

Substância	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Orientina	0,848	2,827
Isoorientina	0,823	2,744
Vitexina	0,747	2,490
Isovitexina	0,750	2,499
Rutina	0,710	2,368

6.6.3. Precisão

Representa a dispersão entre os diversos resultados gerados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Tanto a precisão quanto a exatidão são figuras de mérito considerados de grande importância no processo de validação, pois permitem estimar os erros e variações associados a um determinado método^{142,145,146}.

A precisão pode ser avaliada por meio do desvio-padrão absoluto (σ) ou pela estimativa do desvio-padrão absoluto (s), quando o número de determinações é

pequeno, pelo intervalo de confiança médio, ou mesmo pela estimativa do desvio-padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV)¹³⁹.

Neste estudo, a precisão foi determinada pelo cálculo do desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas, por meio da utilização da seguinte equação matemática: $CV (\%) = (s/M) \times 100$, em que, s = estimativa do desvio-padrão; M = média das determinações. O valor máximo aceitável de CV vai depender do método empregado, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método, porém, não deve ultrapassar 5%.

A precisão foi avaliada de duas maneiras: repetibilidade ou precisão intraensaio e precisão intermediária ou precisão interensaio.

6.6.3.1. Repetibilidade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, sob as chamadas condições de repetibilidade: várias medições da mesma amostra, mesmo laboratório, em pequeno intervalo de tempo (mesmo dia, analista e equipamento). Para tanto, a repetibilidade do método foi avaliada através da análise de soluções-padrão, correspondentes a três níveis de concentração: baixa (1,0 mg/L), média (7,5 mg/L) e alta (15,0 mg/L), submetidas a cinco diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A Tabela 27 apresenta os valores obtidos de CV para a precisão do método quantitativo proposto, na qual se pode verificar que variaram de 1,67% (isorientina) a 2,37% (vitexina), na concentração de 1,0 mg/L, de 2,52% (isorientina) a 3,12% (vitexina), na concentração de 7,5 mg/L, e de 0,98% (rutina) a 1,73% (isovitexina), na concentração de 15,0 mg/L, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 27 - Média das áreas das bandas cromatográficas e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada substância na avaliação da repetibilidade do método.

Substância	Concentração (mg/L)	Área (n=5)	CV (%)
Orientina	1,0	0,59	2,21
	7,5	5,42	2,78
	15,0	9,64	1,51
Isoorientina	1,0	0,53	1,67
	7,5	4,52	2,52
	15,0	10,09	1,66
Vitexina	1,0	0,51	2,37
	7,5	4,64	3,12
	15,0	9,70	1,65
Isovitexina	1,0	0,45	1,99
	7,5	4,36	2,99
	15,0	8,64	1,73
Rutina	1,0	0,21	2,22
	7,5	2,53	2,95
	15,0	5,22	0,98

6.6.3.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias¹⁴⁵. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados.

Neste estudo, a precisão intermediária foi avaliada pela análise de soluções-padrão, correspondentes a três diferentes concentrações: baixa (1,0 mg/L), média (7,5 mg/L) e alta (15,0 mg/L), em triplicata, pelo mesmo analista, sob as mesmas condições instrumentais, porém em quatro dias não-consecutivos.

Como observado na Tabela 28, os valores de coeficiente de variação (CV) para a precisão intermediária do método de quantificação de orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina estão abaixo do limite de 5%, conforme é recomendado.

Tabela 28 - Média das áreas das bandas cromatográficas e coeficientes de variação (CV) obtidos para as substâncias orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina na avaliação da precisão intermediária do método.

Substância	Concentração (mg/L)	1º dia CV (%)	2º dia CV (%)	3º dia CV (%)	4º dia CV (%)	Média CV (%)
Orientina	1,0	0,12	2,58	2,62	4,17	2,37
	7,5	1,01	3,29	1,03	0,87	1,55
	15,0	3,91	0,19	3,57	1,63	2,32
Isoorientina	1,0	1,36	2,16	2,16	4,37	2,51
	7,5	1,10	3,87	1,17	1,12	1,82
	15,0	4,70	1,68	3,92	1,51	2,95
Vitexina	1,0	1,00	0,23	1,13	1,93	1,07
	7,5	1,09	3,87	1,33	0,78	1,77
	15,0	4,73	0,77	3,95	3,13	3,14
Isovitexina	1,0	0,81	0,94	2,60	0,31	1,17
	7,5	1,26	2,97	1,01	0,88	1,53
	15,0	0,37	1,04	4,01	2,32	1,94
Rutina	1,0	4,16	1,35	3,96	1,34	2,70
	7,5	1,34	4,07	0,94	0,97	1,83
	15,0	6,21	1,61	4,08	2,98	3,72

6.6.4. Exatidão

A exatidão de um processo analítico representa o quanto os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio, concordam com valor de referência aceito como verdadeiro^{140,141}. Os procedimentos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de material de referência certificado (MRC), comparação de método proposto com método de referência, ensaios de recuperação com matriz fortificada e adição de padrão^{141,143}.

O número de análises varia de acordo com a legislação, diretriz adotada e, também, com as características da pesquisa; alguns órgãos estabelecem um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentrações^{141,147}.

Com isso, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando o extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. edulis* f. *flavicarpa*. O extrato foi fortificado com padrões dos analitos (orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina) em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto), conforme procedimento descrito no item 5.8.2.

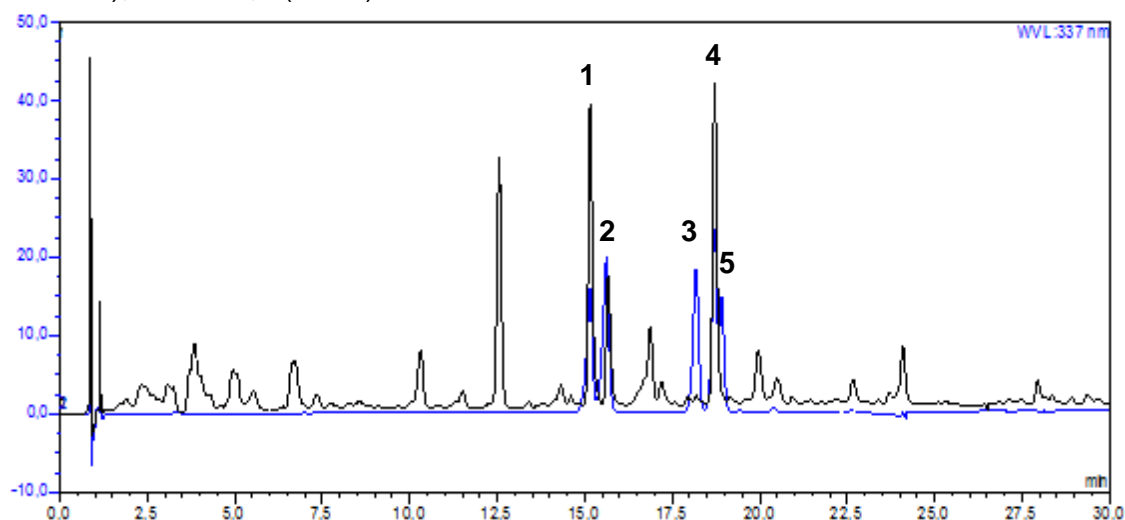
Os intervalos aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente compreendidos entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém,

em amostras mais complexas, esta faixa pode ser ampliada para 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ ¹⁴¹.

Para determinar a banda cromatográfica de cada flavonoide no perfil cromatográfico de *P. edulis* f. *flavicarpa*, os cromatogramas da amostra vegetal e da solução-padrão da mistura (7,5 mg/L) foram sobrepostos e comparados os tempos de retenção, como apresentado na Figura 47.

Observou-se na Figura 47 que as bandas cromatográficas com tempos de retenção (tR) de 15,2 (1); 15,7 (2); 18,2 (3); 18,7 (4) e 18,8 (5) correspondem a isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina, respectivamente, sendo que a rutina não foi detectada no extrato de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Figura 47 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) obtidos por CLAE-DAD de *P. edulis* f. *flavicarpa*, tR1 = 15,2 (isoorientina); tR2 = 15,7 (orientina); tR3 = 18,2 (vitexina); tR4 = 18,7 (isovitexina); tR5 = 18,8 (rutina).



A Tabela 29 apresenta os resultados do ensaio de recuperação do método quantitativo proposto, na qual pode-se verificar que o método apresentou boa recuperação para todas as substâncias nos três níveis de concentração e com valores de coeficiente de variação (CV) menores que 5%, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis (entre 70 e 120%).

Tabela 29 - Recuperação dos padrões em extrato de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Substância	Concentração (mg/L)			Recuperação (%)	Média	CV	
	Amostra	Adicionado	Encontrado				
Orientina	3,89	1,0	4,88	99,79	97,99	1,69	
	3,89	1,0	4,77	97,64			
	3,89	1,0	4,72	96,53			
	Orientina	3,89	7,5	10,76	94,52	90,74	3,66
		3,89	7,5	10,18	89,43		
		3,89	7,5	10,05	88,27		
	Orientina	3,89	15,0	15,42	81,63	82,62	1,08
		3,89	15,0	15,66	82,91		
		3,89	15,0	15,74	83,33		
Isoorientina	8,51	1,0	9,92	104,32	104,08	0,24	
	8,51	1,0	9,88	103,84			
	8,51	1,0	9,90	104,09			
	Isoorientina	8,51	7,5	15,27	95,38	91,38	3,51
		8,51	7,5	14,41	89,96		
		8,51	7,5	14,22	88,81		
	Isoorientina	8,51	15,0	26,0	110,57	109,24	3,55
		8,51	15,0	26,40	112,28		
		8,51	15,0	24,66	104,87		
Vitexina	< LD	1,0	0,53	70,58	70,81	0,76	
	< LD	1,0	0,53	70,43			
	< LD	1,0	0,54	71,43			
	Vitexina	< LD	7,5	8,93	109,15	107,93	1,01
		< LD	7,5	8,76	107,08		
		< LD	7,5	8,80	107,54		
	Vitexina	< LD	15,0	15,38	98,09	97,78	0,27
		< LD	15,0	15,32	97,66		
		< LD	15,0	15,31	97,60		
Isovitexina	12,16	1,0	13,44	102,13	102,73	0,55	
	12,16	1,0	13,59	103,25			
	12,16	1,0	13,53	102,81			
	Isovitexina	12,16	7,5	17,88	90,93	88,94	1,95
		12,16	7,5	17,33	88,15		
		12,16	7,5	17,25	87,74		
	Isovitexina	12,16	15,0	29,55	108,81	108,49	0,49
		12,16	15,0	29,30	107,88		
		12,16	15,0	29,54	108,78		
Rutina	ND	1,0	1,07	107,10	107,43	0,35	
	ND	1,0	1,07	107,10			
	ND	1,0	1,08	107,76			
	Rutina	ND	7,5	5,29	70,49	70,12	0,54
		ND	7,5	5,23	69,73		
		ND	7,5	5,26	70,14		
	Rutina	ND	15,0	17,50	116,64	114,43	2,44
		ND	15,0	17,30	115,35		
		ND	15,0	16,69	111,29		

ND = não detectado; < LD = menor que o limite de detecção.

6.7. Análise quantitativa

O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação dos flavonoides glicosilados orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina em dezessete espécies de *Passiflora* cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura, preparadas e analisadas conforme prescrito no procedimento experimental (itens 5.2 e 5.3.2).

A quantificação dos flavonoides nos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de *Passiflora* foi realizado através do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para os padrões (item 5.8.1.1 e 6.6.1).

Os resultados quantitativos obtidos no presente trabalho serão discutidos com relação à concentração encontrada desses flavonoides glicosilados nos extratos analisados em mg/g de extrato e de planta seca.

Os flavonoides C-glicosilados, principalmente, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, são os constituintes químicos mais frequentemente citados para as espécies de *Passiflora* e que apresentam ampla distribuição no gênero. Devido a grande prevalência, estabilidade química, disponibilidade de métodos de análise qualitativos e quantitativos e sua relação com os efeitos terapêuticos, esses flavonoides C-glicosilados são marcadores químicos adequados para fornecer a autenticação de amostras, para detectar adulterações e propiciar a diferenciação entre espécies taxonomicamente semelhantes¹⁴⁸.

A presença dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina (Figura 48), foi investigada nos perfis cromatográficos por CLAE-DAD das dezessete espécies de *Passiflora*, através da comparação destes perfis com os cromatogramas de cada padrão (Figura 49), cromatogramas das soluções-padrão (1,0; 7,5 e 15 mg/L) e espectros UV (Figura 50) obtidos pelo detector de arranjo de diodos ($\lambda = 337$ nm).

Figura 48 – Estruturas químicas dos flavonoides orientina, isorientina, isovitexina, vitexina e rutina. Glu = glicose.

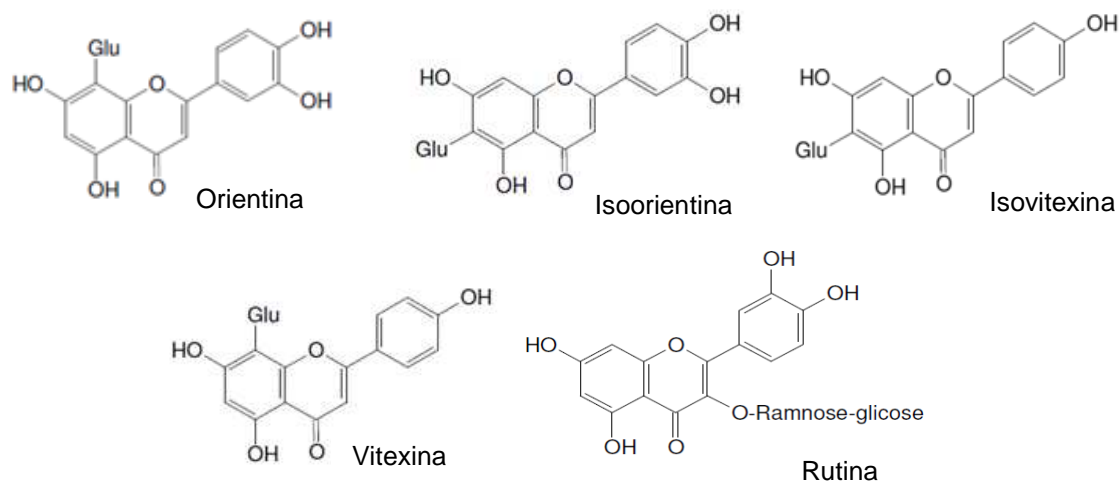


Figura 49 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) dos padrões isorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina.

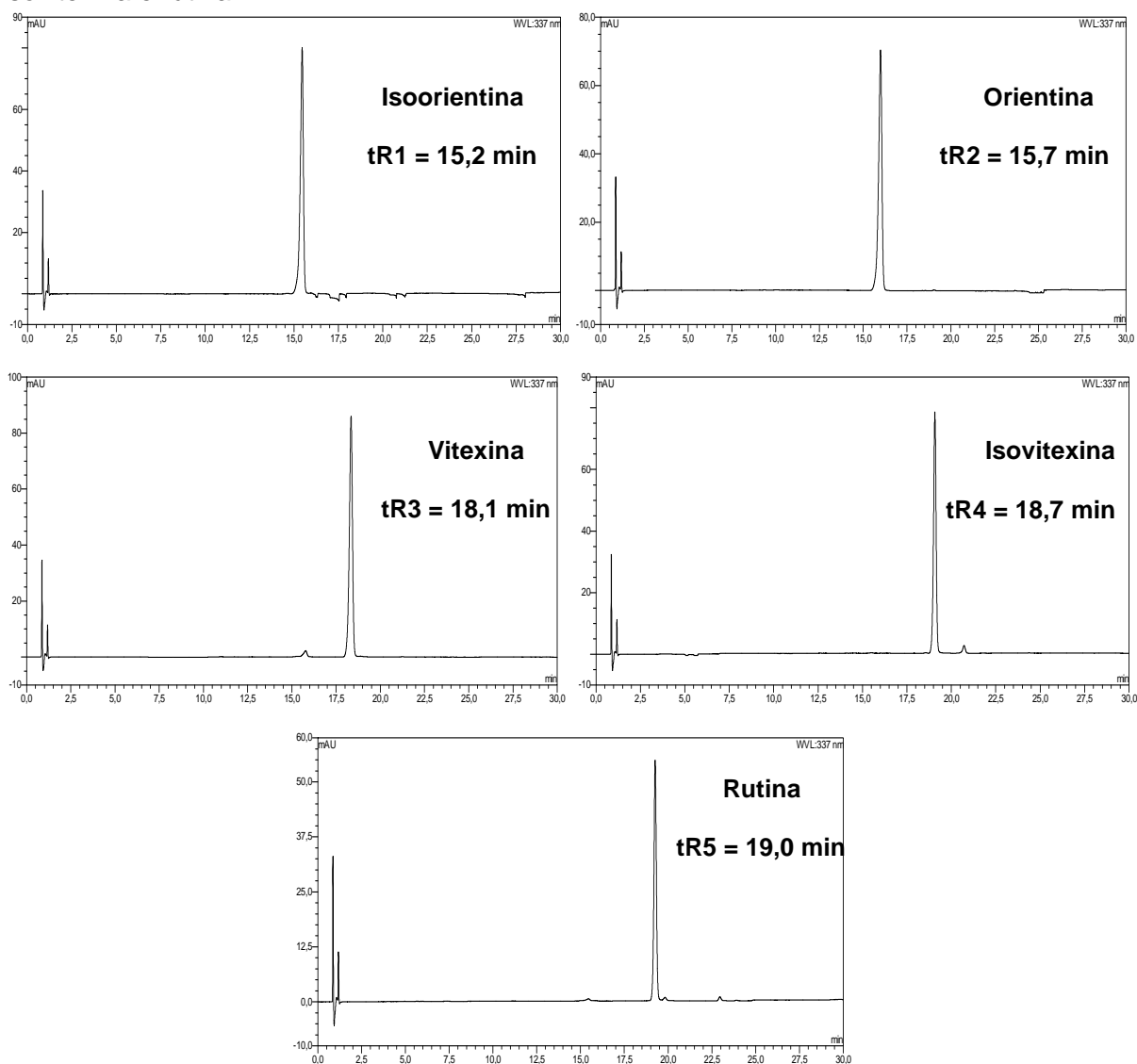
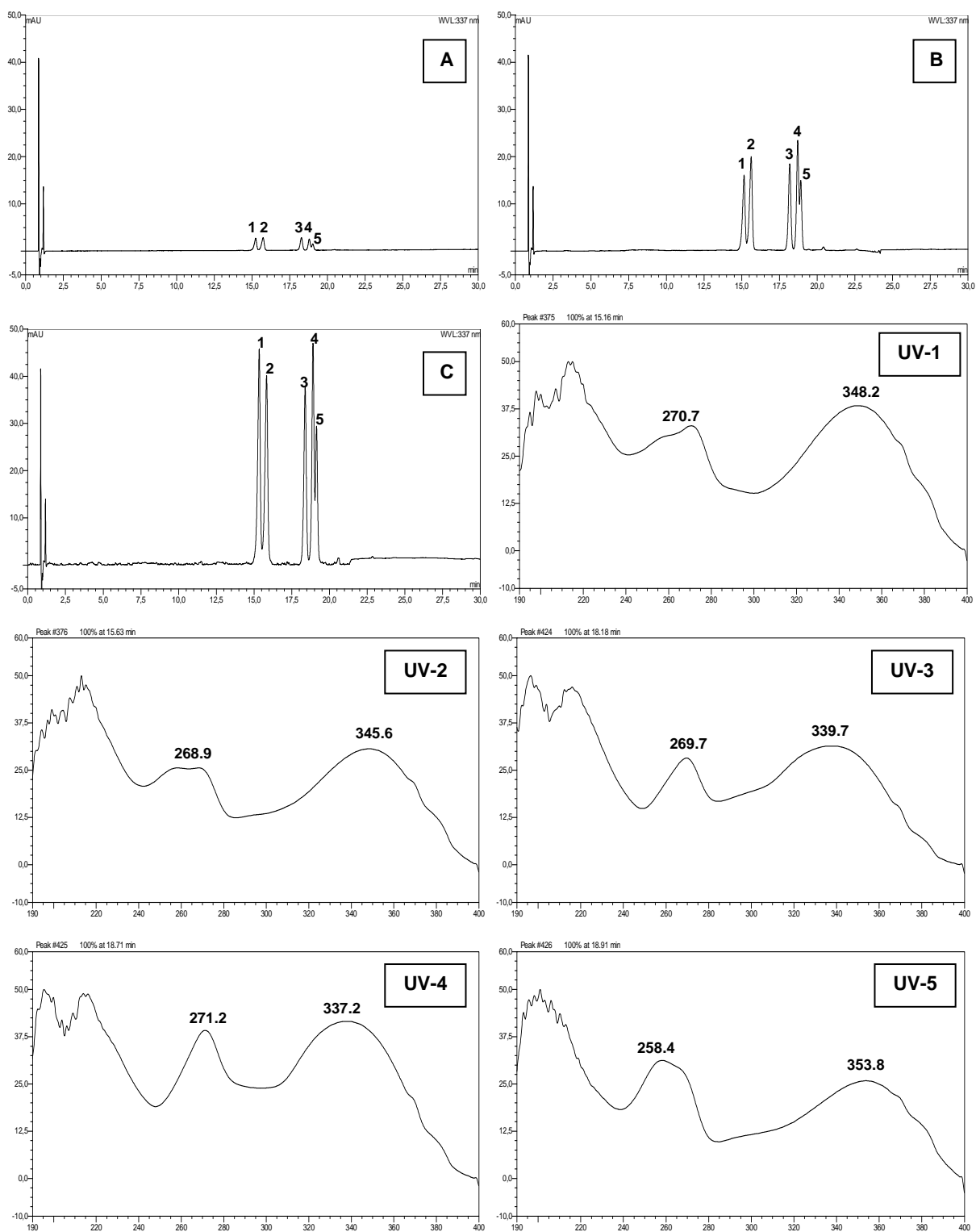


Figura 50 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) das soluções-padrão de 1,0 mg/L (A), 7,5 mg/L (B) e 15 mg/L (C) e espectros UV-1 (isorientina), UV-2 (orientina), UV-3 (vitexina), UV-4 (isovitexina) e UV-5 (rutina). $t_{R1} = 15,2$ min; $t_{R2} = 15,6$ min; $t_{R3} = 18,2$ min; $t_{R4} = 18,7$ min; $t_{R5} = 18,9$ min.



As Figuras 51 a 53 apresentam os perfis cromatográficos de cada espécie de *Passiflora*, onde estão assinaladas as bandas cromatográficas referente a cada flavonoide. As bandas com tempos de retenção (tR) entre 15,1 e 15,5 (1); 15,5 e 15,9 (2); 18,1 e 18,2 (3); 18,6 e 18,8 (4) e 18,9 (5), correspondem aos flavonoides isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina, respectivamente.

Figura 51 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de *P. alata* (A), *P. capsularis* (B), *P. cincinnata* (C), *P. edulis* f. *flavicarpa* (D), *P. edulis* f. *edulis* (E), *P. galbana* (F). 1 – isoorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina.

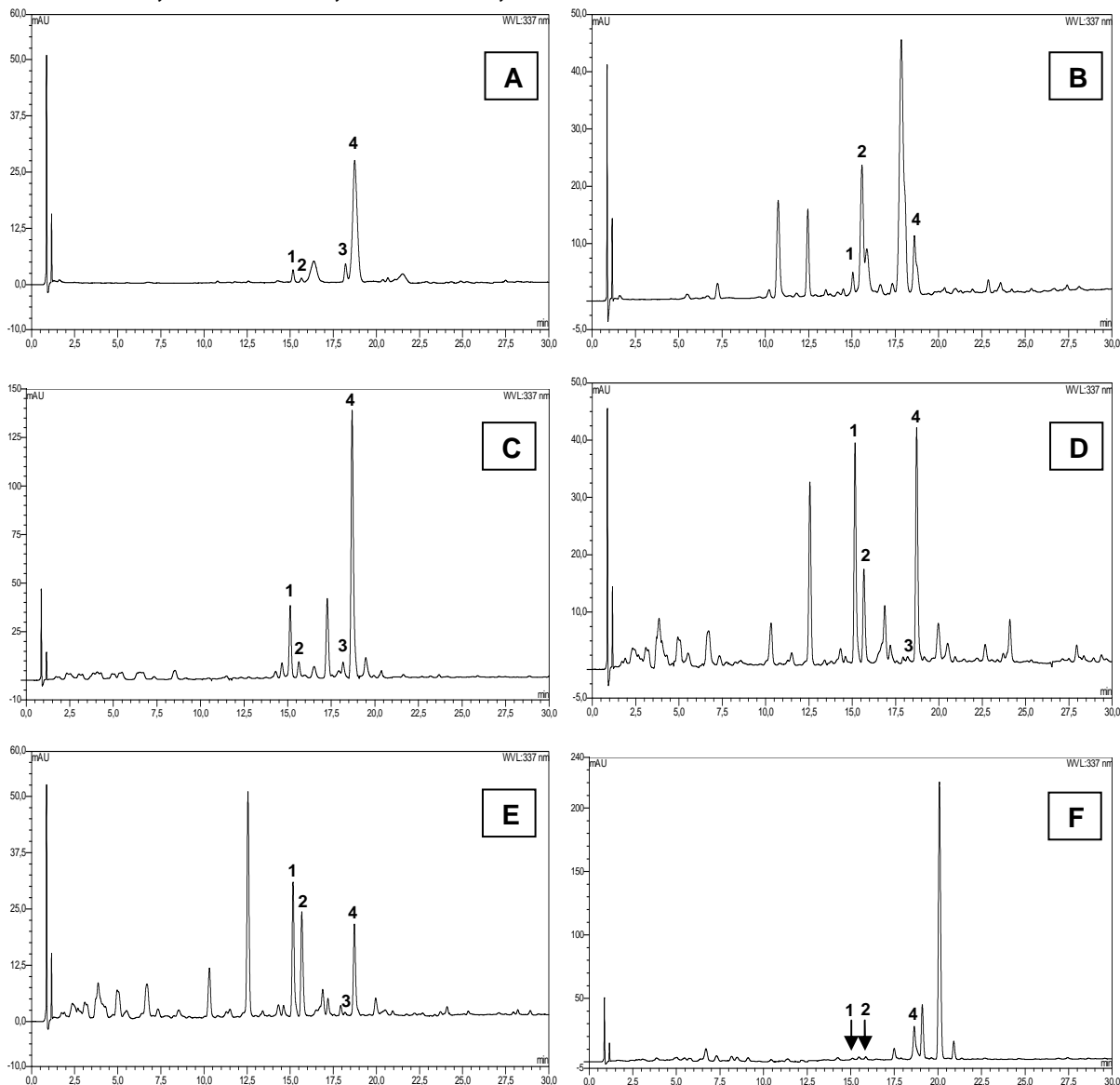


Figura 52 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de *P. gibertii* (G), *P. malacophylla* (H), *P. maliformis* (I), *P. morifolia* (J), *P. mucronata* (K), *P. quadrangularis* (L), *P. racemosa* (M), *P. setacea* (N). 1 – isoorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina; 5 – rutina.

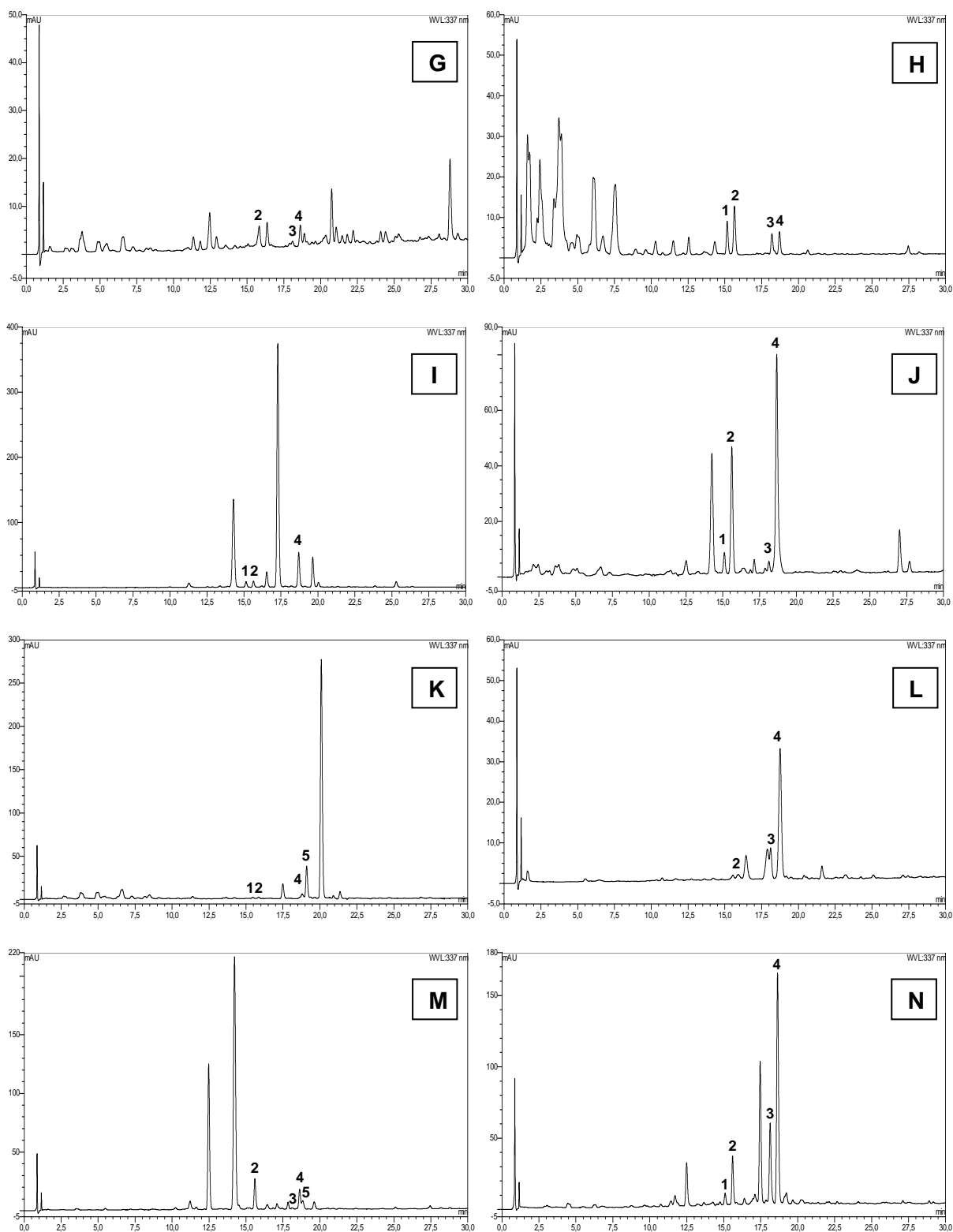
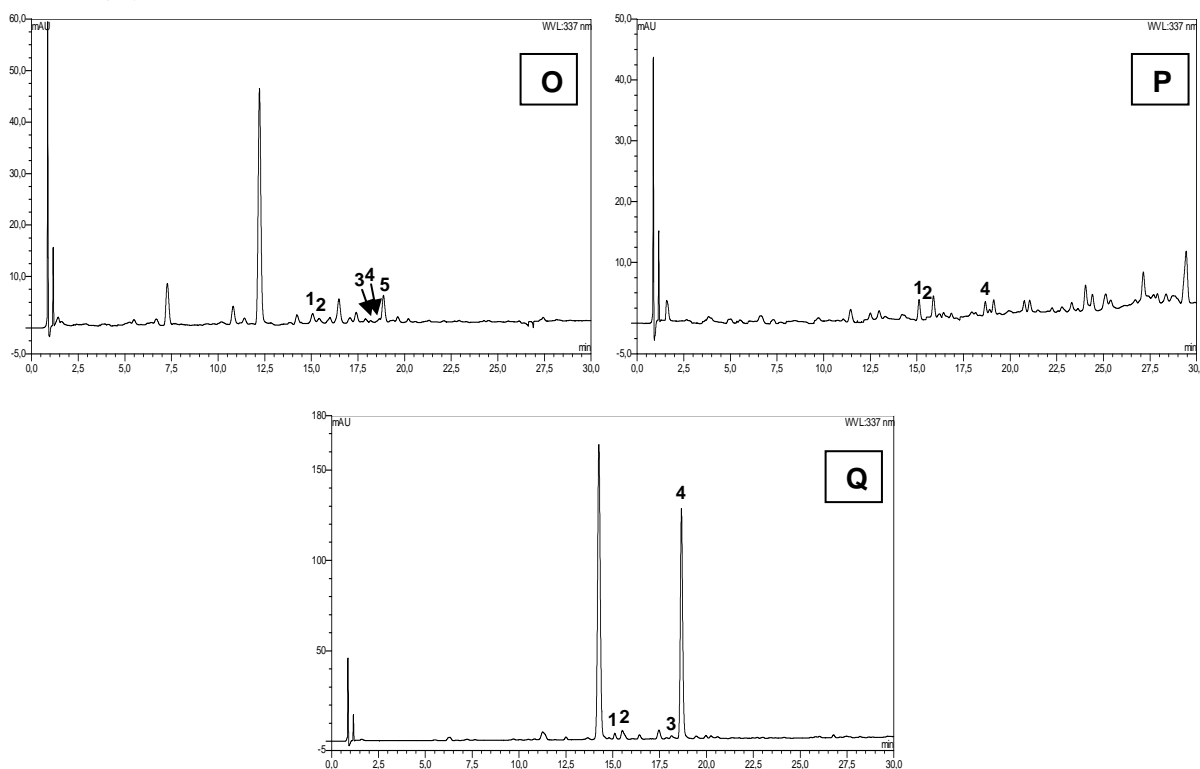


Figura 53 - Cromatogramas ($\lambda = 337$ nm) de *P. suberosa* (O), *P. tenuifila* (P), *P. vitifolia* (Q). 1 – isoorientina; 2 – orientina; 3 – vitexina; 4 – isovitexina; 5 – rutina.



A Tabela 30 apresenta as concentrações determinadas de isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina nos diferentes extratos, expressas em mg/g de extrato e de planta seca. Observou-se que na análise quantitativa das espécies de *Passiflora*, o flavonoide C-glicosilado isoorientina apresentou maior concentração (1,61 mg/g de extrato e 0,58 mg/g de planta seca) na espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* e a menor concentração (1,18 mg/g de extrato e 0,46 mg/g de planta seca) foi encontrada na *P. edulis* f. *edulis*.

As maiores concentrações de orientina foi encontrada nas amostras vegetais de *P. morifolia* (2,10 mg/g de extrato e 0,90 mg/g de planta seca) e a menor concentração na *P. malacophylla* (0,58 mg/g de extrato e 0,09 mg/g de planta seca).

A vitexina só quantificada em duas espécies, sendo a *P. capsularis* (4,05 mg/g de extrato e 0,93 mg/g de planta seca) a espécie que apresentou a maior concentração da substância. Nas demais espécies, a vitexina não foi detectada (*P. galbana*, *P. maliformis*, *P. mucronata* e *P. tenuifila*) ou apareceu em baixas concentrações (traços).

A isovitexina foi o marcador químico mais identificado nas espécies de *Passiflora* estudadas e que apresentou as maiores concentrações. As maiores

concentrações de isovitexina foram encontradas nas espécies: *P. setacea* (8,46 mg/g de extrato e 3,30 mg/g de planta seca), *P. cincinnata* (7,68 mg/g de extrato e 2,60 mg/g de planta seca), *P. vitifolia* (6,90 mg/g de extrato e 2,06 mg/g de planta seca) e *P. edulis* f. *flavicarpa* (6,17 mg/g de extrato e 2,22 mg/g de planta seca).

As maiores concentrações de rutina foi encontrada nas espécies de *P. galbana* (3,48 mg/g de extrato e 1,02 mg/g de planta seca) e *P. mucronata* (2,73 mg/g de extrato e 0,94 mg/g de planta seca). Na maioria das espécies a rutina não foi detectada.

Dentre as espécies estudadas, a *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis* e *P. setacea* foram as espécies que apresentaram o maior número de flavonoides quantificados.

Nas espécies de *Passiflora* estudadas, não foi possível a quantificação dos cinco marcadores em todas as espécies, pois a banda cromatográfica referente a estes flavonoides não foi detectada ou estava abaixo do limite de quantificação do método, isto é, apareceram em baixas concentrações (traços).

Zucolotto et al. (2011)⁷³ realizaram um estudo para identificar por CLAE-DAD e LC-EM flavonoides C-glicosilados em extratos aquosos de sete espécies de *Passiflora*, dentre elas a *P. alata* e *P. quadrangularis*. Estes autores identificaram nas folhas de *P. alata*, isoorientina, orientina e isovitexina e não encontraram vitexina no extrato. Na *P. quadrangularis*, os flavonoides isoorientina, orientina, isovitexina e vitexina não foram identificados.


Em outro trabalho, Li et al. (2011)⁸⁵ desenvolveram um método cromatográfico por CLAE-DAD para a identificação de seis flavonoides no extrato etanólico de folhas de duas espécies de *Passiflora*, *P. edulis flavicarpa* e *P. edulis edulis*, coletadas na China. Segundo os autores, os flavonoides isoorientina e isovitexina só foram identificados na *P. edulis flavicarpa*.

Tabela 30 - Concentração dos flavonoides isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina em espécies de *Passiflora*.

Espécie	Isoorientina		Orientina		Vitexina		Isovitexina		Rutina	
	mg/g de extrato	mg/g de planta seca	mg/g de extrato	mg/g de planta seca	mg/g de extrato	mg/g de planta seca	mg/g de extrato	mg/g de planta seca	mg/g de extrato	mg/g de planta seca
<i>P. alata</i>										
<i>P. capsularis</i>			0,94±0,031	0,22±0,007	4,05±0,066	0,93±0,015	3,09±0,019	1,49±0,009		
<i>P. cincinnata</i>	1,39±0,046	0,47±0,016					7,68±0,172	2,60±0,058		
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	1,61±0,011	0,58±0,004	0,74±0,010	0,26±0,004			6,17±0,083	2,22±0,030		
<i>P. edulis f. edulis</i>	1,18±0,047	0,46±0,018	0,94±0,029	0,37±0,011			3,24±0,007	1,26±0,003		
<i>P. galbana</i>							5,21±0,199	1,53±0,058	3,48±0,110	1,02±0,032
<i>P. gibertii</i>										
<i>P. malacophylla</i>			0,58±0,003	0,09±0,000						
<i>P. maliformis</i>							2,84±0,013	1,09±0,005		
<i>P. morifolia</i>			2,10±0,014	0,90±0,006			5,67±0,039	2,44±0,017		
<i>P. mucronata</i>									2,73±0,029	0,94±0,010
<i>P. quadrangularis</i>							2,60±0,079	1,04±0,032		
<i>P. racemosa</i>			1,03±0,006	0,30±0,002			0,69±0,006	0,20±0,002		
<i>P. setacea</i>			1,24±0,061	0,48±0,024	2,48±0,142	0,97±0,055	8,46±0,393	3,30±0,153		
<i>P. suberosa</i>									0,57±0,020	0,14±0,005
<i>P. tenuifolia</i>										
<i>P. vitifolia</i>							6,90±0,016	2,06±0,05		

 = identificado, porém com concentração < LQ;

 = identificado, porém com concentração < LD;

 = não detectado.

6.8. Testes biológicos

6.8.1. Atividade antioxidante

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a atividade antioxidante de substâncias fenólicas de plantas. Segundo Sousa et al. (2007)¹⁴⁹, a atividade antioxidante destas substâncias deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias.

Os estudos referentes à composição química de várias espécies de *Passiflora*, evidenciaram a presença de substâncias fenólicas, principalmente flavonoides, como constituintes majoritários. Dentre as diversas funções atribuídas aos flavonoides, pode-se citar a sua ação antioxidante.

Considerando a importância de substâncias fenólicas como antioxidantes, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) das dezessete espécies de *Passiflora*, pelo ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) das espécies de *Passiflora* foram avaliados pelo teste do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg/mL, como descrito no procedimento experimental (item 5.9.1).

O teste de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um método rápido que não envolve condições drásticas de temperatura e oxidação, onde o DPPH é reduzido, pela ação de um antioxidante ou espécie radicalar, a difenil-picril-hidrazina¹⁵⁰ (Figura 54). A redução do DPPH pode ser observada pela mudança da cor de púrpura escuro para amarelo (Figura 55). O grau de descoloração do radical é medido no espectrofotômetro em $\lambda = 515$ nm.

Figura 54: Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante.

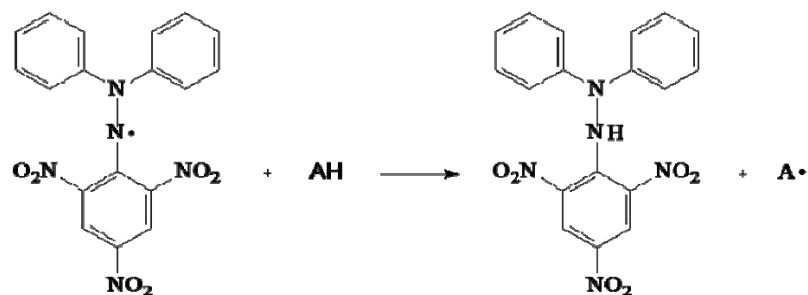
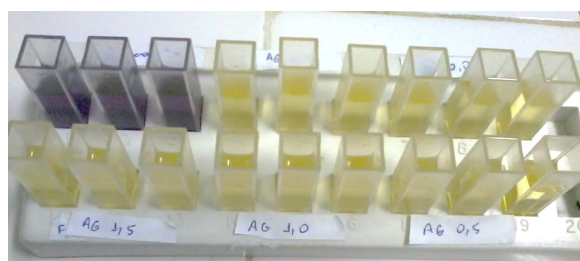


Figura 55 - Atividade antioxidante pelo método do DPPH.



Os resultados da avaliação quantitativa do percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SRL), dos extratos das dezessete espécies de *Passiflora* estão apresentados nas Figuras 56 e 57.

Figura 56 - Percentual do sequestro de radical de livre do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de espécies de *Passiflora*.

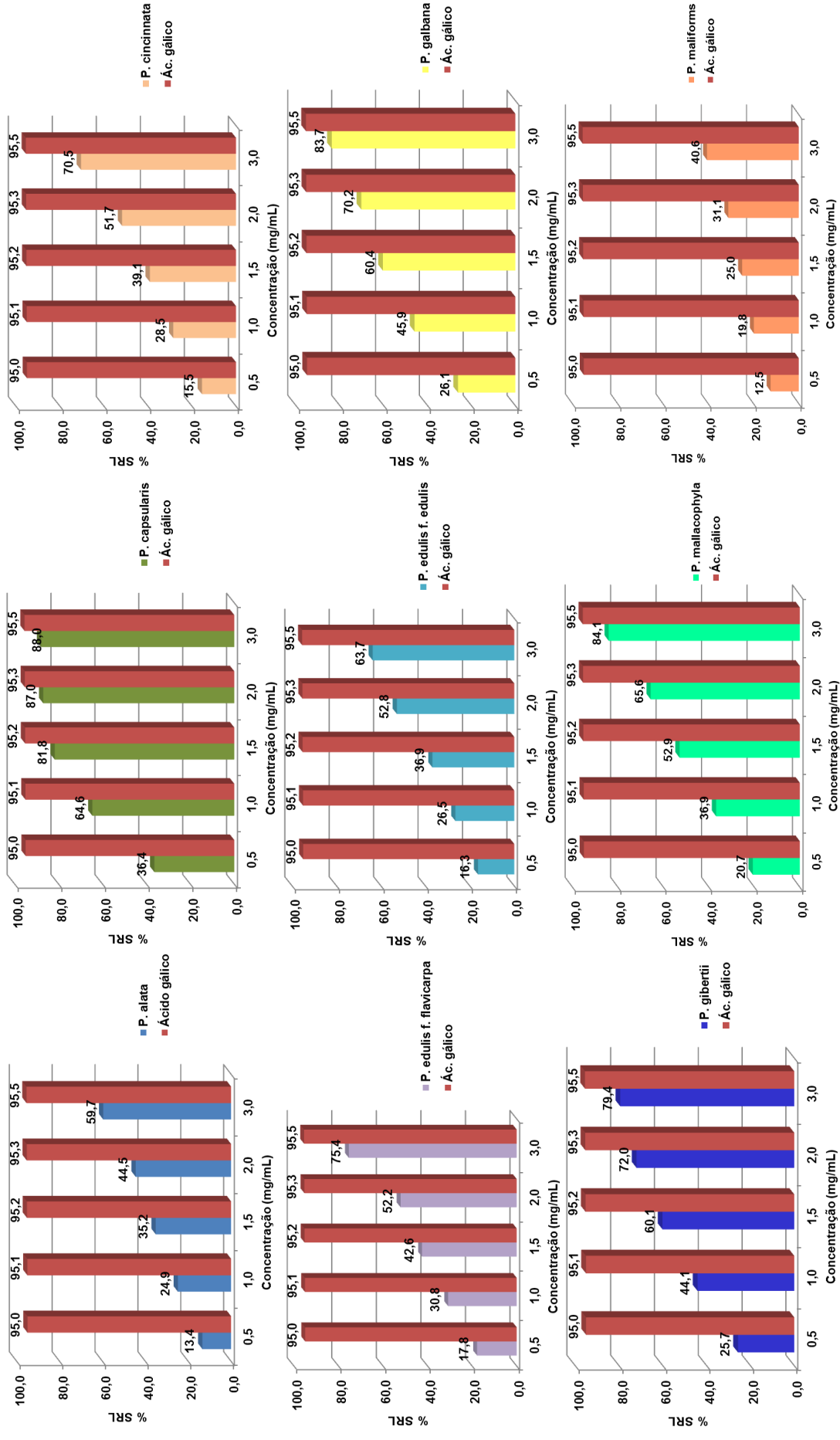
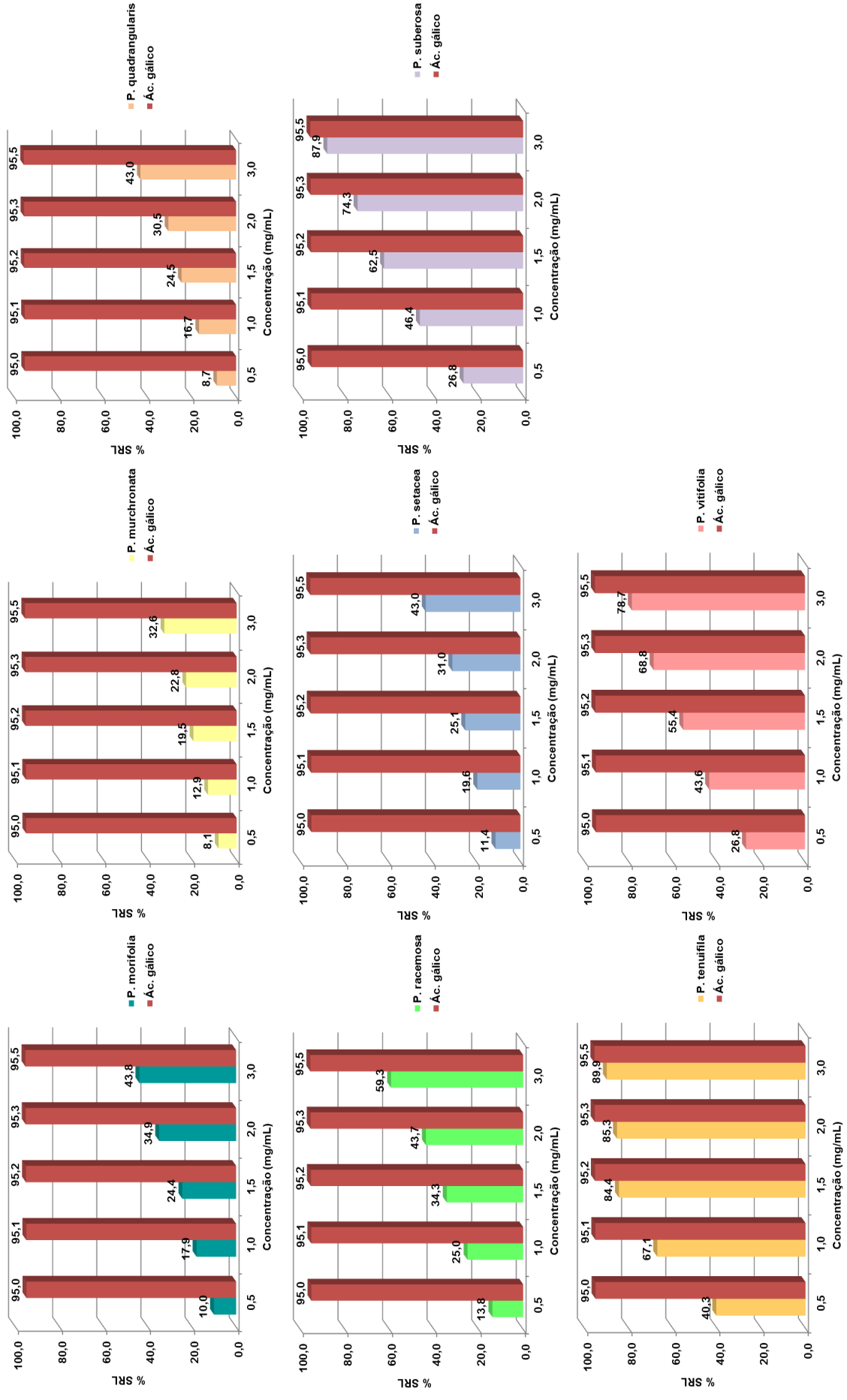


Figura 57 - Percentual do sequestro de radical de livre do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de espécies de *Passiflora*.



Analisando-se as Figuras 56 e 57, verifica-se que os extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. malacophylla*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* e *P. vitifolia* demonstraram possuir alta atividade antioxidante, quando comparado ao ácido gálico, considerado padrão para este ensaio.

A Tabela 31 apresenta os resultados expressos em CE₅₀ (concentração do extrato em mg/mL capaz de reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH) dos extratos das espécies de *Passiflora*. Quanto menor o valor do CE₅₀ maior será a atividade antioxidante do extrato.

Tabela 31 - CE₅₀ dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de dezessete espécies de *Passiflora* estudadas.

Amostra	CE ₅₀ (mg/mL)	Amostra	CE ₅₀ (mg/mL)
<i>P. alata</i>	2,38 ± 0,003	<i>P. morifolia</i>	3,32 ± 0,002
<i>P. capsularis</i>	0,48 ± 0,002	<i>P. mucronata</i>	4,76 ± 0,004
<i>P. cincinnata</i>	2,01 ± 0,004	<i>P. quadrangularis</i>	3,46 ± 0,002
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	1,88 ± 0,003	<i>P. racemosa</i>	2,42 ± 0,002
<i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	2,15 ± 0,016	<i>P. setacea</i>	3,54 ± 0,002
<i>P. galbana</i>	1,27 ± 0,004	<i>P. suberosa</i>	1,20 ± 0,004
<i>P. gibertii</i>	1,31 ± 0,003	<i>P. tenuifila</i>	0,31 ± 0,002
<i>P. malacophylla</i>	1,52 ± 0,001	<i>P. vitifolia</i>	1,37 ± 0,002
<i>P. maliformis</i>	3,78 ± 0,004		

Como pode ser observado na Tabela 31, os extratos hidroetanólicos de *P. capsularis* e *P. tenuifila* apresentaram a maior atividade antioxidante com valores de CE₅₀ de 0,48 e 0,31 mg/L, respectivamente. O extrato de *P. mucronata* apresentou a menor atividade antioxidante com CE₅₀ de 4,76 mg/L.

Os resultados demonstram que a atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de *Passiflora*, deve-se a presença de sequestradores de radicais livres, como os flavonoides, conhecidos agentes antioxidantes.

Em 2013, Silva et al.¹⁵¹ avaliaram a atividade antioxidante e composição química por CLAE-DAD do extrato aquoso de folhas da espécie *P. edulis*. No trabalho, os autores relataram que o extrato aquoso tem forte atividade antioxidante, a qual está relacionada à presença dos flavonoides vitexina, isovitexina e isoorientina, identificados e quantificados no extrato.

6.8.2. Atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem degenerativa que afeta as funções cognitivas e psicomotoras. A causa do desenvolvimento da DA não está completamente resolvida. No entanto, vários estudos têm demonstrado que a DA está associada a uma redução acentuada da atividade colinérgica no sistema nervoso central (SNC), devido ao déficits de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, a noradrenalina e serotonina^{152,153}.

O tratamento sintomático da DA envolve primeiramente a restauração da função colinérgica através do uso de inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela desativação do neurotransmissor acetilcolina por hidrólise, produzindo colina e acetato, reação que ocorre na fenda sináptica^{152,154}.

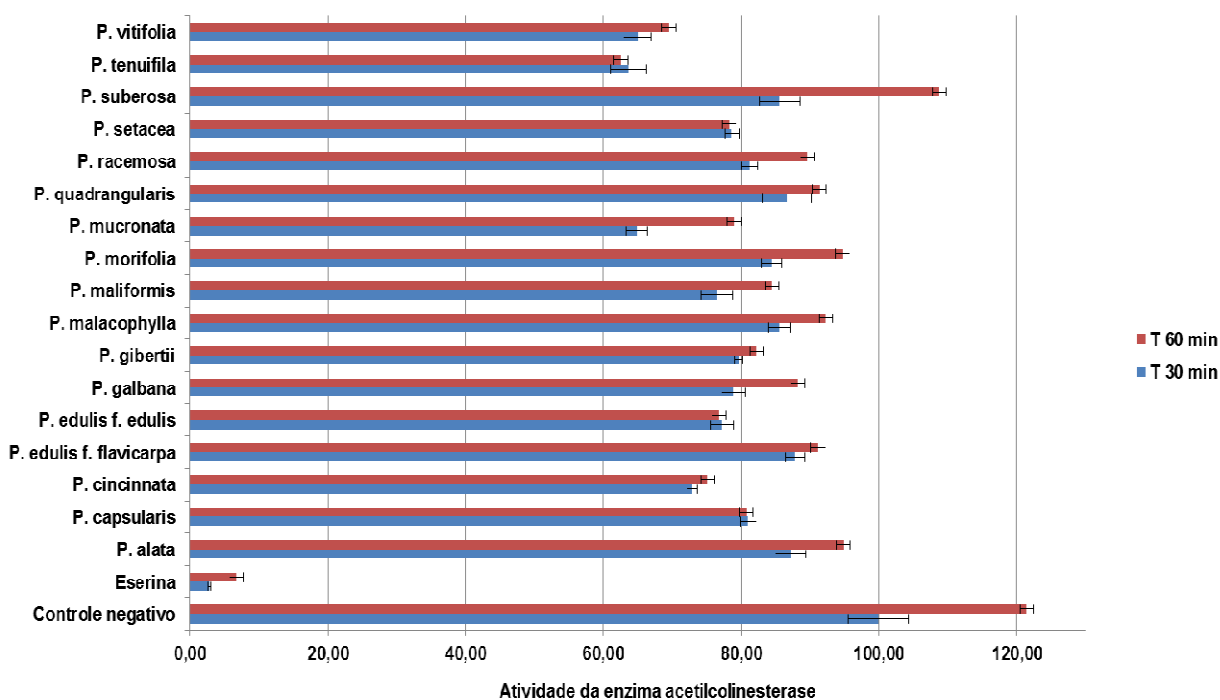
Inúmeras plantas têm sido descritas por apresentarem atividade inibidora da enzima AChE, tendo uma grande relevância nos estudos de tratamento da DA¹⁵⁵. Como não existe estudos na literatura sobre a atividade anticolinesterásica de extratos de folhas de *Passiflora*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticolinesterásica de extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de dezessete espécies de *Passiflora*.

A atividade anticolinesterásica foi avaliada quantitativamente usando um leitor de ELISA em $\lambda = 405$ nm, baseado no método de Ellman et al. (1997)¹¹⁷ e Atta-ur-Rahman et al. (2001)¹¹⁸. A eserina foi empregada como referência (controle positivo) no teste de inibição da enzima acetilcolinesterase. O procedimento experimental está descrito no item 5.9.2.

O método consiste na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise da acetiltiocolina pela enzima AChE. A tiocolina reage com o ácido 5-5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) (reagente de Ellman), produzindo o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico com intensa absorção em 405 nm¹¹⁷.

Os dados obtidos, apresentados na Figura 58, demonstraram que os extratos hidroetanólicos 64% (v/v) das espécies de *Passiflora* não apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase considerável, quando comparadas com o padrão eserina.

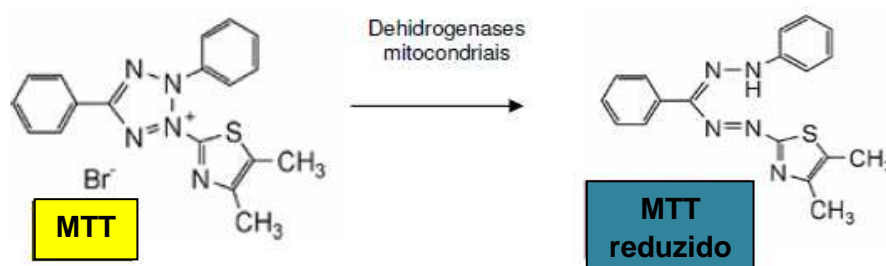
Figura 58 - Resultados da atividade da enzima acetilcolinesterase.



6.8.3. Atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células tumorais

O programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos vem utilizando a análise de citotoxicidade pelo método do MTT, descrito por Mosman (1983)¹¹⁹, para a descoberta de novos agentes anticâncer. Este método baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium MTT, que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazam, que são de cor azul escura (Figura 59), configurando-se em um ensaio versátil e quantitativo¹⁵⁶⁻¹⁵⁹.

Figura 59 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais.



O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação¹⁶⁰.

O presente trabalho teve como intuito fazer um *screening* inicial para determinar o possível potencial citotóxico dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de dezessete espécies de *Passiflora*, em três linhagens de células tumorais: OVACAR-8 (ovário - humano), HCT-116 (carcinoma de cólon) e SF-295 (Glioblastoma), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). O procedimento experimental está descrito no item 5.9.3.

Os resultados da avaliação da atividade antitumoral *in vitro* dos extratos de *Passiflora* frente às linhagens celulares, estão apresentados nas Figuras 60 a 62.

Figura 60 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de *Passiflora* frente as linhagens celulares HCT-116 (carcinoma de cólon).

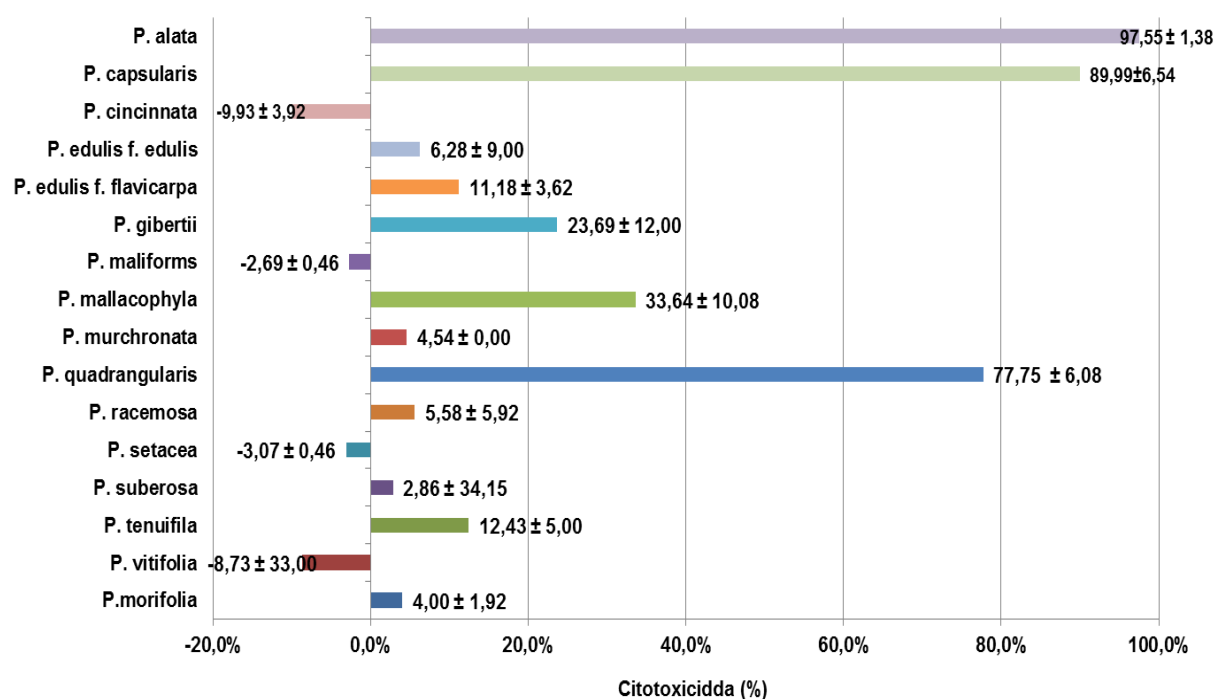


Figura 61 - Ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de *Passiflora* frente as linhagens celulares OVACAR-8 (ovário-humano).

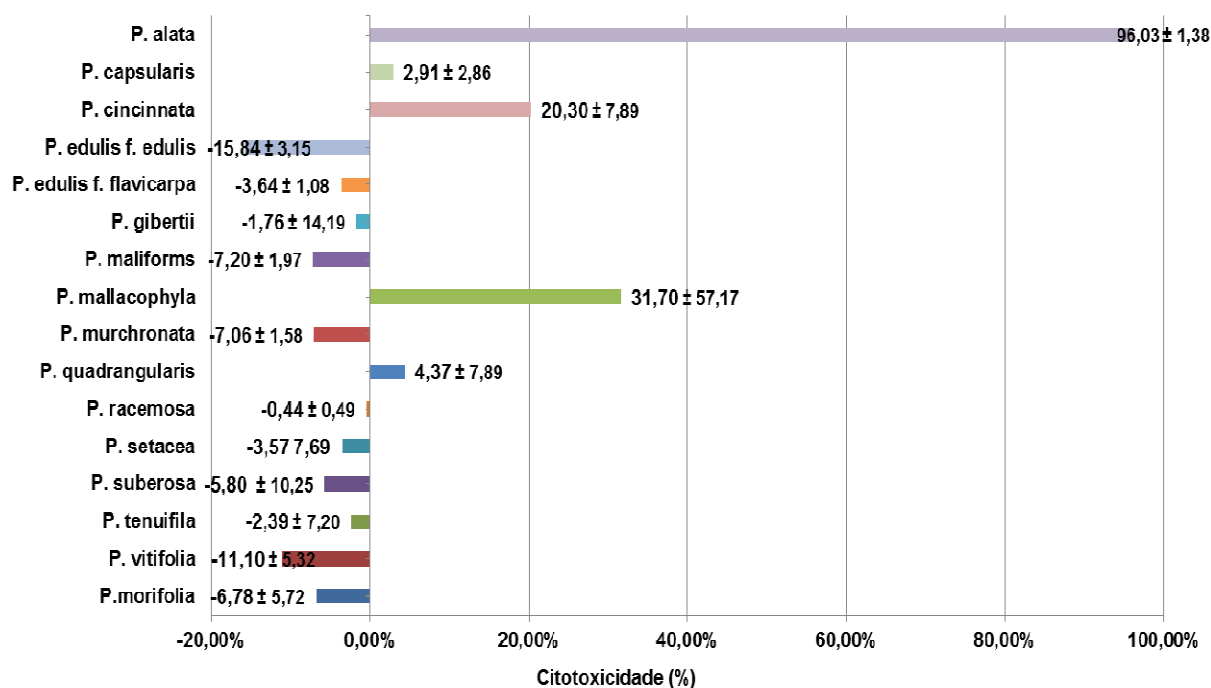
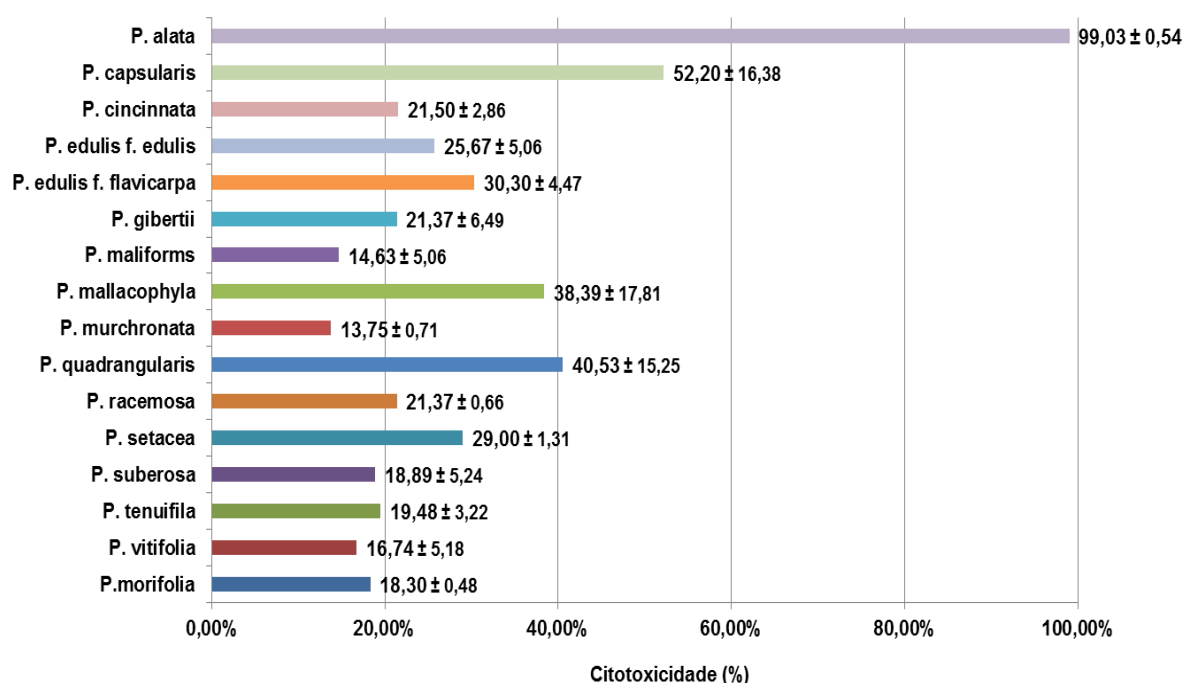


Figura 62 - Ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de espécies de *Passiflora* frente as linhagens celulares SF-295 (Glioblastoma).



Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI), o *screening* inicial para extratos brutos de plantas é realizado numa concentração de 50 µg/mL para

selecionar os extratos que apresentam substancial efeito antiproliferativo, com inibição de pelo menos 90% de proliferação da célula tumoral¹⁶¹. Sendo assim, o extrato de *P. alata* foi o único que demonstrou potencial citotóxico relevante, que corresponde a inibição do crescimento celular, frente às linhagens de células do ovário – humano (96,03%), carcinoma do cólon (97,55%) e glioblastoma (99,03%), com um percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90%. Os demais extratos não demonstraram potenciais citotóxicos relevantes, pois os valores ficaram abaixo de 90%.

Diante dos resultados do *screening* inicial, o extrato de *P. alata* foi selecionado para avaliação da sua CI_{50} visando avaliar seu potencial citotóxico (Tabela 32).

Tabela 32 – Valores de CI_{50} do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. alata* em linhagens de células tumorais, com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear.

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	HCT-116	OVACAR-8	SF-295
<i>P. alata</i>	3,603 (2,851 - 4,553)	>50	2,987 (2,624 - 3,401)

HCT-116: carcinoma do cólon; OVACAR-8: ovário – humano; SF-295: glioblastoma.

Diante do resultado demonstrado na Tabela 32, foi possível observar que o extrato hidroetanólico de *P. alata* apresentou forte atividade citotóxica *in vitro* frente a duas linhagens tumorais, elas: carcinoma do cólon (HCT-116) e glioblastoma (SF-295), mas sem atividade potencial contra a linhagem de carcinoma de ovário (OVACAR-8). Esses resultados demonstram um possível potencial antitumoral desse extrato, sendo necessário e interessante estudos posteriores para melhor avaliar o potencial antitumoral do extrato e seus constituintes.

Dentre as diversas atividades biológicas dos flavonoides, a ação antitumoral tem sido relatada em muitos trabalhos. Sendo assim, continuidade do trabalho, através de um estudo químico do extrato hidroetanólico 64% (v/v) de *P. alata*, pode levar à descoberta dos flavonoides que apresentam atividade citotóxica.

A atividade antitumoral *in vitro* foi investigada no extrato etanólico de folhas de *P. incarnata*, o qual apresentou atividade antitumoral significativa frente as linhagens de células tumorais¹⁶².

A atividade citotóxica foi investigada nos extratos éter de petróleo e clorofórmio das folhas e caules de *P. edulis*, onde verificaram que ambos os extratos apresentaram atividade citotóxica relevante¹⁶³.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível otimizar as condições do processo de extração no extrator acelerado com solventes (ASE) através do emprego de planejamento Box-Behnken. O planejamento Box-Behnken utilizado permitiu direcionar as condições dos processos de extração para a resposta desejada. Na extração, a resposta objetivada foi a maximização simultânea do rendimento do extrato e dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais através do emprego de uma função de desejabilidade. Os valores utilizados como otimizados foram: 80 °C, 64% para a proporção da solução hidroetanólica e 5 ciclos de extração. Desta forma, o processo de extração otimizado no ASE permitiu obter extratos padronizados de dezessete espécies de *Passiflora*. A vantagem da extração acelerada com solventes (ASE) quando comparada a outros métodos de extração é ser uma técnica simples, automatizada, rápida, que utiliza pequenas quantidades de solvente e que pode ser utilizada em escala industrial para obtenção de extratos padronizados.

O método cromatográfico desenvolvido para o *fingerprint* dos extratos hidroetanólicos 64% (v/v) de dezessete espécies de *Passiflora*, apresentou-se apropriado para a representatividade das amostras submetidas ao estudo, com separação das bandas cromatográficas capazes de caracterizar e distinguir as espécies de *Passiflora* analisadas. Conseqüentemente, infere-se que o método desenvolvido é uma alternativa viável e útil a ser utilizada no controle de qualidade químico, na identificação e determinação da autenticidade de fitoterápicos produzidos a partir de diferentes espécies de *Passiflora* de nossa flora. O procedimento de validação do método demonstrou que as análises cromatográficas foram reprodutíveis e forneceram perfis cromatográficos com precisão e repetibilidade adequados.

A aplicação do método cromatográfico validado na quantificação dos flavonoides orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina em espécies de *Passiflora*, demonstrou que existe variações na concentração dessas substâncias nas espécies estudadas. As maiores concentrações (mg/g de extrato e de planta seca) de flavonoides foram encontradas nas espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* (isorientina), *P. morifolia* (orientina), *P. setacea* (vitexina e isovitexina) e *P. gabana* (rutina). Dentre as espécies estudadas, a *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis* e

P. setacea foram as espécies que apresentaram o maior número de flavonoides quantificados.

Desta forma, por meio dos resultados obtidos no presente trabalho, ficou demonstrado que ambas as abordagens (qualitativa e quantitativa) apresentam aplicabilidade no estabelecimento de parâmetros de autenticidade e qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos à base de maracujá.

O teste de atividade antioxidante utilizando a metodologia do radical estável DPPH demonstrou que os extratos de *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. galbana*, *P. gibertii*, *P. malacophylla*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* e *P. vitifolia* possui atividade antioxidante quando comparado ao padrão ácido gálico. No teste de atividade anticolinesterásica, as espécies de *Passiflora* não apresentaram atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. A atividade citotóxica *in vitro* utilizando o método de MTT demonstrou que, dos extratos de *Passiflora* analisados, somente o extrato de *P. alata* apresentou potencial citotóxico relevante, com percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90%, frente as linhagens de células do ovário – humano, carcinoma do cólon e glioblastoma.

REFERÊNCIAS

- 1 FABRICANT, D. S; FAMSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 69-75, 2001.
- 2 CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- 3 BEZERRA, A. C. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 11, p. 26-32, 2007.
- 4 BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares (MNPC) – no SUS**. Brasília, DF, 25 fev. 2005..
- 5 CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó, SC: Editora Argos; 2001. p 500.
- 6 ALVES, N. D. C. et al. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficiais do estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 745-753, 2008.
- 7 TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 jun. 2006.
- 9 BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília, DF, 2006.
- 10 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 14, de 31 de março de 2010. **Registro de Medicamentos Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 abr. 2010.
- 11 BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde. **Estrutura de Mercado do Segmento de Fitoterápicos no Contexto Atual da Indústria Farmacêutica Brasileira**. Brasília, DF, 2007.
- 13 HE, X-G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 2000, p. 203-232, 2000.

- 14 LIANG Y-Z, X. P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.
- 15 DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, p. 71-76, 2004.
- 16 SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1219-1232, 2012.
- 17 DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
- 18 RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. 250 p.
- 19 FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. In: KUBITZI, K. (ed.). **The families and genera of vascular plants**, Berlin: Springer, v. 9, p. 270- 281, 2007.
- 20 NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Série Ciências Biológicas**, v.1, p.33-46, 2001.
- 21 CERVI, A. C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, p. 1-92, 1997.
- 22 IUCN. **Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 5 set. 2013.
- 23 MELETTI, L.M.M. **Maracujá: produção e comercialização**. São Paulo, Campinas: IAC, 1995. (Boletim técnico, n. 158).
- 24 SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997.
- 25 PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, p. 1-12, 2000.
- 26 ABREU, P.P. et al. *Passiflora* hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, p. 307-315, 2008.
- 27 Dhawan, K.; Kumar, S.; Sharma, A. Anti-anxiety on extracts of *Passiflora incarnata* Linnaeus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 165-170, 2001.
- 28 Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinckmann, J. **Herbal Medicine – Expanded Commission e Monographs**. Newton: American Botanical Council, 2000.

29 BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.408-420, 2006.

30 BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 49, de 23 de novembro de 2010. **Aprova a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 nov. 2010a.

31 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

32 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 09 de março 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 mar. 2010.

33 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 47, de 8 de setembro de 2009. **Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 agosto 2006.

34 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 5 de 11 de dezembro de 2008. **Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 de dez. 2008.

35 EMA. European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products. EMEA/HMPC/230962/2006. **Community Herbal Monograph on *Passiflora incarnata* L., herba**. 2007. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2010/01/WC500059213.pdf>. Acesso em: 5 set. 2013.

36 HC. Health Canada. **Monograph: Passionflower**. 2008. Disponível em: <<http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhp/nd-bdipsn/monoReq.do?id=145&lang=eng>>. Acesso em: 5 set. 2013.

37 QUINTELLA, C. M. et al. Prospecção tecnológica como uma ferramenta aplicada em ciência e tecnologia para se chegar à inovação. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 406-415, 2011.

38 INPI. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **Guia - Informação Tecnológica**. 2013. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/portal/artigo/guia_informacao_tecnologica>. Acesso em: 5 set. 2013.

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

- 40 MANN, J. **Secondary metabolism**. 2 ed. Oxford: Oxford Science, 2001. 374 p.
- 41 SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: Simões, C.M.O., Schenzel, E.P., Gosmann, G., Melo, J.C.P de, Mentz, L.A., Petrovick, P.R. coord. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 333-364 p., 2002.
- 42 HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, p. 1378-1384, 2008.
- 43 AMIC, D. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v. 76, p. 55-61, 2003.
- 44 HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B.. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 57, p. 43-46, 1996.
- 45 HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.
- 46 HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.
- 47 HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.
- 48 COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.
- 49 HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- 50 OGA, S. et al. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 27, p. 303-306, 1984.
- 51 LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigations of the raw materials from passiflora genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, p. 112-121, 1975.
- 52 PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 295-301, 2005.

- 53 MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.
- 54 MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.
- 55 PEREIRA, C. A. M. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 152, p. 241-248, 2004.
- 56 MOARES, M. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.
- 57 RAFFAELLI, A. et al. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v. 777, p. 223-231, 1997.
- 58 MASTEIKOVA, R. et al. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 65, p. 577-583, 2008.
- 59 FERRERES, F. et al. New C-Deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10187-10193, 2007.
- 60 ZIBADI, S. et al. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, p. 408-416, 2007.
- 61 ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.
- 62 KITE, G. C. et al. Data-directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 123-131, 2006.
- 63 ANTOGNONI, F. et al. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 78, p. 345-352, 2007.
- 64 SANTOS, K. C.; SANTOS, C. M.; OLIVEIRA, R. M. W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 306-309, 2005.
- 65 DOS SANTOS, K. C. et al. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 4, p. 565-573, 2006.

66 MÜLLER, S. D. et al. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.

67 MENGHINI, A. et al. Flavonoid contents in *Passiflora* spp. **Pharmacology Research Communications**, v. 27, p. 13-14, 1993.

68 ICHIMURA, T. Antihypertensive effect of na extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 718-721, 2006.

69 DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371-364, 2005.

70 VARGAS, A. J. et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112-119, 2007.

71 - Benincá, J. P. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1097-1105, 2007.

72 BRAGA, A. et al. Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 59-66, 2013.

73 ZUCOLOTTI, S. M. et al. Analysis of C-glycosil flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-239, 2012.

74 ECHEVERRI, F. et al. Ermanin: An insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry**, v. 30, p. 153-155, 1991.

75 ECHEVERRI, F. et al. Isolation of an ingestion deterrant from *Passiflora foetida* L. **Revista Boliviana de Química**, v. 10, p. 25-29, 1991.

76 VOIRIN, B. et al. Separation of flavones C-glycosides and qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by Capillary Zone Electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 90-98, 2000.

77 WOHLMUTH, H. et al. Pharmacognosy and Chemotypes of *Passiflora incarnata* L. (*Passiflora incarnata* L.). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 1015-1018, 2010.

78 BENDINI, A. et al. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 102-109, 2006.

- 79 RUDNICKI, M. et al. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 656-661, 2007.
- 80 BIRK, C. D. et al. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* specis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2285-2291, 2005.
- 81 PETRY, R. D. et al. Comparative pharmacological study of hidroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162-164, 2001.
- 82 PEKY, et al. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1119-1129, 2012.
- 83 CHABARIBERI, R. A. O. et al. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de Maytenus e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 860-864, 2009.
- 84 ALVES, S. F. et al. Flavonoid extraction from *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae) – using factorial design. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 12, p. 4621-4624, 2011.
- 85 LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activies and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1085-1090, 2011.
- 86 ZHANG, D. et al. Variation of active constituents and antioxidant activity in pyrola (*P. incarnata* Fisch.) from different sites in Northeast China. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2213-2219, 2013.
- 87 RAMOS, F. A. et al. An Orientin Derivative Isolated from *Passiflora tripartita* var. *mollissima*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 29, p. 141-143, 2010.
- 88 DENG, J. et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 148-153, 2010.
- 89 RAHMAN, K. et al. Isoscoparin-2"-O- β -glucoside from *Passiflora incarnata*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1093-1094, 1997.
- 90 PONGPAN, N. LUANRATANA, O.; SUNTORNSUK, L. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatography for vitexin analysis and fingerprint of *Passiflora foetida*. **Current Science**, v. 93, p. 378-382, 2007.
- 91 McCORMICK, S.; Mabry, T. J. The Flavonoids of *Passiflora sexflora*. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 782, 1982.

- 92 SIMIRGIOTIS, M. et al. The *Passiflora tripartite* (banana passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **From Molecules**, v. 18, p. 1672-1692, 2013.
- 93 MARECK, U. et al. The 6-C-chinovoside and 6-C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3486-3487, 1991.
- 94 ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. high-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 81-91, 2002.
- 95 ESCOBAR, L. K.; LIUT, Y. L.; MABRY, T. J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora coactilis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 796-797, 1983.
- 96 McCORMICK, S.; MABRY, T. J. Flavonoids from *Passiflora pavonis*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 623-624, 1981.
- 97 LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Londres, 1989.
- 98 JACQUES, R. A. et al. The use of ultrasound in the extraction of *Illex paraguariensis* leaves: a comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, 2007.
- 99 WIBISONO, R. et al. Optimisation of accelerated solvent extraction for screening of the health benefits of plant food materials. **Scientific Research**, v. 1, p. 220-230, 2009.
- 100 SPORRING, S. et al. Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 1-9, 2005.
- 101 RICHTER, B. E. et al. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1033-1039, 1996.
- 102 PIOMBO, G. et al. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). **Corps Gras Li**, v. 13, p. 195-199, 2006.
- 103 BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for study of quantitative variables. **Technometrics** 2, p. 455, 1960.
- 104 KAISER, S. et al. Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box-Behnken design. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 153-161, 2013.
- 105 SHENG, Z. et al. Optimization of total flavonoids content extracted from *Populus* using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 778-786, 2013.

- 106 LIU, Y.; WEI, S.; LIAO, M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 837-843, 2013.
- 107 WANG, X. et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizome* with response surface methodology. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 20, p. 846-854, 2013.
- 108 BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.
- 109 FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.
- 110 NIST/SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods**. Disponível em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>. Acesso em: 02 set. 2013.
- 111 KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 113-119, 2011.
- 112 HADJMOHAMMADI, M.; SHARIFI, V. Simultaneous optimization of the resolution and analysis time of flavonoids in reverse phase liquid chromatography using Derringer's desirability function. **Journal of Chromatography B**, v. 880, p. 34-41, 2012.
- 113 SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. **Americal Journal of Enology Viticulture**, v. 16, p. 144, 1965.
- 114 GEORGÉ et al. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 1370, 2005.
- 115 FU, W. et al. Antioxidant, free radical scavenging anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Paratathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 521-528, 2010.
- 116 RUFINO et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa - Comunicado Técnico on line 127**, Fortaleza, CE, 2007.
- 117 ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- 118 ATTA-UR-RAHMAN et al. Acetyl and butyrylcholinesterase-inhibiting triterpenoid alkaloids from *Buxus papillosa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 963-968, 2001.

- 119 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.
- 120 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- 121 MHRA. **Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency**. Disponível em: <<http://www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Medicines/Herbalmedicines/>>. Acesso em: 18 ago. 2013.
- 122 CUNHA, A.P.; CARDOSO, E.L.C. **Variabilidade genética e melhoramento do maracujá. Recursos Genéticos e melhoramento de plantas no Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido: 1998. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/maracuja.pdf>. Acesso em: 09 set. 2012.
- 123 JUNGHANS, T. G.; SILVA, L. F.; JESUS, O. N.; MARQUES, G. C. Caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro por meio de descritores relacionados ao desenvolvimento de frutos e sementes. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, Bento Gonçalves. **Anais do XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**. Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2012. p. 4495-4498.
- 124 CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidante phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 217-225, 2007.
- 125 PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1995. v. 2.
- 126 NORIEGA, P. et al. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1119-1129, 2012.
- 127 AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Method of Analysis**. Washington, 1965.
- 128 FU, W. et al. Antioxidant, free radical scavenging anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Paratathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 521-528, 2010.
- 129 MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113 p.
- 130 MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 1970. 354 p.

- 131 VANHAELEN-FASTRÉ, R. J. et al. High performance thin-layer chromatographic determination of six major ginsenosides in *Panax ginseng*. **Journal of Chromatography**, v. 868, p. 269-276, 2000.
- 132 LINGEMAN, H.; HOESTRA-OUSSOREN, S. J. F. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 689, p. 221-237, 1997.
- 133 SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 3-14, 1996.
- 134 CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: Edufscar, 2001.
- 135 MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.
- 136 MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, p. 1559-1568, 2010.
- 137 JI, Y. B.; XU, Q. S.; HU, Y. Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, n. 1-2, p. 97-104, 2005.
- 138 FAN, X. H.; CHENG, Y. Y.; YE, Z. L.; LIN, R. C.; QIAN, Z. Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 2, p. 217-224, 2006.
- 139 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 mai. 2012.
- 140 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- 141 RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- 142 BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- 143 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 1. ed. Rima, 2004.

- 144 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como construir modelos empíricos. In: Como fazer experimentos.** Campinas, SP: UNICAMP, 2007.
- 145 INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos.** 2007.
- 146 LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** 1. ed. Rima, 2004.
- 147 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.
- 148 GOSMANN, G. et al. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.
- 149 SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- 150 BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- 151 SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: in vitro and in vivo study. **Food Research International**, *In Press*, 2013.
- 152 BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006.
- 153 GOMES, A. M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Revista de Psiquiatria**, v. 27, p. 197-205, 2005.
- 154 RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.
- 155 MUKHERJEE, P. K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 14, p. 289-300, 2007.
- 156 PESSOA, C. et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 187-191, 2000.
- 157 COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Antiproliferative effects of abietane diterpenes from *Aegiphila lhotzkyana*. **Planta Medica**, v. 70, p. 180-182, 2004.

158 BEZERRA, D. P. et al. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from Piper Species. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 60, p. 539-543, 2005.

159 BEZERRA, D. P. et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 599-607, 2008.

160 BERRIDGE, M. V. et al. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

161 MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439-445, 2009.

162 SUJANA, N. et al. Antitumour potential of *Passiflora incarnata* L. against ehrlich ascites carcinoma. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 17-20, 2012.

163 RIPA, F. A. et al. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. **European Journal of Scientific Research**, v. 31, p. 592-598, 2009.

GLOSSÁRIO

Como o presente trabalho está inserido no campo de medicamentos fitoterápicos e correlatos e que, nessa área do conhecimento, as terminologias utilizadas na literatura são muitas vezes confusas ao leitor, faz-se necessário esclarecer os principais termos que serão citados, abordados e discutidos, dentro do contexto que envolve a terapia com plantas medicinais. A definição dos termos abaixo foi baseada na Resolução RDC nº 14, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em 2010¹⁰.

Derivado vegetal: produtos de extração da planta medicinal in natura ou da droga vegetal: extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros.

Droga vegetal: planta medicinal ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

Matéria-prima vegetal: planta medicinal, droga vegetal ou o derivado vegetal.

Marcador: substância ou classe de substâncias químicas (ex: alcaloides, flavonoides, taninos, etc.) presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico.

Medicamento fitoterápico: é o medicamento obtido utilizando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja a eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso (que pode ser profilático ou terapêutico), assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não podem ser incluídos como fitoterápico:

- qualquer medicamento que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações destas com extratos vegetais;
- planta medicinal ou suas partes, mesmo após o processos de coleta, estabilização e secagem, seja ela íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada;
- chás e medicamentos homeopáticos.

Planta medicinal: é uma espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos.

Perfil cromatográfico: padrão cromatográfico de constituintes característicos, obtidos em condições definidas, que possibilite a identificação da espécie vegetal em estudo e a diferenciação de outras espécies.