



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO MULTIDISCIPLINAR UFRJ-MACAÉ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



MAYARA SANTOS DE SOUZA

**MÉTODOS ANALÍTICOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES EM PRODUTOS
CONTENDO *PASSIFLORA* spp.: UMA REVISÃO DE ESCOPO.**

Macaé

2022

MAYARA SANTOS DE SOUZA

**MÉTODOS ANALÍTICOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES EM DIFERENTES PRODUTOS
CONTENDO *PASSIFLORA* spp.: UMA REVISÃO DE ESCOPO.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado
ao Curso de Farmácia do Instituto de Ciências Farmacêuticas
do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé, como requisito
para obtenção do título de farmacêutico.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Marina Cardoso Nemitz.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Vítor Todeschini

Macaé

2022

Verso da folha de rosto

CIP - Catalogação na Publicação

S729

Souza, Mayara Santos de

Métodos analíticos de cromatografia líquida para determinação de flavonoides em diferentes produtos contendo *Passiflora* spp.: uma revisão de escopo / Mayara Santos de Souza - Macaé, 2022.

85 f.

Orientador(a): Marina Cardoso Nemitz

Coorientador(a): Vítor Todeschini.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. *Passiflora*. 2. Métodos cromatográficos. 3. Flavonoides.
I. Nemitz, Marina Cardoso, orient. II. Todeschini, Vítor, coorient. III. Título.

CDD 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

Mayara Santos de Souza

Métodos analíticos de cromatografia líquida para determinação de flavonoides em diferentes produtos contendo *Passiflora* spp.: uma revisão de escopo

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 19 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof^ª. Dr^ª. Marina Cardoso Nemitz (Presidente da Banca)

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4337263185352442>

Prof^º. Dr. Maximiliano da Silva Sangoi

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/9077694098407886>

Dr. Marlon Heggdorne de Araújo

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/9779013239404101>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, apesar de não me considerar uma pessoa religiosa, sem a minha fé eu não chegaria até aqui.

Abaixo de Deus, apenas a minha família, aos meus pais, Liliane e Fernando Gabriel, espero um dia ser capaz de agradecer por todo o apoio e incentivo, principalmente psicológico e financeiro, às minhas escolhas e da Isadora desde quando éramos crianças. Principalmente, nesses 5 anos, que escolhi estudar a 634 km longe de casa, aos 17 anos, sozinha, mas vocês já haviam me preparado há muito tempo. Apesar do preparo, ninguém avisa das responsabilidades de morar sozinha em outra cidade e da saudade, ahhhh essa é a que mais dói, os finais de semana namorando as fotos de vocês na chácara e a família toda reunida... não irei me prolongar muito, pois as lágrimas já preenchem meus olhos. A Isadora, minha melhor amiga, da vida, ela querendo ou não, quanta inspiração para a mulher que se tornou e que seu sucesso está garantido, apesar de continuar birrenta, às vezes, e mesmo não querendo agradeço a tecnologia pelas vezes que liguei em chamada de vídeo e me atendeu, te tirei do seu momento de Netflix, ou de leitura, ou até mesmo aquele soninho gostoso, para poder conversar um pouquinho e me fazer companhia. Amo muito vocês, e se um dia for possível, o mundo eu darei.

Quando entrei na faculdade, cheguei destemida, falando com todo mundo, na tentativa de fazer amizades mesmo, afinal acredito ser impossível alguém não criar vínculos durante a graduação. E a tentativa deu certo e foi um sucesso, o resultado foi Geovana Imad, Caroline Oliveira, Isabella Passaline, Nayara Cecche, Júlia Nogueira, Natália Marques, Juliana Barros, Matheus Freitas, Luíza Ribeiro e James França. Minha família macaense, o que seria de mim sem vocês nesses anos, desde às boas risadas de escorrer lágrimas pelos olhos até os choros em conjunto, e aqui eu vivi na saúde e na doença. Agradeço pelos aniversários com uma fatia de bolo e um incenso, pelas memórias e momentos que nunca esquecerei no Caribe Brasileiro, pelos conselhos e ombros para chorar, por ter realizado meu sonho de criança de ser a Cinderella, pelos almoços de domingo com entrada, prato principal e sobremesa, pelas festinhas, pela companhia em pleno feriado quando a minha avó faleceu, pelo cuidado quando estava doente, pelas risadas com as palhaçadas de vocês, pelas noites com vinho, gin e fofoca, pelo *cheddar* na parede que não deve ter saído até hoje e por andar de carrinho e quase levar uma multa. Nunca esquecerei de cada detalhe desses 5 anos, sem vocês não teria valido a pena.

Aos meus amigos desde a época da escola, Matheus Xavier e Milena Somenzari, os primeiros a colocarem os tijolinhos e iniciarem a lapidação para quem sou hoje. Às minhas amigas de Belo Horizonte, Ana Helena e Luciana Marina, não fazíamos ideia, mas já estavam me preparando para a graduação.

Como representantes de todos os professores, agradeço ao prof^o Cid Pereira, que desde o início da graduação, atuou como um mentor acadêmico e profissional, se tornando um amigo. A prof^a Marina Nemitz, por ter topado a minha orientação nesse trabalho e com o meu projeto de mestrado, e toda a paciência e compreensão durante todo o processo. Ao prof^o Vítor Todeschini pela orientação em conjunto com a Marina para entrega com sucesso do presente trabalho.

RESUMO

As plantas do gênero *Passiflora* fazem parte da biodiversidade brasileira. Diversos constituintes químicos já foram identificados em suas espécies, destacando-se a presença de substâncias majoritárias da classe dos flavonoides. O conhecimento popular, bem como, os estudos científicos, indicam importantes atividades farmacológicas, principalmente relacionadas com os efeitos ansiolíticos e antiespasmódicos dessa classe de metabólitos secundários. Desta forma, as espécies de *Passiflora* constituem um potencial recurso natural para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, sendo fundamental, portanto, que os métodos de controle de qualidade aplicados para a sua avaliação sejam reprodutíveis e confiáveis. O objetivo do presente trabalho foi efetuar um estudo de revisão de técnicas analíticas para a avaliação de flavonoides em produtos de *Passiflora* spp, principalmente focando nas de cromatografia líquida e validadas. A estratégia de buscas dos artigos científicos empregou as bases de dados *PubMed*, *Scielo*, *Scopus* e *Web of Science*, com as palavras chaves e operadores booleanos: (*passiflora* OR "passion fruit" OR maracuja*) AND (flavonoid*). A busca ocorreu nos títulos e resumos de artigos publicados entre 1980 e 2021. Os resumos dos trabalhos encontrados foram avaliados e para seleção dos documentos foram aplicados critérios de inclusão (CI) e exclusão (CE). Os dados de interesse foram avaliados quali e quantitativamente. O gerenciador de referências utilizado para a exportação dos artigos foi o Mendeley®. O somatório do levantamento nas bases de dados identificou 762 artigos, dos quais 92 artigos foram selecionados após aplicação dos CI e CE. Dentre estes, 36 trabalharam com a espécie *Passiflora edulis*, sendo que 20 trabalharam com apenas essa espécie. Além disso, 82 abordaram variações das técnicas de cromatografia líquida (CL) para avaliações químicas dos materiais. A maioria dos artigos (n = 44) utilizaram a técnicas com o objetivo de obter resultados de natureza qualitativa e quantitativa, como identificação, quantificação, caracterização. Destaca-se que apenas 10 estudos validaram por completo um método cromatográfico em seus trabalhos, sendo que um deles aplicou o método para avaliação de marcadores em formulação tópica, também sendo encontrado avaliação em cápsulas, suplementos alimentares, tinturas e extratos vegetais brutos. Com relação as partes das plantas de interesse dos estudos, as folhas (n = 43) são as partes mais estudadas, havendo também pesquisas com frutos (casca, polpa, sucos) e caules. Em referência aos flavonoides, os mais relatados são: isovitexina (n = 43), vitexina (n = 40), isoorientina (n = 34), orientina (n = 34), quercetina (n = 20) e rutina (n = 19). Foi realizada uma revisão de escopo, a partir de uma metodologia reprodutível e sistematizada para mapear evidências científicas que descrevem métodos analíticos de CL para determinação e identificação de flavonoides em diferentes produtos contendo *Passiflora* spp. Apesar de esta técnica ter sido amplamente descrita para avaliação das amostras, poucos trabalhos (aproximadamente 11%) descreveram a análise de validação do método e aplicação em diferentes matrizes, demonstrando que muitas pesquisas investigam o perfil quali e quantitativo nos derivados da planta, mas, nem sempre seus estudos garantem a adequabilidade e confiabilidade de suas análises conforme os órgãos regulamentares sanitários exigem.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida, Flavonoides, *Passiflora*, Revisão de escopo, Validação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flores de <i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> e <i>P. incarnata</i>	16
Figura 2 - Estruturas químicas representadas dos flavonoides: orientina, isoorientina, schaftosideo, isoschaftosideo, vitexina e isovitexina.....	17
Figura 3 – Representação esquemática da aparelhagem de um cromatógrafo líquido.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da busca e seleção de dados do presente estudo.....	37
Figura 5 - Partes da planta do gênero <i>Passiflora</i> estudadas nos artigos.....	39
Figura 6 - Tipos de amostras estudadas nos artigos.....	39
Figura 7 - Representação gráfica da quantificação dos estudos em três grupos de documentos: apenas 1 espécie de <i>Passiflora</i> , mais de 1 espécie de <i>Passiflora</i> e documentos que relataram investigação de outros gêneros em conjunto com espécies de <i>Passiflora</i>	41
Figura 8 - Espécies estudadas nos artigos que investigaram apenas 1 espécie.....	41
Figura 9 - Frequência das espécies descritas nos artigos que trabalharam com mais de 1 espécie.....	43
Figura 10 - Espécies de <i>Passiflora</i> empregadas nos artigos com pelo menos um gênero além da <i>Passiflora</i>	44
Figura 11 - Flavonoides relatados nos 91 artigos.....	46
Figura 12 - Frequência de descrição dos flavonoides nos 91 artigos.....	47
Figura 13 - Representação gráfica da finalidade dos 91 artigos, sendo os que realizaram análise qualitativa e quantitativa, análise qualitativa e análise quantitativa.....	48
Figura 14 - Representação gráfica de técnicas cromatográficas individualmente ou em conjunto nos 91 artigos.....	49
Figura 15 - Representação quantitativa dos diferentes modelos de cromatografia líquida descritas nos trabalhos.....	51
Figura 16 - Representação quantitativa dos diferentes modelos de detectores empregados nos artigos que abordam técnicas de cromatografia líquida.....	52
Figura 17 - Cromatograma da tintura de <i>Passiflora incarnata</i> (60% v/v) com atribuições de CLAE-UV-EM para detecção dos componentes. Os picos representados são: 6,8-di-C-	

glucosylapigenin (1p), isoschaftosídeo (2p), schaftosídeo (3p), homoorientina (4p), isovitexin-2''-O-glucoside (5p), vitexina (6p) e isovitexina (7p).....60

Figura 18 - Cromatogramas de CLAE-UV/DAD de extratos contendo flavonoides. *P. incarnata* (A) *P. alata* (B) *P. caerulea* (C) e *P. edulis* (D).....61

Figura 19 - Cromatograma CLAE-UV/DAD de extrato de polpa de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener.....62

Figura 20 - Cromatogramas CLAE da mistura de padrões (esquerda superior), *P. incarnata* (esquerda inferior), e suplementos alimentares (DS-01 e DS-03). Os flavonoides representados por orientina (6), isoorientina (7), vitexina (8) e isovitexina (9).....63

Figura 21 – Cromatograma de CLAE do extrato hidroetanólico de *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo os picos isoorientina (1), orientina (2), vitexina (3) e isovitexina (4).....64

Figura 22 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora quadrangularis*. (1). orientin-2''- O -glucosídeo, (2) orientin-2''– O -xilósídeo, (3) orientina, (4) vitexina-2''– O -glicosídeo, (5) vitexina-2''– O -xilósídeo, (6) vitexina.....65

Figura 23 - Cromatogramas de Extrato bruto de espécies de *Passiflora* com quantificação de vitexina. *P. edulis* var *edulis* (Preto), *P. tripartita* var *molíssima* (Azul), *P. mixta* (Rosa), Padrão Vitexina (Marrom). Detecção: 340 nm. (A) Produtos provenientes de *Passiflora molíssima*. A-2 (Preto) A-1 (Azul) B-1 (Rosa) B-2 (Marrom) Padrão Vitexina (Verde). Detecção: 340 nm. (B) Produtos com *P. incarnata*. C-1 (preto) C-2 (azul) Padrão vitexina (rosa).....66

Figura 24 – Cromatograma obtido da técnica CLAE-EM/EM de extrato de folha de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Compostos: vicenina-2 (1; Rt 9,8 min); orientina (2; Rt 11,3 min); isoorientina (3; Rt 11,5 min); vitexina (1; Rt 11,9 min) e isovitexina (1; Rt 12,3 min) (A). Cromatograma CLUE-UV do extrato de folha de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*., composto de isoorientina (1; R t 26,7 min) (B).....67

Figura 25 – Representação dos cromatogramas por análise CLUE-UV dos três diferentes métodos de extração (HAE, UAE e MAE) empregados com a espécie *P. edulis*. (A) orientina, (B) isoorientina e (C) isovitexina.....68

Figura 26 - Cromatogramas identificando os três flavonoides em *P. coccínea*, sendo os picos 2''-O-β-D-glucopiranosil-vitexina (1), vitexina (2) e isovitexina (3) do extrato metanólico (A) e extrato glicólico (B). Cromatogramas do extrato metanólico (C) e extrato glicólico (D) com o pico de isovitexina marcado com (*).69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Top 10 fitoterápicos mais vendidos em 2014 no Brasil.....	21
Tabela 2 - Exemplos de artigos de revisão que abordam metodologias analíticas para compostos presentes em espécies de <i>Passiflora</i>	31
Tabela 3 - Critérios de inclusão e exclusão empregados no presente estudo.....	36
Tabela 4 - Espécies estudadas individualmente, além de <i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> e <i>P. incarnata</i> ...	42
Tabela 5 - Dados extraídos dos 10 artigos desta revisão que descreveram e validaram método de cromatografia líquida para análise de amostras contendo <i>Passiflora</i>	54
Tabela 6 - Levantamento da literatura do tempo de retenção, comprimento de onda máximo e íons majoritários dos principais flavonoides presentes em espécies de <i>Passiflora</i>	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros e suas respectivas funções para a validação de métodos analíticos.....	29
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Critérios de Exclusão
CG	Cromatografia Gasosa
CI	Critérios de Inclusão
CL	Cromatografia Líquida
CLAE/HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector do tipo Ultravioleta
CLUE/UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CP	Cromatografia de Papel
DAD	Detector Ultravioleta de Arranjo Linear de Fotodiodos
EC	Eletroforese Capilar
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EM/MS	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
FB	Farmacopeia Brasileira
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
HPLC-QqQ-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadripolo
HPLC-UV/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detector do tipo UV e DAD
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alto Desempenho
HSCCC	Cromatografia Contracorrente
ICH	Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano
IFAN	Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Natural

IN	Instrução Normativa
MPLC	Cromatografia Líquida de Média Eficiência
NI	Não Informado
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RPHPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
SQR	Substância Química de Referência
SUS	Sistema Único de Saúde
UV	Espectrofotometria por Ultravioleta
QqQ	Detector do Tipo Triplo Quadrupolo de Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PRODUTOS NATURAIS.....	14
1.2 <i>PASSIFLORA</i> spp.....	16
1.3. FITOTERÁPICOS E CONTROLE DE QUALIDADE.....	21
1.4. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	24
1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
1.6. LITERATURAS DE REVISÃO SOBRE <i>PASSIFLORA</i> SPP.....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. METODOLOGIA.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

Desde o princípio, o ser humano busca na natureza recursos provenientes de plantas e animais como matéria-prima para a sua alimentação, moradia, vestimenta e medicação, sendo essa atividade responsável pelo seu desenvolvimento econômico e social (GARCIA, 1995). Caracterizado pela antropogenia, definida como a capacidade do ser humano de interferir no meio ambiente, é o ser vivo que mais transforma a natureza (ROLLA, 2010). Sendo a natureza, então, a principal fonte de moléculas com ativos terapêuticos e utilizadas em estudos de biologia molecular, fisiologia e processos patológicos (SIMÕES, 2017).

A ingestão e o emprego cutâneo de ervas e folhas, buscando o alívio e a cura de doenças, caracteriza uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, sendo utilizados desde o passado da humanidade (VIEGAS, 2006). Os produtos naturais são encontrados em diversas fontes presentes na natureza, podendo ser de origem marinha, fúngica, vegetal e animal. Na área farmacêutica, diversos medicamentos são obtidos a partir de substâncias biologicamente ativas presentes em diferentes espécies vegetais. Isso ocorre por causa da grande diversidade molecular das plantas, as quais apresentam substâncias químicas com diferentes propriedades bioativas, com mecanismo de ação conhecido ou não (SOUSA, 2009; MULLER, 2006).

Para o desenvolvimento de determinado fármaco a partir de um metabólito com origem vegetal, muitos estudos fitoquímicos e biológicos devem ser realizados para verificar a eficácia e segurança do produto pretendido.

Inicialmente, realiza-se a obtenção de extratos vegetais a partir de espécies de interesse devidamente identificadas por botânicos. Nesta etapa, diferentes métodos extrativos podem ser empregados, divididos em processos de extração a frio e a quente, utilizando, como princípios físico-químicos, a difusão e/ou a lavagem da matéria-prima. Dentre os processos a frio encontram-se percolação, maceração e turbolização. Enquanto os processos extrativos a quente podem ser divididos em dois subgrupos: sistemas abertos que abrange infusão e decocção, e os de sistemas fechados que são as extrações em aparelho de refluxo e em aparelho de Soxhlet (SIMÕES, 2017).

Após obtenção dos extratos, estes são investigados quanto ao perfil fitoquímico, sua atividade biológica e demais características de farmacocinética, mecanismo de ação e segurança

para que o produto acabado seja analisado por metodologias analíticas de controle e garantia de qualidade e regularizado em agências sanitárias.

Com relação a determinação do perfil fitoquímico, etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos principais componentes químicos do vegetal são relevantes para identificação de metabólitos secundários, que podem ou não apresentar efeitos farmacológicos, além de determinação dos marcadores químicos necessários para os estudos de degradação e de estabilidade dos produtos intermediários ao final (TOLEDO; HIRATA, 2003). Para a avaliação de atividades biológicas, é preconizado pela legislação que ensaios pré-clínicos e clínicos sejam realizados, já que a biotransformação pode influenciar na eficácia e/ou segurança do produto. Sendo assim, ensaios farmacológicos e toxicológicos em animais e em humanos são realizados para verificação se ocorre ou não desvios de qualidade terapêutica tanto na formulação intermediária até a final do fitoterápico (BASSANI; GONZÁLEZ ORTEGA; PETROVICK, 2005; FONSECA et al., 2020).

O Brasil, detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, tem papel de destaque como fonte de matéria-prima de produtos naturais devido a sua extensão litorânea e a sua vasta flora (PINTO, 2002). Um exemplo de como os produtos naturais podem gerar produtos farmacêuticos é o medicamento Acheflan[®], um anti-inflamatório que a sua matéria-prima são as folhas da *Cordia verbenacea* DC, espécie facilmente encontrada nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil (LEAL-COSTA, 2017). Dos pontos de vista farmacêutico, cosmético e nutracêutico, há uma ampla revisão dos produtos naturais provenientes de plantas da biodiversidade brasileira, porém poucos chegaram ao mercado mundial de medicamentos, desenvolvidos fora do Brasil, sendo alguns exemplos a bradicinina isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA) que originou o medicamento Captoten[®]. Além do Salagen[®] da Novartis, proveniente do alcaloide pilocarpina, isolada de *Pilocarpus sp* (Rutaceae), que compõem o sucesso de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais isolados de espécies vegetais da biodiversidade brasileira (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

Caracteriza-se metabólitos secundários como produtos dos metabólitos primários, sendo esses essenciais para que os seres vivos realizem as suas funções vitais. Os metabólitos secundários são encontrados em poucos grupos de plantas e em concentrações baixas, apresentando baixo peso molecular, estrutura complexa e, em muitos casos, atividades biológicas relevantes. A eficácia das atividades biológica e farmacológica, além da segurança de seu uso como compostos bioativos para desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos

e agroindustriais, têm sido alvo de muitos estudos. São exemplos de metabólitos secundários de interesse farmacêutico os alcaloides, antraquinonas, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, metilxantinas, taninos e triterpenos/esteroides. Destaca-se, desse grupo de compostos, os flavonoides, de grande interesse pela indústria farmacêutica, pois alguns representantes dessa classe possuem propriedades bioativas como antioxidantes, anti-inflamatórios antitumorais e antivirais, dentre outras (SIMÕES, 2017).

1.2. *Passiflora* spp.

Um grupo de grande destaque na biodiversidade brasileira, são as plantas do gênero *Passiflora*, o qual comporta cerca de 500 espécies, sendo o maior número dentro da família Passifloraceae, e conhecido popularmente como maracujazeiro (DHAWAN, 2004). A maioria das espécies desse gênero possuem origem na América Tropical, abrangendo o Brasil, a Colômbia, o Peru, o Equador, a Bolívia e o Paraguai, há também espécies nativas da Argentina aos Estados Unidos, além de países como Austrália e China. Porém, os maiores detentores do cultivo e diversidade de espécies comerciais e silvestres do maracujazeiro são o Brasil e a Colômbia (EMBRAPA, 2016). Dentre as espécies cultivadas nacionalmente, *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis (**Figura 1**) são as com maior recorrência e as que estão presentes na Farmacopeia Brasileira (FB), sendo a *P. edulis* conhecida comumente como o maracujá-amarelo e a *P. alata* como maracujá-doce. Além de ambas espécies estarem em monografias na FB, acompanham a espécie *P. incarnata* Linnaeus no Formulário Nacional de Fitoterápicos da FB.



Figura 1: Flores de *P. alata* (esquerda), *P. edulis* (centro) e *P. incarnata* (direita).

Fonte: Elaborado pelo autor, com adaptação de EMBRAPA (2006), Imig (2014) e Guseinov (2019).

As principais partes utilizadas das plantas deste gênero são as suas folhas, tendo como constituintes fitoquímicos flavonoides, alcaloides, saponinas, glicosídeos cianogênicos e terpenóides, e partes aéreas, sendo as folhas secas bastante utilizadas como calmante (ALVES, 2020). Apesar do desconhecimento do metabólito responsável por essa função, há estudos que

correlacionam essa propriedade que promove um relaxamento com os flavonoides, em sua maioria do tipo di-C-heterosídeos de flavonas (SIMÕES, 2017). Os principais flavonoides que já foram identificados e quantificados em espécies do gênero são isovitexina, vitexina, orientina e isoorientina (**Figura 2**) (SARAVANAN, 2014; SIMÕES, 2017). Importantes constituintes químicos também foram identificados, sendo eles ácidos fenólicos e glicosídeos cianogênicos.

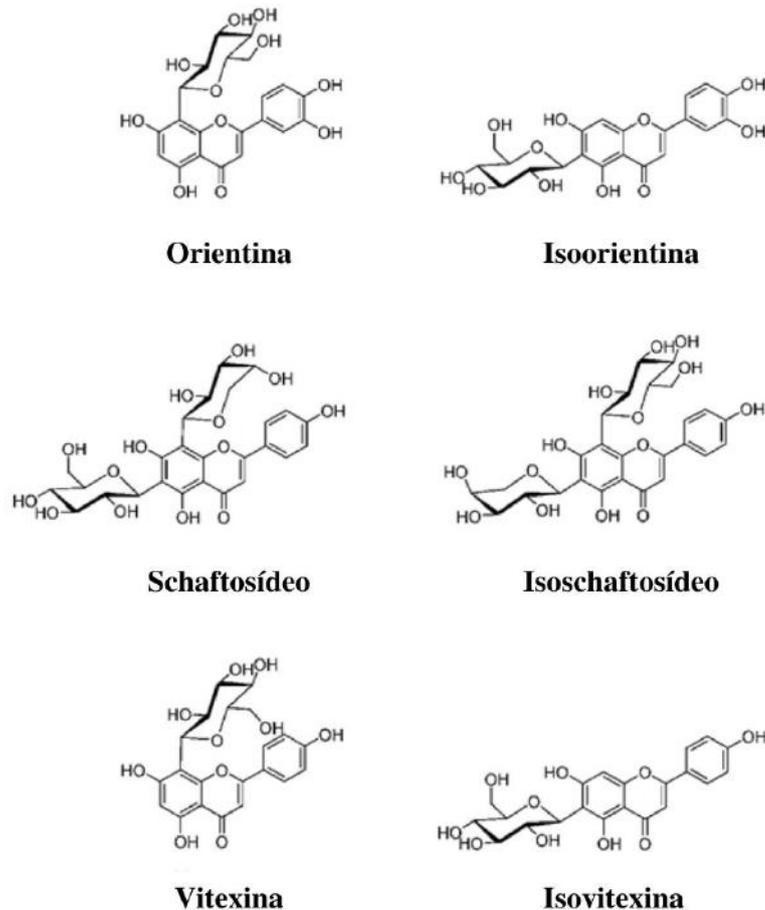


Figura 2: Estruturas químicas representadas dos flavonoides: orientina, isoorientina, schaftosídeo, isoschaftosídeo, vitexina e isovitexina. **Fonte:** Adaptado de TREMMEL (2021).

O uso popular das espécies de maracujá tem atribuição às propriedades sedativas, antiespasmódicas e ansiolíticas nos derivados das folhas e/ou partes aéreas, sendo já realizado estudos comprovando parcialmente esses efeitos em animais e em seres humanos. Ensaios pré-clínicos com extrato de *P. incarnata* demonstraram a ação sedativa em diferentes experimentos realizados com camundongos e ratos, o prolongamento significativo do sono induzido por pentobarbital, além da presunção de que o maracujá e o Diazepam possuem o mesmo mecanismo de ação (MIRODDI et al., 2013). Os benzodiazepínicos são comumente utilizados

na psicoterapia para tratar os transtornos de ansiedade, bastante eficazes no tratamento de curto prazo, seu uso excessivo pode causar dependência (MIYASAKA; ATALLAH; SOARES, 2007). Em um estudo clínico do tipo randomizado duplo-cego, a comparação do benzodiazepínico oxazepam com o extrato de *P. incarnata* no tratamento de transtorno de ansiedade generalizada, indicou que ambos são eficazes, porém o extrato de maracujá se destaca pela baixa incidência de comprometimento do paciente no seu desempenho no trabalho frente ao oxazepam (AKHONDZADEH et al., 2001). Com relação a atividade ansiolítica, foi atribuída a di-C-heterosídeos de flavonas derivados de apigenina e luteolina, por exemplo a isoorientina e a vicenina-2 (NEGRI, 2011).

As folhas são a parte mais utilizada do vegetal desse gênero para fins medicinais, detentora de propriedades farmacológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antiasmáticas, analgésicas, sedativas e vermimaculadas. São relatados na literatura algumas espécies do gênero e a parte da planta responsável pelo seu uso tradicional em diversos países. como, as raízes de *P. capsularis* L. para ação enemagoga, flores de *P. gardneri* Mast. como antiespasmódico e sementes de *P. mucronata* Lam. para efeitos vermífugos (MOREIRA; GONTIJO; ALMEIDA, 2012). Saravanan e colaboradores (2014) publicaram um estudo que investigou algumas dessas propriedades farmacológicas nas folhas de *P. subpeltata* com ensaios *in vitro* e *in vivo*, em que os resultados obtidos, concluiu-se que essa espécie tem grande potencial nas indústrias farmacêuticas como agente antioxidante, analgésico, anti-inflamatório e antipirético. A rotina contemporânea caracterizada pela correria e gatilhos de estresse, ampliou o uso de substâncias ansiolíticas como as da classe dos benzodiazepínicos, sendo um dos grupos de drogas sintéticas mais prescritos no mundo com a finalidade de terapêutica para estresse e ansiedade. Porém, dependência, síndrome de abstinência e diminuição dos reflexos motores são riscos associados à sua utilização, o que fez com que a prescrição e aceitação de medicamentos fitoterápicos e nutracêuticos esteja crescendo entre prescritores e pacientes, incluindo espécies do gênero *Passiflora* (FONSECA et al., 2020).

Com relação a atividade ansiolítica da *Passiflora*, grande parte dos estudos publicados sugerem que as substâncias relacionadas a essa propriedade farmacológica, são substâncias fenólicas, destacando os flavonoides. Pesquisas indicam que o mecanismo de ação que provavelmente esteja mais relacionado a essa ação, seja a modulação do sistema do ácido- γ -aminobutírico (GABA), já que os flavonoides atuam como agonistas parciais dos receptores de GABA_A, inibindo a captação de [3H]-GABA nos sinaptossomos corticais de ratos (APPEL et

al., 2011). Além dos flavonoides, o grupo de metabólitos secundários destaque desse gênero, e que se encontra como o segundo maior em quantidade da *P. incarnata*, são os alcaloides, que possuem atividade farmacológica no sistema nervoso central. São alcaloides harmônicos, quimicamente classificados como indólicos, sendo as principais ações farmacológicas desses metabólitos a atividade tranquilizante e também empregados no tratamento da hipertensão (SANTOS; GALINDO; QUEIROZ, 2020).

Apesar da sua principal indicação terapêutica ser para o tratamento de ansiedade, estudos ampliam seu uso como matéria-prima para desenvolvimento de alimentos, cosméticos e produtos da indústria farmacêutica no geral. A partir de estudos indicando potencial atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos etanólicos das folhas de *P. edulis* e seu uso tópico aumentar a proliferação de fibroblastos e melhorar a reepitelização em ratos Wistar, com aumento significativo da produção de colágeno e fibroblastos. Soares e colaboradores (2020) desenvolveram um hidrogel de quitosana incorporado a uma mistura de flavonoides provenientes das folhas de *P. edulis* Sims, com o objetivo de avaliar a liberação e deposição de flavonoides em uma ferida, observando a influência desses metabólitos secundários na velocidade de cicatrização da ferida em ratos diabéticos. Com o estudo comparativo da formulação sem e com flavonoides, o tratamento dos ratos com ambas formulações estimulou a produção da enzima superóxido dismutase na fase inicial da cicatrização, e a fração com adição de flavonoides, potencializou o efeito da quitosana nos primeiros dias do processo cicatricial.

Como descrito nesse estudo, diversos são os usos terapêuticos empregados para as espécies de *Passiflora* que estão presentes na literatura, sendo a principal atividade farmacológica, a atividade sedativa proveniente da infusão das folhas (PEREIRA, 2014). Essa ação farmacológica é o fator que protagonizou o uso dessa planta na medicina popular, caracterizado pelo consumo de chás de *Passiflora edulis* como calmante. Dentre os compostos bioativos presentes nessa planta, destaca-se a passiflorina que se assemelha a morfina, serotonina e maracugina que promovem o efeito calmante, sem causar dependência. Além dos alcaloides que podem causar diminuição da pressão arterial. A partir do conhecimento dessas substâncias nessa planta atrelado com o seu uso popular na sociedade, a *Passiflora* é uma das plantas medicinais que possui uma busca constante da caracterização dos seus efeitos terapêuticos em relação a sua composição química, com o objetivo de obtenção de fitoterápicos como uma prática integrativa e complementar de cuidado da saúde (BORTOLUZZI; SCHMITT; MAZUR, 2020).

Segundo o estudo de Fonseca e colaboradores (2020), dos 86 produtos fitoterápicos de *Passiflora* que estão registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a *Passiflora incarnata* encontra-se na composição de 63% desses registros. Destaca-se que 57% desses produtos são associações de *Passiflora* com outras espécies vegetais, e os 43% restantes denominados fitoterápicos simples, sendo 30 medicamentos com a *P. incarnata* (FONSECA et al., 2020).

Outro estudo, realizado por Rech e colaboradores (2017), demonstra a importância dos produtos à base de *Passiflora* no mercado nacional, uma vez que estes encontram-se dentre os 10 fitoterápicos mais vendidos no Brasil em 2014. A **Tabela 1** apresenta os dados deste estudo, onde é possível verificar que dentre os Top 10, quatro fitoterápicos apresentam na composição uma espécie de *Passiflora*, sendo três com *P. incarnata* e uma com *P. alata*, sendo eles Seakalm®, Calman®, Pasalix® e Maracugina®.

Estudos de farmacodinâmica e farmacocinética são os responsáveis pela chegada de medicamentos eficazes e seguros no mercado. A alta potência, afinidade e seletividade contra determinado alvo molecular, em conjunto com absorção, distribuição, metabolismo, excreção e baixa toxicidade (ADMET) são variáveis interdependentes que sua otimização coordenada é um obstáculo significativo no setor de Produção e Desenvolvimento nas indústrias de medicamentos, mas que predita a aprovação e regularização de um produto com efeitos farmacológicos para que seja possibilitada sua prescrição (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019). Observa-se a importância do conhecimento das propriedades ADMET de um fármaco no organismo para a caracterização de uma formulação quanto a sua propriedade terapêutica para determinada doença e segurança para o paciente que será administrada. Medicamentos compostos por substâncias de origem sintética, o conhecimento dessas propriedades é comum, porém produtos provenientes de espécies vegetais, as informações conhecidas sobre essas propriedades são muito poucas, já que a diversidade de substâncias químicas presentes nesses produtos naturais é gigantesca (FONSECA et al., 2020).

Tabela 1 – Top 10 fitoterápicos mais vendidos em 2014 no Brasil.

Ranking/Fitoterápico/Laboratório	Indicação	Espécie da planta (DCB)
1 – Seakalm (Natulab)	Ansiolítico	<i>Passiflora incarnata</i>
2 – Abrilar (FQM)	Expectorante	<i>Hedera helix L.</i>
3 – Tamarine (Farmasa)	Laxante	<i>Senna alexandrina Mill.</i> <i>Cassia fistula</i> <i>Coriandrum sativum</i>
4 – Gerovital (EMS)	Multivitamínico	<i>Panax ginseng C. A. Mey.</i>
5 – Calman (Ativus)	Ansiolítico	<i>Passiflora incarnata</i> <i>Salix alba</i> <i>Crataegus oxyacantha</i>
6 – Eparema (Takeda)	Colagogo	<i>Peumus boldus Molina</i> <i>Frangula purshiana (DC.) A. Gray</i> <i>Rheum palmatum L.</i>
7 – Pasalix (Markan Pharma)	Ansiolítico	<i>Passiflora incarnata</i> <i>Salix alba</i> <i>Crataegus oxyacantha</i>
8 – Natus Gerin (Legrand)	Multivitamínico	<i>Panax ginseng C. A. Mey</i>
9 – Maracugina (Hypermarcas)	Ansiolítico	<i>Passiflora alata</i> <i>Erythrina mulungu</i> <i>Crataegus oxyacantha</i>
10 – Ginkomed (Cimed)	Vasodilatador cerebral	<i>Ginkgo biloba L.</i>

Fonte: Adaptado de (RECH et al., 2017)

1.3. Fitoterápicos e Controle de Qualidade

Define-se fitoterapia como a utilização de plantas medicinais em diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, independente de possuir origem vegetal, como terapêutica para tratamento de doenças (BRASIL, 2006a). Desde os primórdios da medicina, o uso de plantas medicinais para a cura de enfermidades, fundamentando-se de

geração em geração, concretiza uma base da terapêutica de produtos de origem vegetal. A posição de valorização e utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário vem sendo expressada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978. Isso se deve porquê 80% da população mundial utiliza plantas ou preparações vegetais na atenção primária à saúde, bem como por causa da participação dos países em desenvolvimento que são detentores de 67% das espécies vegetais no mundo. O Brasil é um país com importante papel nesse contexto, pois possui a maior diversidade vegetal no planeta (BRASIL, 2006a).

A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, cabendo a regulação do registro, notificação, pós-registro e controle da qualidade de medicamentos fitoterápicos. Define-se produto tradicional fitoterápico como aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, em que a literatura técnico-científica apresenta dados para utilização segura e efetiva sem vigilância de um médico. Para a obtenção de medicamentos fitoterápicos, há o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais respaldadas por evidências clínicas e caracterizadas pela constância de sua qualidade, garantindo a sua segurança e eficácia. Fitoterápicos podem ser simples: ativo tem origem de uma única espécie vegetal ou composto: o ativo possui origem de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014).

Como apresentado anteriormente, umas das principais e mais disseminadas formas de uso da *Passiflora* é pelos chás, que podem ser comercializados através da droga vegetal (inteira, fragmentada/rasurada, ou triturada até pó. De acordo com a legislação brasileira, esses chás de plantas podem estar regularizados como alimentos ou fitoterápicos, sendo apenas esses últimos apresentarem alegações para uso medicinal. Podem ser encontrados no comércio de todo o país nas formas de planta medicinal, chá alimentício, chá alimentício pronto para consumo e chá medicinal (ANVISA, 2022). Além disso, as plantas podem ainda gerar produtos derivados, como extratos, óleos e ceras, os quais podem ser comercializados brutos ou incorporados em cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, entre outros. Todos estes produtos são regidos pelas RDCs para sua regularização a partir de plantas medicinais. A presença de um grande número de compostos na composição de produtos de origem vegetal, impossibilita a garantia de qualidade de todas as substâncias, sendo a maioria desconhecida ou diferentes métodos analíticos não conseguem detectar. Elege-se então marcadores fitoquímicos, Substâncias Químicas de Referência (SQRs), para o controle de qualidade desde a matéria-prima até o

fitoterápico. Para a espécie *P. incarnata* os seus marcadores fitoquímicos são os flavonoides totais que se expressam na forma de vitexina (OLIVEIRA, 2019).

Uma parcela considerável da indústria farmacêutica tem investigado novos agentes medicinais, através dos investimentos de pesquisa e desenvolvimento na área de produtos fitoterápicos. Além do interesse atrelado em conhecer melhor as características intrínsecas nos medicamentos provenientes de plantas medicinais, com relação a sua composição química e ação farmacológica, destaca-se também a maior facilidade no processo de desenvolvimento, relacionando com produtos isolados/sintetizados. Historicamente, o uso popular com o senso comum de que por ser natural não faz mal, resultou em um baixo volume de estudos pré-clínicos e clínicos para comprovação da segurança de produtos naturais, ressaltando a relevância da preocupação das autoridades sanitárias em regulamentar os medicamentos fitoterápicos, desde o processo de coleta da planta até o produto acabado (CECHINEL-ZANCHETT, 2016).

Assim como em produtos sintéticos, os produtos de origem natural precisam ter seu controle de qualidade definidos por testes analíticos, os quais encontram-se descritos nos códigos oficiais farmacêuticos dos países. No Brasil, a Farmacopeia Brasileira (FB), atualmente em sua 6ª edição, em seu Volume II, destinado as monografias, possui um capítulo específico para plantas medicinais.

Conforme já mencionado, produtos fitoterápicos de *Passiflora* ganham destaque no mercado nacional do Brasil. Assim, destaca-se a presença de duas monografias na 6ª edição da FB referentes ao gênero, sendo elas *Passiflorae acetum folium* e *Passiflorae dulcis folium*, para avaliação da qualidade das folhas do maracujá-azedo e do maracujá-doce, respectivamente. A droga vegetal das duas monografias descritas consiste nas folhas secas das espécies de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Curtis, com um teor mínimo de 1,0% de flavonoides totais, expressos em apigenina, destacando essas duas espécies para comercialização e produção de medicamentos fitoterápicos provenientes do maracujá (ANVISA, 2019).

No Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, encontra-se a monografia de apenas uma espécie do maracujazeiro, sendo a *Passiflora incarnata* L., com descrição de orientação para o preparo de preparação extemporânea, tintura, extrato fluido e cápsula com derivado. Indicada para auxiliar no alívio da ansiedade e insônia leves, sendo as quatro fórmulas descritas para uso oral. As preparações extemporâneas e cápsula com derivado podem ser utilizadas por adultos e crianças acima de 12 anos, já a tintura e o extrato fluido, recomenda-se apenas o uso adulto (BRASIL, 2021). Importante salientar que dentro do gênero *Passiflora*

spp., as três espécies descritas na FB, estão dentre as espécies vegetais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009).

Além disso, a espécie *P. incarnata* L. está presente na “lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”, da Instrução Normativa-IN nº 2, de 13 de maio de 2014 com retificação na Instrução Normativa-IN nº 10, de 26 de novembro de 2014. Sendo assim, produtos desta espécie podem ter registro simplificado na ANVISA, uma vez que evidências de segurança e eficácia são bastante elucidadas na literatura científica e popular. Para isso, os produtos devem ser disponibilizados para via oral e preparados com extratos obtidos das partes aéreas da planta, contemplando a concentração 30 a 120 mg de flavonoides totais expressos em vitexina e indicações para sintomas ansiolíticos leves.

Independentemente do formato de registro do produto na ANVISA (completo ou simplificado), é fundamental o envio de dossiê da qualidade dos produtos. Nesta documentação, a droga vegetal, bem como derivado ou produto final, devem ser analisados quanto ao perfil cromatográfico que possa garantir a identidade da droga vegetal e análise quantitativa do(s) marcador(es). Esses requisitos estão descritos na RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 (artigo 13 - itens IX e X; artigo 15 - itens VI e VII; artigo 16 – itens I e II).

1.4. Métodos cromatográficos

A RDC Nº 27 de 17 de maio de 2012 define como métodos cromatográficos, aquelas metodologias analíticas que empregam a cromatografia para separação do analito de outros componentes presentes em determinada amostra e quantificá-lo (BRASIL, 2012). No Brasil e em diversos países, os órgãos reguladores, como a ANVISA, exigem a garantia e o controle de qualidade para registro de novos produtos no mercado, sendo os métodos cromatográficos um exemplo dos diversos métodos analíticos existentes, que comprovam a qualidade, segurança e eficácia de determinado produto por técnicas qualitativas e/ou quantitativas (RIBANI, 2004).

No controle de qualidade moderno de matérias-primas e produtos derivados de insumos farmacêuticos ativos de origem natural (IFAN), a identificação e quantificação de marcadores químicos são as estratégias mais importantes. É cada vez mais frequente a quantificação de marcadores por métodos analíticos cromatográficos, devido a eficiência na separação de misturas químicas complexas e sensibilidade para a detecção de compostos em baixas concentrações (SIMÕES, 2017). Essa separação consiste em um processo físico em que os constituintes químicos se distribuem em duas fases: a móvel e a estacionária, podendo a fase

estacionária ser líquida ou sólida e a fase móvel, pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico, essa passa sobre a fase estacionária, arrastando os componentes presentes na mistura (PERES, 2002).

Os métodos cromatográficos são divididos em quatro tipos principais: cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida (CL), sendo o método escolhido de acordo com os aspectos do material que deseja ser identificado, isolado e/ou quantificado. A CP apresenta uma técnica simples de partição líquido-líquido, para análise de amostras em pequenas quantidades, característica para separação e identificação de compostos polares (aminoácidos, açúcares, antibióticos hidrossolúveis, pigmentos e íons metálicos) (RIBEIRO, 2008). Sendo a técnica cromatográfica mais usada para avaliação da autenticidade do IFAN e seus produtos derivados, a CCD é executada rapidamente, de simples operação, possibilitando a análise de caráter qualitativo dos componentes majoritários presentes na amostra (SIMÕES, 2017). A CG é uma técnica indicada para separação de gases ou substâncias orgânicas voláteis, tendo um gás de arraste que possui a função de eluir da coluna os compostos da mistura até o detector, sendo uma análise rápida, porém necessita de um preparo inicial da amostra antes da análise, evitando interferências e contaminação da coluna cromatográfica (NASCIMENTO, 2018). Uma técnica que seu uso é recente, a eletroforese capilar (EC) é caracterizada pela separação de substâncias em colunas capilares, que combina o diâmetro interno reduzido da coluna com altas voltagens, resultando no aumento da eficiência, resolução e diminuição dos tempos de análise, podendo ser empregada na análise de fármacos quirais, aminoácidos, vitaminas, íons orgânicos, dentre outros compostos (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A CL é um método utilizado na separação de espécies iônicas ou macromoléculas e compostos termolábeis, também denominada apenas como cromatografia líquida, pois sua fase móvel é um solvente. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou ainda do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) consiste em uma técnica de separação dos componentes de uma mistura em duas fases imiscíveis: a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (sólida). A escolha da fase estacionária influencia a separação das substâncias de, preferencialmente, amostras não voláteis e termolábeis, podendo ser resultante de uma partição, adsorção, troca iônica e exclusão (tamanho ou interações estereoquímicas). O sucesso da separação cromatográfica por é definido pela natureza dos compostos químicos que se deseja separar, composição e vazão da fase móvel, e da composição e área superficial da fase estacionária (BRASIL, 2019).

O tempo de retenção da substância na coluna é definido pela afinidade com a fase estacionária, influenciada pela polaridade da fase móvel. Sendo assim, podem ser realizadas dois tipos de corridas, a em fase normal, que o sistema é composto por fases estacionárias polares e fases móveis apolares, e em fase reversa, que é exatamente o oposto, constituída de fases estacionárias apolares e móveis polares (BRASIL, 2019). Com o passar dos anos, há o aperfeiçoamento da técnica e dos equipamentos de CLAE, uma variação dessa técnica avançada, é o Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), que surgiu a partir da prática com colunas e partículas de diâmetro menor que o usual. A inovação frente a técnica de CLAE se dá pela possibilidade desse método alcançar pressões muito elevadas pelas partículas utilizadas terem tamanho reduzido, até 1200 bar. Isso permite um nível maior de desempenho cromatográfico, possibilitando separações com tempo de análise mais reduzido, novos níveis de resolução, velocidade e sensibilidade, aumentando a produtividade frente a essa metodologia analítica (PAULINO, 2020).

Para que essas análises sejam realizadas, é necessário um equipamento (**Figura 3**) que apresenta um reservatório para a fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo que capture os dados, por exemplo, um *software* (BRASIL, 2019). O reservatório é caracterizado por um recipiente de vidro, geralmente, ou plástico, onde fica armazenada os solventes que compõem a fase móvel durante a utilização do equipamento. O fornecimento da fase móvel pela fase estacionária para chegar na coluna, é realizado pela bomba, que tem como objetivo fornecer com exatidão, precisão, fluxo reprodutível, constante e sob alta pressão. Introduce-se a amostra no sistema pelo dispositivo denominado injetor. Já a coluna, representa o local onde a separação acontece, exigindo bastante cuidado e atenção na sua escolha para que garanta o sucesso do método analítico. A última etapa do processo é a saída dos compostos da coluna e terem suas propriedades físicas e químicas traduzidas e monitoradas pelo detector (PAULINO, 2020).

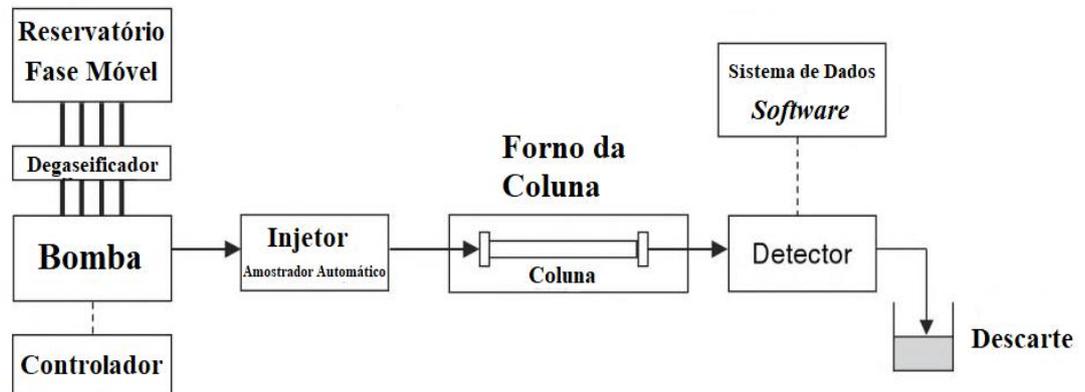


Figura 3: Representação esquemática da aparelhagem de um cromatógrafo líquido.

Fonte: Adaptado de DONG, 2006.

Diversos tipos de detectores podem ser empregados, dependendo do objetivo de análise das substâncias que foram obtidas com a corrida, os mais usuais são os espectrofotométricos (UV/Vis), através da absorção de luz visível ou ultravioleta à medida que os compostos saem da coluna, apresentando três configurações comuns, os fotodetectores de comprimento de onda fixo, de comprimento de onda variável e os de arranjo linear de fotodiodos (DAD). Além desses, há os detectores de índice de refração que mensuram a diferença entre o índice de refração da fase móvel pura e da fase móvel contendo a substância a ser analisada, limitada a baixa sensibilidade, sensível às variações de temperatura, pressão e fluxo, podendo ser utilizados apenas para análise de natureza isocrática. Substâncias que apresentam fluorescência – grupamento fluoróforo ou que podem gerar derivados fluorescentes, podem ser analisadas a partir de detectores muito específicos, altamente sensíveis e seletivos, os fluorimétricos. Os detectores eletroquímicos medem a corrente de oxidação ou redução dos compostos, enquanto que os condutimétricos analisam a capacidade de condução de uma corrente elétrica. Finalmente, a análise por CLAE acoplada a detecção por espectrometria de massas (EM) é tão usual quanto com UV, medindo a razão m/z (razão massa/carga) do íon precursor de um componente, podendo ser a partir da protonação (modo positivo), desprotonação (modo negativo) ou pela análise de formação de íons aduto de sódio, potássio, formiato, entre outros. Os detectores do tipo EM podem possuir um analisador de massas, como um quadrupolo simples, ou até dois analisadores de massas, como o triplo quadrupolo (QqQ). Além disso, duas categorias de fonte de ionização podem ser empregadas no acoplamento CLAE-MS, sendo a ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) (BRASIL, 2019; PAULINO, 2020).

Na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira, é descrito as condições analíticas de CLAE para as duas espécies, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* Curtis, que são as únicas que apresentam monografia na seção de Plantas Medicinais do Volume 2. As condições analíticas são as mesmas para realizar análises de ambas espécies, devendo utilizar um cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 340 nm, coluna com dimensões de 250 mm (comprimento) x 4,6 mm (diâmetro interno), empacotada com sílica ligada ao grupo octadecilsilano (5 µm). A fase móvel formada por ácido fosfórico a 0,05% (v/v) (A) e acetonitrila (B), em um fluxo de 1,0 mL/minuto. O tempo de corrida é de 30 minutos em uma eluição de gradiente linear de 0 – 15 min → 10 - 20% B seguida de uma eluição isocrática de 15 – 30 min → 20% B. O que difere de uma espécie para outra, são as Substâncias Químicas de Referência (SQRs), em que para *P. edulis* os marcadores químicos são isovitexina e isoorientina, enquanto que para *P. alata* preconiza uma SQR a mais, sendo vitexina-2''-O-ramnosídeo (ANVISA, 2019).

O método analítico por CLAE representa uma das diversas técnicas para determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos ou outros componentes químicos em produtos farmacêuticos, estando esse método dentre os procedimentos de um laboratório analítico que a ANVISA considera necessária a validação (BRASIL, 2017). Sendo assim, um potencial econômico a ser explorado, pois é evidente que os poucos medicamentos ou fitoterápicos provenientes de espécies ou produtos químicos da biodiversidade brasileira não possuem um estudo aprimorado para validação de plantas medicinais (FONSECA et al., 2020).

1.5 Validação de Métodos Analíticos

Através de estudos experimentais, a validação de procedimentos analíticos, confirma e garante a adequabilidade do método de acordo com a sua finalidade, sendo primordial para implementar um sistema de controle e garantia de qualidade em qualquer laboratório analítico. Por volta da década de 1990, a Conferência Internacional sobre a Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), descreveu os requisitos para a validação de métodos analíticos, com o objetivo de auxiliar as autoridades dos órgãos regulatórios internacionais, sendo referência em todo o mundo da importância da realização adequada da validação dos métodos analíticos (PORTO, 2014; SIMÕES, 2017). No Brasil, o documento de referência nacional e atualmente em vigor é a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017 sobre a validação de métodos analíticos.

Metodologias analíticas que estão descritas em farmacopeias, formulários oficiais que sejam reconhecidos pela ANVISA, é necessário realizar a adequabilidade do método farmacopeico, exigindo a sua validação mesmo quando o método está descrito no documento regulatório. No entanto, metodologias que não estão descritas em compêndios reconhecidos pelo órgão regulador nacional, o método é devidamente reconhecido como validado a partir de parâmetros que devem ser avaliados, de acordo com a classificação segundo a finalidade dos testes. Os parâmetros analíticos a serem considerados para a validação de determinado método varia de acordo com a finalidade do procedimento analítico a ser avaliado, sendo dividido em três grupos principais: identificação, testes de impureza e doseamento, sendo que os teste de impureza são subdivididos em dois tipos: quantitativo e ensaio-limite e os de doseamento em três subgrupos: dissolução, uniformização de conteúdo e potência, como disposto no Anexo I da RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Os parâmetros de validação e suas respectivas funções estão representados no **Quadro 1**.

Quadro 1: Parâmetros e suas respectivas funções para a validação de métodos analíticos.

Parâmetro	Função
Especificidade e Seletividade	Medida exata de um composto na presença de outros componentes (impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz)
Exatidão	Proximidade dos resultados obtidos no método avaliado relacionada ao valor de referência
Intervalo	Faixa entre os limites de quantificação superior e inferior, derivado do estudo de linearidade e depende da finalidade do método
Limite de Detecção	Menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, não necessariamente quantificado
Limite de Quantificação	Determinada com precisão e exatidão dentro de um intervalo aceitável, a menor quantidade do analito em uma amostra
Linearidade	Demonstração de que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra
Precisão	Proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas obtidas com a amostragem múltipla da mesma amostra
Robustez	Capacidade de resistência a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

1.6. Literaturas de Revisão Sobre *Passiflora* spp.

A realização de revisões de literatura é essencial no avanço do conhecimento e compreensão da amplitude da pesquisa sobre determinado tópico, síntese de evidências empíricas e desenvolvimento de teorias, a fim de se obter uma base rica em conceitos como referência para futuras pesquisas, selecionando os tópicos que requerem maior atenção e investigação (PARÉ, 2015). Essas revisões podem ser gatilhos para desencadear *insights* e *gaps* para avaliação de novos estudos, sendo necessárias pois a produção de publicações científicas só vem crescendo (PAUTASSO, 2013). São conhecidos diferentes metodologia para realizar uma revisão de literatura, sendo as mais conhecidas: narrativa, sistemática e integrativa.

Uma metodologia que vem se destacando, com crescimento significativo desde 2012, é a revisão de escopo, que apresenta como objetivos: examinar a extensão e natureza das produções, esclarecer conceitos de determinada área, identificação da viabilidade de uma revisão sistemática, sendo uma metodologia precedente a revisão sistemática, sistematização e disseminação de informações que podem contribuir em políticas e pesquisas, identificando lacunas na literatura disponível e a compreensão de como é realizada a condução da pesquisa em determinada área (CORDEIRO; SOARES, 2019). Diferem de revisões sistemáticas e narrativas, pois mapeiam rapidamente os conceitos que são bases fundamentais de uma área específica de pesquisa e seu procedimento é mais organizado através de protocolos, sistemático (POVOLERI, 2022).

Ressalta-se a relevância de revisão de literaturas em diversas áreas e linhas de pesquisas, havendo na literatura diversos estudos que possuem como foco avaliar o gênero e espécies de *Passiflora*. Porém, considerando uma abordagem de revisão mais focada nas técnicas e métodos analíticos para determinação de flavonoides, poucos estudos são encontrados, como podem ser evidenciados na **Tabela 2**. Dentre os 4 estudos explicitados na **Tabela 2**, a revisão de Silva e colaboradores (2015) possui destaque no quesito de levantamento de dados sobre formas de avaliação de compostos químicos de espécies de *Passiflora*, porém sua abordagem é efetuada de maneira narrativa, não abordando a sistemática empregada para seleção dos trabalhos citados no estudo. Além desse, destaca-se a pesquisa de Gadioli e colaboradores (2018) a qual realizou um levantamento sistemático com publicações de 1961 a 2016, representando seus resultados de modo qualitativo apenas. Além dos pontos positivos e negativos expostos na tabela abaixo, destaca-se que a abordagem da revisão que não é totalmente focada e aprofundada para flavonoides.

Tabela 2 - Exemplos de artigos de revisão que abordam metodologias analíticas para compostos presentes em espécies de *Passiflora*.

Título	Tipo de trabalho e Metodologia de Revisão	Pontos Positivos e Negativos	Referência
Metodologias Analíticas Utilizadas na Identificação e Quantificação de Compostos Presentes na <i>Passiflora incarnata</i> L.: Revisão de Literatura	Trabalho de Conclusão de Curso – Revisão sistemática	<p>Positivos: detalha resultados esperados no emprego de metodologias analíticas para <i>P. incarnata</i>, além de trazer uma comparação das técnicas analíticas revisadas com vantagens e desvantagens de uma frente a outra.</p> <p>Negativos: restrição do levantamento de dados com apenas uma espécie de <i>Passiflora</i> dentro de um intervalo de tempo de 15 anos.</p>	JÚNIOR; MELO, 2020
Analyses Of <i>Passiflora</i> Compounds By Chromatographic And Electrophoretic Techniques	Artigo científico – Revisão narrativa	<p>Positivos: abrange a revisão de diferentes técnicas de separação para análise de folhas, frutos e diversas partes de diferentes espécies de <i>Passiflora</i>, com a estruturação do trabalho seccionado, traz uma informação dos marcadores químicos que podem ser encontrados de acordo com a parte da planta e a espécie.</p> <p>Negativos: por ser uma revisão de caráter descritivo, não há um resultado quantitativo que permite observar quais são as partes e espécies que estão sendo mais estudadas, que desencadeiam um planejamento primordial nortear um planejamento experimental com novos focos do estudo de métodos analíticos com <i>Passiflora</i>.</p>	SILVA; BOTTOLI, 2015

<p><i>Passiflora alata</i> Curtis: A Brazilian Medicinal Plant</p>	<p>Artigo científico – Revisão narrativa</p>	<p>Positivos: caracteriza-se como um artigo completo com diferentes áreas de informações sobre a espécie <i>P. alata</i>, desde suas características farmacobotânicas, composição fitoquímica, métodos analíticos para análise dessa espécie, informações farmacológicas e toxicológicas, além de aspectos relacionados a tecnologia fitofarmacêutica e de produção agrícola desse vegetal.</p> <p>Negativos: a revisão foi realizada com foco em apenas uma espécie do gênero, especificando na introdução o foco nas folhas dessa espécie, o que restringe bastante as informações frente a um gênero tão diverso.</p>	<p>NORIEGA et al., 2011</p>
<p>A Systematic Review On Phenolic Compounds In <i>Passiflora</i> Plants: Exploring Biodiversity For Food, Nutrition, And Popular Medicine</p>	<p>Artigo científico – Revisão sistemática</p>	<p>Positivos: essa revisão abrange tanto os métodos de extração e analíticos para identificação e quantificação de compostos fenólicos em espécies de <i>Passiflora</i> com tabulação das informações de todos os artigos que foram aprovados com base nos critérios propostos. Os questionamentos como critérios qualitativos que facilitam a seleção dos documentos resultando se o artigo tem potencial ou não para a revisão.</p> <p>Negativos: Apesar de terem extraído os dados das diferentes partes das plantas, os métodos de extração, de identificação e os compostos fenólicos identificados, no título é destacado uma abordagem de exploração da biodiversidade para alimentação, nutrição e medicina popular, porém não são abordadas os diferentes tipos de amostras estudadas, por exemplo formulações, suplementos alimentares, dentre outros.</p>	<p>GADIOLI et al., 2018</p>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

2. JUSTIFICATIVA

Espécies do gênero *Passiflora* são potenciais matérias-primas vegetais para o desenvolvimento de produtos naturais, dada a sua rica composição química em flavonoides, saponinas, ácidos fenólicos e glicosídeos cianogênicos. Seu potencial calmante e ansiolítico relacionado às folhas e partes aéreas, faz com que seja popularmente utilizado, principalmente, o consumo em chás, já que estudos relacionam essa propriedade com os flavonoides, em sua maioria do tipo di-C-heterosídeos de flavonas. Como mencionado anteriormente, o controle de qualidade dos produtos de origem vegetal é fundamental para garantir que os mesmos possam ser utilizados com segurança como matéria-prima na produção de fitoterápicos.

Considerando a abordagem de determinação de flavonoides em *Passiflora*, encontrou-se lacunas a serem respondidas para guiar novos estudos que almejam investigar o estado da arte de métodos cromatográficos e validações analíticas. Embora alguns pesquisadores já tenham feito trabalhos de revisão abordando o compilado de métodos analíticos para avaliar algumas espécies de *Passiflora*, justifica-se a execução de uma revisão de escopo de natureza sistemática e quantitativa para mapeamento de dados relacionados a métodos analíticos para identificação, quantificação, e determinação-de marcadores químicos da classe de flavonoides em diversas espécies de *Passiflora*. Trabalhos com esta finalidade tendem a auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos e de produtos naturais, para que facilite a acurácia na busca dos compostos responsáveis por cada propriedade farmacológica que esse gênero possui, diminuindo erros e otimizando estratégias de futuros trabalhos analíticos.

Este trabalho também apresenta a justificativa de complementar o estudo recentemente realizado pela pesquisadora Enza Demaria (POVOLERI, 2022), o qual realizou a revisão de literatura acerca de métodos extrativos utilizados para a obtenção de flavonoides de *Passiflora* spp. visando o tratamento de afecções cutâneas e cuidados da pele.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Efetuar um estudo de revisão de técnicas analíticas para a avaliação de flavonoides em produtos de *Passiflora* spp., principalmente focando nas de cromatografia líquida e validadas.

3.2. Objetivos específicos

- Efetuar uma revisão de escopo, através de uma busca e análise de artigos primários que descrevam sobre os métodos de análise de flavonoides de *Passiflora* spp. e quais os principais marcadores químicos empregados;
 - Empregar técnica de seleção de dados específica, reprodutível e confiável;
 - Empregar *software* de gerenciador de referências e aplicar critérios de inclusão e exclusão para selecionar os artigos pertinentes ao estudo de revisão;
 - Extrair dados relevantes dos documentos encontrados e realizar análises de mapeamento e bibliometria dos dados (avaliação quali e quantitativa de dados);
 - Descrever os principais marcadores químicos e métodos empregados nas análises de flavonoides de *Passiflora* spp.
 - Verificar quais trabalhos efetuaram a validação dos métodos cromatográficos para determinação quantitativa de marcadores químicos de *Passiflora* spp.

4. METODOLOGIA

A primeira fase do trabalho consistiu na escolha do tipo de estudo de revisão, sendo escolhido o tipo de escopo/mapeamento. Logo em seguida, foi elaborada a questão a ser respondida no trabalho, sendo ela: Quais são as técnicas analíticas de determinação de flavonoides, métodos validados e quais são os marcadores químicos avaliados com em produtos contendo espécies do gênero *Passiflora*?

A abordagem da busca e seleção dos estudos para compor a revisão seguiu o método de três etapas recomendado pelo protocolo padrão das revisões sistemáticas JBI (Joanna Briggs Institute) (AROMATARIS e RIITANO, 2014).

Na primeira etapa foi feita uma busca inicial ampla sobre artigos que envolviam *Passiflora* spp e flavonoides. Dessa forma, foram feitas simulações de palavras chaves em diversas bases de dados, utilizando-se operadores booleanos, filtros, misturas de palavras chaves em diferentes idiomas, até se definir a melhor estratégia de busca para o presente estudo. Pela análise dos resultados dessas simulações, foram definidas as seguintes bases de dados para o estudo: *Pubmed*, *Scielo*, *Scopus* e *Web of Science*.

Na segunda etapa foi realizada a pesquisa oficial, a qual limitou-se a somente a buscar artigos publicados nos anos de 1980 a 2021. As palavras chaves e operadores booleanos selecionados para busca no título e resumo dos trabalhos, foram: (*Passiflora* OR "passion fruit" OR maracuja*) AND (flavonoid*). A busca efetiva dos artigos e exportação para um gerenciador de referências foi realizada no dia 5 de fevereiro de 2022. O gerenciador de referências empregado foi o software Mendeley® (versão Desktop 1.19.8).

Na terceira etapa, foram empregados critérios de inclusão e exclusão para seleção dos trabalhos pertinentes ao assunto de interesse (**Tabela 3**). O critério 1 de inclusão foi conferido nas próprias bases onde somente artigos revisados por pares foram selecionados nas buscas. Os resultados foram exportados para o gerenciador de referências. Neste momento foi empregado o critério 1 de exclusão, retirando-se os artigos que se encontravam duplicados. Após, foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos trabalhos e empregou-se o critério 2 de inclusão: artigos primários que descrevessem sobre avaliação do perfil químico, determinação quali e quantitativa de marcadores químicos, técnicas analíticas e/ou identificação de substâncias isoladas de *Passiflora* spp. Além disso, foram removidos todos os artigos que não foi possível o acesso ao resumo, conforme o critério 2 de exclusão. Na sequência ainda foi aplicado o critério 3 de exclusão, onde foram excluídos os artigos que não foi possível acesso ao

documento inteiro na base de dados, não sendo possível a obtenção do documento (arquivo pdf) com a chave de acesso da universidade. Por fim, apenas os artigos incluídos/selecionados foram lidos na íntegra. Durante a execução do trabalho, dois revisores distintos examinaram todas as etapas da revisão, desde a análise dos títulos e resumos, bem como a versão completa para avaliar se estavam de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Discrepâncias foram sanadas através de reuniões para discussão.

Tabela 3 – Critérios de inclusão e exclusão empregados no presente estudo.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Critério 1: artigos revisados por pares	Critério 1: artigos duplicados
Critério 2: Artigos primários que descrevessem sobre avaliação do perfil químico, determinação quali e quantitativa de marcadores químicos, técnicas analíticas e/ou identificação de substâncias isoladas de <i>Passiflora</i> spp.	Critério 2: artigos sem acesso ao resumo na base de dados
	Critério 3: Artigos sem ser em língua portuguesa, espanhol ou inglês
	Critério 4: artigos de revisão
	Critério 5: artigos sem acesso ao documento inteiro na base de dados

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Após leitura dos artigos, informações relevantes para efetuar o mapeamento de informações foram extraídas para alimentar a discussão dos dados. Nesta etapa, os seguintes dados foram julgados relevantes: autor principal e ano de publicação, espécie, amostra, método analítico, objetivo do método, flavonoides relatados, método de detecção, compostos identificados e condições cromatográficas, realização de etapa de validação cujos resultados foram representados através de esquemas, gráficos e tabelas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca efetuada no presente estudo identificou um total de 762 artigos nas bases de dados escolhidas, sendo: 154 na *Pubmed*, 45 na *Scielo*, 336 na *Scopus* e 227 na *Web of Science*. Foram criadas 4 pastas individuais no Mendeley® para a exportação de artigos de cada base de dados. Em seguida, esses artigos foram transferidos conjuntamente para uma nova pasta intitulada “todas as bases”. No momento da transferência, o Mendeley® realizou uma retirada de artigos que ele reconheceu automaticamente como duplicados. Adicionalmente, foi aplicado também uma checagem de duplicados de forma manual e novamente pela ferramenta do software, resultando em 410 documentos. Na sequência, foi realizada a leitura dos títulos e resumos desses artigos. Destes, 295 artigos foram excluídos por não se enquadrarem no critério 2 de inclusão, ou ainda por estarem contemplando algum dos critérios 2, 3 e 4 de exclusão da presente revisão (**Tabela 3**). Assim, após a primeira triagem foi selecionado um total de 115 artigos para realizar e leitura do documento na íntegra. Nesta etapa, 23 foram ainda excluídos por não ter sido possível o acesso ao conteúdo de forma integral, respeitando o critério 5 de exclusão. Por fim, 92 artigos foram selecionados e lidos por completo para compor a discussão de resultados da presente revisão. Os resultados quantitativos da busca efetiva, inclusão e exclusão de dados encontram-se dispostos na **Figura 4**.

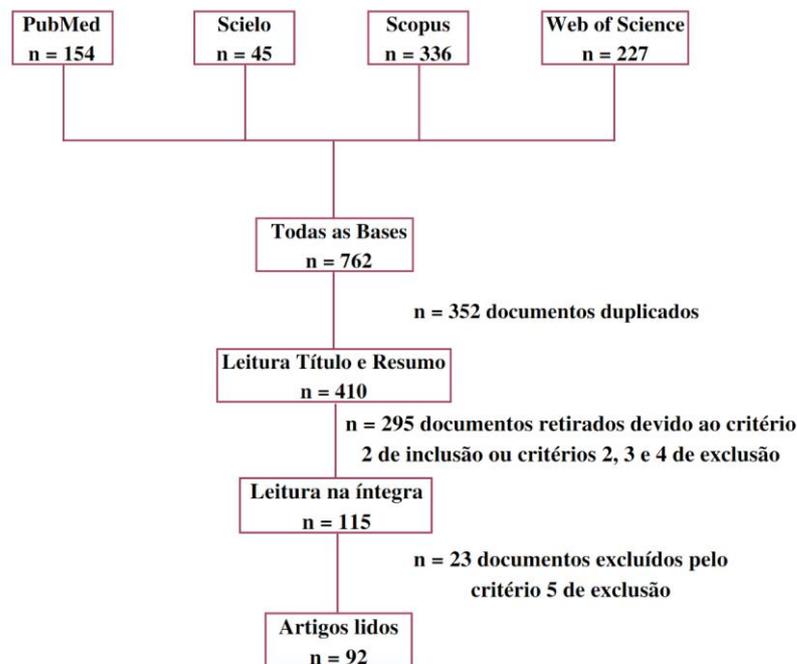


Figura 4: Representação esquemática da busca e seleção de dados do presente estudo. A busca efetiva foi limitada a artigos publicados entre os anos 1980 e 2020, empregando as palavras-chaves (*Passiflora* OR "passion fruit" OR maracuja*) AND (flavonoid*), aplicando diferentes critérios de inclusão e exclusão.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A leitura completa foi realizada em 92 documentos, conforme indicado na **Figura 4**, porém apenas 91 artigos foram submetidos a extração de dados em uma planilha para análise quantitativa. Isso ocorreu pois, no processo de alimentação da planilha do Excel com as informações presentes nos artigos lidos, foi constatado que o estudo realizado por Tremmel e colaboradores (2021) teve como objetivo identificar possíveis metabólitos de fase I e fase II de flavonoides C-glicosídeos usualmente presentes em *Passiflora*, porém não informou se essas substâncias advieram de processo extrativo de alguma espécie de *Passiflora*, sendo utilizadas substâncias químicas de referência (SQRs) adquiridas comercialmente.

Dos 91 artigos selecionados que contemplam a determinação de flavonoides extraídos de *Passiflora*, determinou-se na presente revisão a divisão e classificação de assuntos em diversos grupos e subgrupos de resultados, incluindo-se: partes da planta, tipo de amostra, espécies estudadas, marcadores químicos, técnicas analíticas e a finalidade das técnicas empregadas nos estudos.

O primeiro mapeamento foi a classificação das partes da planta estudada. Os resultados encontram-se na **Figura 5**. É possível observar que as partes das plantas mais investigadas nos trabalhos foram as folhas, que estavam descritas em 43 artigos, seguido de frutos, descritos em 26 artigos. Alguns trabalhos citam amostras advindas de partes aéreas (n=5), englobado nessa categoria aquelas cuja realização da extração do material contempla mais de uma parte da planta ao mesmo tempo. Ainda, é possível observar que estudos foram realizados com amostras advindas de caules (n=2 estudos), sementes (n=2), cascas de caules (n=1), flores (n=1) e cascas do fruto (n=1). Alguns autores, no mesmo trabalho, comparam resultados de amostras advindas de diferentes partes da planta. Destaca-se que quando não era totalmente especificado no artigo qual a parte da planta que originou o extrato, estes foram enquadrados como “Não informado” (NI). Um exemplo desta situação ocorreu no trabalho de Guseinov e colaboradores (2019), pois apesar de relatar que trabalhou com extrato seco de *P. incarnata*, não deixou totalmente elucidado qual a parte da planta que usou para obtenção deste extrato.

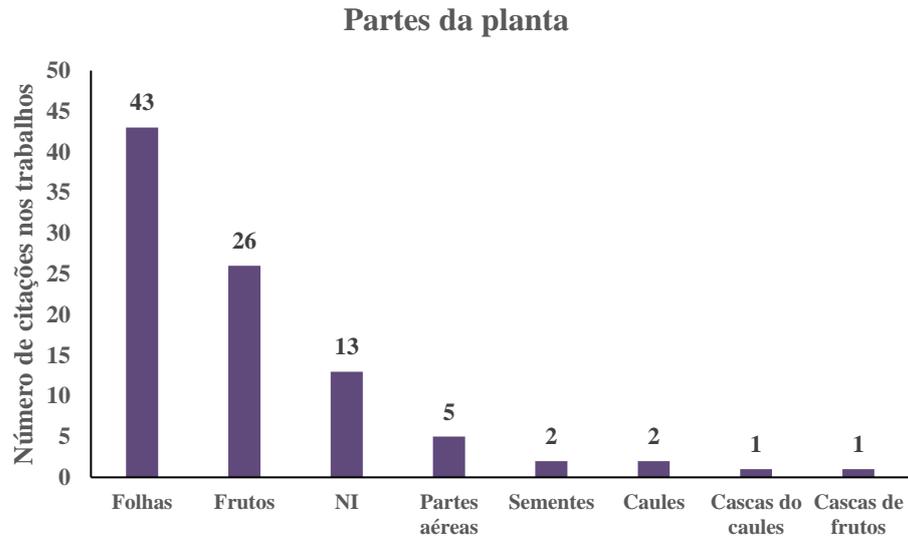


Figura 5: Partes da planta do gênero *Passiflora* estudadas nos artigos selecionados na presente revisão.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Dando sequência ao mapeamento, os dados foram classificados também como grupos de amostra, sendo encontrado estudos com extrato bruto, frações, formulações, sucos e poupas dos frutos, tinturas e alimento (farinha de semente). Os resultados encontram-se na **Figura 6**. No grupo dos extratos, foi visualizado também quantos descreviam estudos com extratos industriais, adquiridos comercialmente, sendo encontrado um total de 4 estudos.

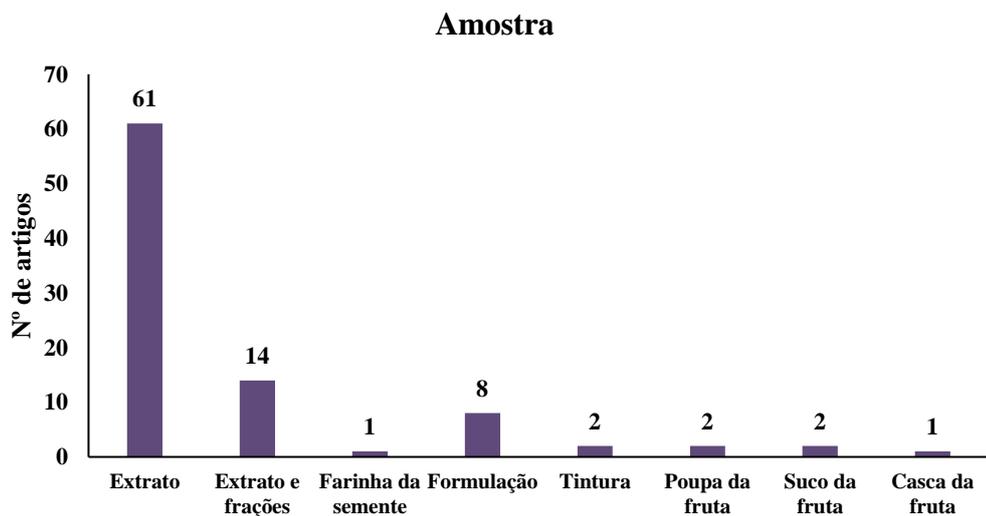


Figura 6: Tipos de amostras investigadas nos artigos selecionados na presente revisão.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dentre os 75 artigos que abordaram estudos com extratos e frações de diferentes elementos de *Passiflora*, 15 autores não citaram o processo extrativo. Dentre os processos mais descritos nos outros 60 trabalhos, destaca-se a técnica de maceração (n=17), sendo que em 2

trabalhos compararam rendimentos extrativos com outras duas técnicas (decoção e Soxhlet). O restante das pesquisas que mencionaram o processo de obtenção do extrato, citaram técnicas individualmente ou agrupadas, de acordo com a finalidade da investigação, sendo elas: extração acelerada, extração assistida por homogeneizador, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração de fase sólida, percolação, infusão e refluxo. Cabe salientar que 4 extratos foram obtidos comercialmente.

O processo de extração origina uma solução de amostra com determinada natureza química, influenciada pelos solventes utilizados durante o processo de extração, o que possibilita o mapeamento de quais as características químicas dos extratos mais citadas dos artigos lidos. Extratos aquosos foram os mais empregados nos estudos, seguidos dos hidroetanólicos, além de metanólico, hidrometanólico, etanólico, que também foram citados. Esses extratos podem ser analisados como extrato bruto ou serem particionados em diferentes frações, categorizadas em aquosa, metanólica, acetato de etila, butanólica, por exemplo. Para exemplificar estudos com frações e extratos, destaca-se o estudo de Ayres e colaboradores (2017), que analisou o perfil fitoquímico e a influência no tempo de imobilidade de camundongos do extrato aquoso e diferentes frações do extrato (acetato de etila, butanólica e resíduo aquoso) de folhas de *P. edulis*.

Apesar de extratos e frações representarem um pouco mais que 80% dos tipos de amostras que foram analisadas, uma parcela significativa de amostras foram formulações (n=8), o que reflete quase 10% das amostras estudadas. Nessa subcategoria de formulação, o que se destaca é a diversidade de formas farmacêuticas que a representa, havendo investigações com nanopartículas, cápsulas, comprimidos, emulsão hidratante tópica, extrato fluido, hidrogel de quitosana, e outros produtos contendo extrato de espécies de *Passiflora*. Verifica-se a variação de produtos estudados, sendo sólidos, semissólidos e líquidos.

Ao analisar as espécies de *Passiflora* estudadas nos trabalhos (**Figura 7**), foi possível observar que 62 trabalhos relatam estudos com amostras advindas de apenas 1 espécie, enquanto outros trabalhos compararam amostras advindas de mais de uma espécie de *Passiflora* (n=20 trabalhos) ou de mais de um gênero de plantas (n=9 trabalhos).

ESPÉCIES ESTUDADAS NOS TRABALHOS



Figura 7: Representação gráfica da quantificação dos estudos em três grupos de artigos: apenas 1 espécie de *Passiflora*, mais de 1 espécie de *Passiflora* e documentos que relataram investigação de outros gêneros em conjunto com espécies de *Passiflora*. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Nos trabalhos efetuados com apenas 1 espécie, 4 foram realizados com *P. alata*, 20 investigaram apenas *P. edulis* e 12 trabalharam apenas com *P. incarnata*. Além dessas 3 espécies principais, foram relatados estudos com 18 espécies diferentes de *Passiflora* (**Figura 8**), sendo a mais estudada a *P. ligularis*, com 3 artigos publicados. Seguida de *P. caerulea*, *P. leuschenaultii*, *P. molíssima*, *P. suberosa* e *P. subpeltata* que apresentam 2 publicações cada. Com apenas um estudo, *P. actínia*, *P. bogotensis*, *P. cincinatta*, *P. coccínea*, *P. foetida*, *P. manicata*, *P. mucronata*, *P. nítida*, *P. platyloba*, *P. setácea*, *P. tarminiana* e *P. tripartita* também foram estudadas individualmente, como representado na **Tabela 4**.

APENAS 1 ESPÉCIE

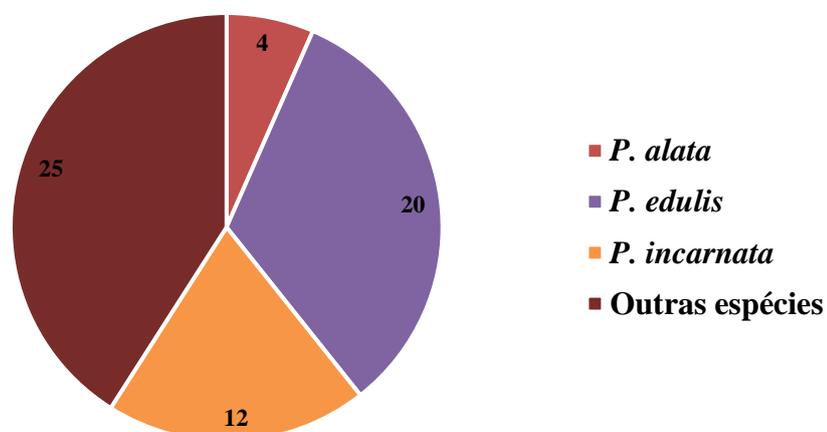


Figura 8: Espécies estudadas nos artigos que investigaram apenas 1 espécie. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 4 – Espécies estudadas individualmente, além de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*.

Espécie	Nº Artigos	Espécie	Nº Artigos
<i>P. actínia</i>	1	<i>P. molíssima</i>	2
<i>P. bogotensis</i>	1	<i>P. mucronata</i>	1
<i>P. caerulea</i>	2	<i>P. nítida</i>	1
<i>P. cincinata</i>	1	<i>P. platyloba</i>	1
<i>P. coccínea</i>	1	<i>P. setácea</i>	1
<i>P. foetida</i>	1	<i>P. suberosa</i>	2
<i>P. leuschenaultii</i>	2	<i>P. subpetalta</i>	2
<i>P. ligularis</i>	3	<i>P. tarminiana</i>	1
<i>P. manicata</i>	1	<i>P. tripartita</i>	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Considerando agora os 20 trabalhos que efetuaram investigações com mais de 1 espécie ao mesmo tempo, o objetivo da maioria deles se dá pela determinação e quantificação do teor de metabólitos secundários, principalmente de flavonoides nas espécies de interesse (**Figura 9**). Essa análise quantitativa, é corroborada com potenciais atividades biológicas, comparando o potencial de determinado efeito farmacológico de acordo com o perfil fitoquímico das classes dentro do gênero estudado. Um exemplo da configuração desses estudos foi a pesquisa de Castellanos e colaboradores (2020), em que trabalhou com oito espécies diferentes de *Passiflora*, identificando 59 diferentes compostos distribuídos por classe de aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonoides e outros compostos fenólicos. Nesse estudo identificaram dois flavonoides que não haviam sido descritos anteriormente em *P. uribei* e *P. lehemanii*, e o conteúdo desses metabólitos secundários observados nas diferentes espécies foi correlacionado com a atividade inibitória de *quórum sensing*, definido como um mecanismo, geralmente empregado em investigações com bactérias, em que a concentração celular é dependente da regulação gênica, com o emprego de dois biossensores (SIRCILI; TRABULSI, 2004).

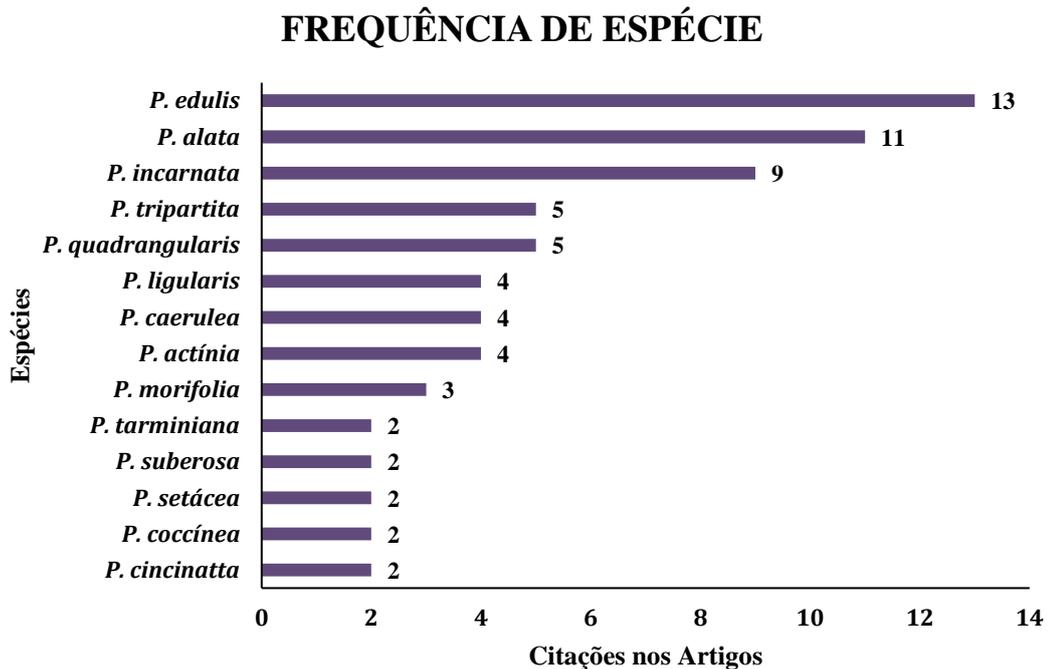


Figura 9: Frequência das espécies descritas nos artigos que trabalharam com mais de 1 espécie.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Foi possível verificar nos trabalhos com mais de 1 espécie que a maioria efetuou estudos de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* juntamente com outras espécies (n=5), representando 25% desses documentos publicados. Independentemente do tipo de comparação, as mais citadas nos estudos foram a *P. edulis* (n=13), seguida de *P. alata* (n=11) e *P. incarnata* (n=9), compondo a tríade das espécies desse gênero mais descritas nesse grupo de artigos, assim como nos que investigaram apenas 1 espécie de *Passiflora*. No entanto, *P. quadrangularis* e *P. tripartita* foram relatadas em 5 diferentes documentos, seguidamente de *P. actínia*, *P. caerulea* e *P. ligulares* citadas em 4 trabalhos.

Além das espécies mencionadas acima, é possível notar a magnificência do gênero *Passiflora* que ultrapassa os estudos apenas com a tríade (*P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*). Além destas, observa-se algumas das espécies descritas: *P. cincinatta*, *P. coccínea*, *P. morifolia*, *P. setácea*, *P. suberosa*, *P. tarminiana*, *P. tripartita*, representadas na **Figura 10**. Ademais *P. bogotensis*, *P. foetida*, *P. molíssima*, *P. mucronata*, *P. nítida*, *P. loefgrenii*, *P. herba* e *P. violácea* são mais alguns exemplos estudados.

MAIS DE 1 GÊNERO ALÉM DE *Passiflora*

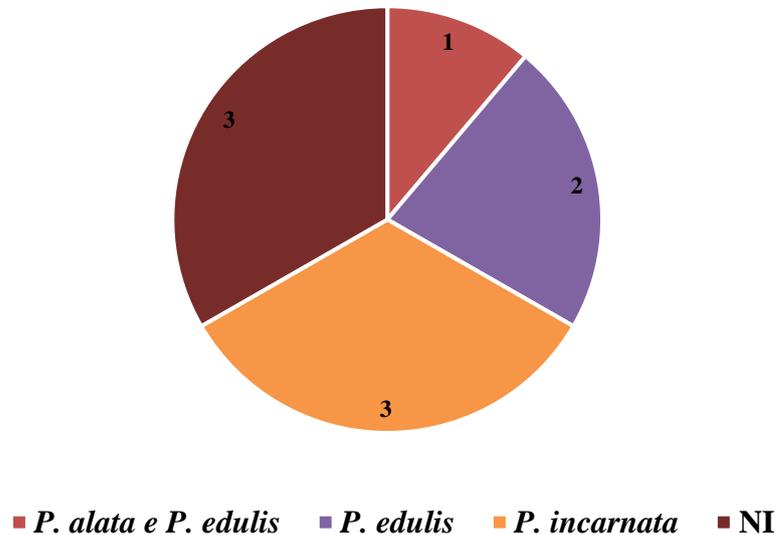


Figura 10: Espécies de *Passiflora* empregadas nos artigos com pelo menos um gênero além da *Passiflora*.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Neste tipo de grupamento de trabalhos, onde diferentes espécies de *Passiflora* foram comparadas entre si no quesito analítico de flavonóides, foi possível identificar pesquisas que compararam apenas 2 espécies, bem como pesquisas que compararam 3 ou mais, inclusive uma que estudou ao mesmo tempo 95 espécies. Abourashed e colaboradores (2002) realizaram um estudo de identificação de flavonoides em 115 amostras de 95 espécies de *Passiflora*, divididas de acordo com a sua origem: tropical, europeia, norte-americana e australiana. Esse estudo traz o conceito de impressão digital de matérias-primas vegetais à tona, observando a autenticidade das preparações de maracujá, diferenciação de espécies que são morfologicamente semelhantes, compreensão de perfis fitoquímicos resultantes da hibridização, identificação de marcadores taxonômicos de plantas desse gênero. Trabalhos como esse possibilitam o desenvolvimento de pesquisas de seleção de espécies que são fitoquimicamente equivalentes entre si, mas que por exemplo, em uma região que é muito utilizada uma é mais abundante que a outra, trazendo um viés mercadológico da possibilidade de propagação de espécies atrelada a investigações do efeito de variações sazonais e geográficas na produção de marcadores específicos, correlacionando esses flavonoides a potenciais atividades farmacológicas, para originar potenciais produtos derivados de diferentes espécies de *Passiflora*.

Ao analisar agora os estudos onde foram efetuadas investigações com mais de um gênero de plantas conjuntamente com espécies de *Passiflora* (n= 9 trabalhos), o objetivo da

maioria dos pesquisadores foi a comparação do perfil fitoquímico entre os gêneros, principalmente pelo teor total de flavonoides. Essa análise fitoquímica caracteriza um pré-requisito para verificações de alterações no padrão flavonoide em medicamentos fitoterápicos, comparação em plantas cultivadas em sistema orgânico e convencional, capacidade antioxidante e determinação de vitamina C, como demonstrado nos artigos que avaliaram um gênero ou mais em conjunto com *Passiflora*.

Em conformidade com os 9 documentos que relataram um ou mais gêneros além da *Passiflora*, nota-se estudos com os gêneros *Maytenus* sp., *Betula*, *Tagetes*, *Mangifera* sp., *Siparuna*, *Crataegus*, *Matrikaria* e *Ginkgo*. Além desses gêneros, foram encontrados estudos voltados para gêneros de frutas e leguminosas presentes em nossa alimentação, sendo os gêneros relatados em 3 estudos os de abobrinha, batata, berinjela, laranja-pera, limão taiti, manga, rabanete, brócolis, cenoura, couve, mandioca amarela, rabanete, uva, espinafre, abacate, banana, abacaxi, mamão, melancia, cherimólia, melão e morangos. Dentre as espécies de *Passiflora* que são empregadas em estudos com outros gêneros, mais uma vez as protagonistas são *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, como é possível observar no gráfico da **Figura 10**.

Na etapa de leitura de título e resumos para a seleção dos potenciais documentos, uma das palavras cruciais para a escolha de determinado documento foi “flavonoide”. Sendo assim, com a análise quantitativa e qualitativa dessa classe de substâncias, foi possível relacionar quantos metabólitos secundários desse tipo são relatados nos estudos e quais são os mais relatados. Com relação a quantidade de flavonoides relatados, 7,70% relatam apenas 1 flavonoide (n=7), 10,98% não especificam o(s) flavonoide(s) (n=10), 36,26% descrevem de 2 a 4 metabólitos flavonoídicos (n=33) e, a maioria, 45,06% descrevem mais de quatro tipos de flavonoides (n=41) (**Figura 11**).

NÚMERO DE FLAVONOIDES ESTUDADOS

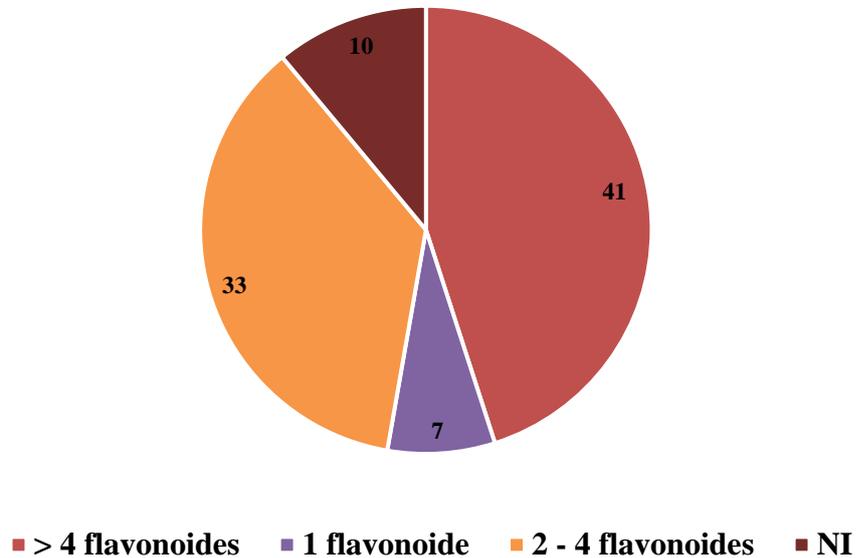


Figura 11: Flavonoides relatados nos 91 artigos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

No que concerne aos flavonoides estudados nos 91 documentos lidos na íntegra, oito apresentaram destaque por serem relatados em uma frequência mais significativa do que outros. Isovitexina (n=43) e vitexina (n=40) são os dois que mais foram descritos, seguidos da isoorientina e orientina que ambos estão presentes em 34 artigos. Com menor frequência, rutina (n=19) e quercetina (n=20) merecem destaque, pois uma parcela significativa dos estudos que abordam esses dois flavonoides, emprega como SQRs para quantificação de flavonoides. Com menores relatos, schaftosídeo (n=14) e isoschaftosídeo (n=13) são destacados, já que compõem os metabólitos secundários que autenticam o perfil fitoquímico de espécies do gênero *Passiflora*. (**Figura 12**).

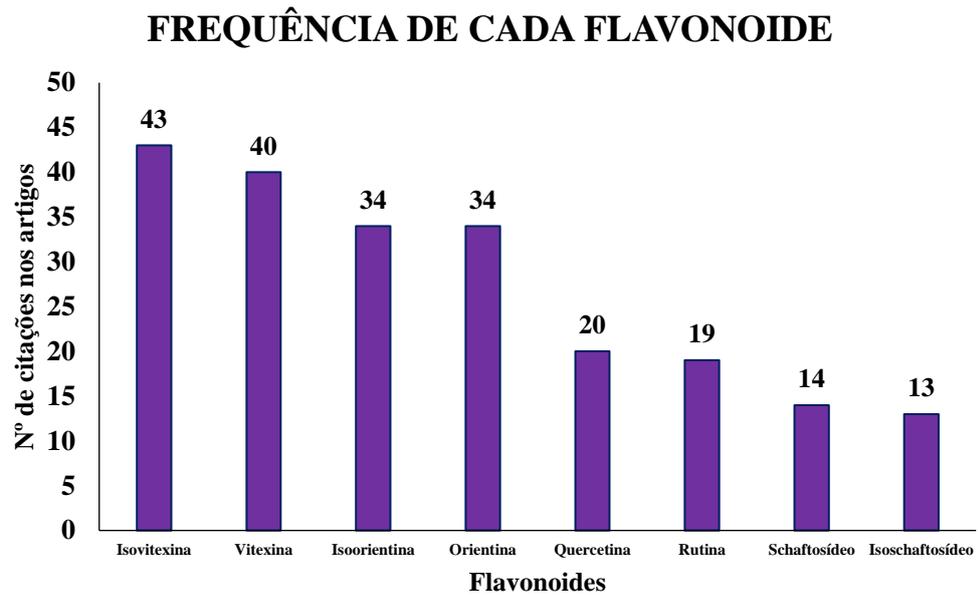


Figura 12: Frequência de descrição dos flavonoides nos 91 artigos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Todos os artigos selecionados (n=91) descrevem o emprego de análises qualitativa ou quantitativa em suas pesquisas, ou até mesmo realizam técnicas que geram resultados de natureza tanto qualitativa como quantitativa, como representado na **Figura 13**. O menor percentual, representado por 13 documentos, caracteriza os estudos quantitativos que utilizaram técnicas cromatográficas e/ou espectrais para a realização de suas pesquisas. Em seguida, com uma quantidade significativa de publicações, 34 realizam uma investigação com o foco de obter dados qualitativos, incluindo avaliações de identificação de compostos flavonoides em determinadas amostras de *Passiflora*. Porém, a maioria dos estudos realizam uma varredura que resulta em parâmetros qualitativos e quantitativos ao mesmo tempo, por exemplo, estudos que realizam a identificação, caracterização e quantificam as substâncias de interesse em produtos de *Passiflora*.

OBJETIVO DO ESTUDO

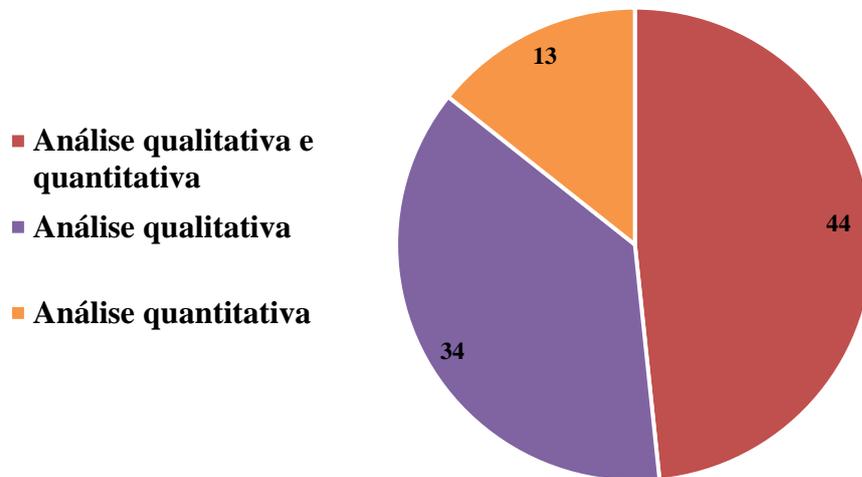


Figura 13: Representação gráfica da finalidade dos 91 artigos, sendo os que realizaram análise qualitativa e quantitativa de flavonoides (n=44), análise qualitativa de flavonoides (n=34) e análise quantitativa de flavonoides (n=13). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

A **Figura 14** informa quais foram as técnicas analíticas empregadas nos estudos para avaliação dos flavonoides. Ressalta-se que a finalidade da investigação está muito correlacionada com as técnicas empregadas nos estudos. A maioria dos artigos empregou técnicas cromatográficas, mas, alguns pesquisadores também efetuaram análises com técnicas espectrais, sendo a espectrofotometria no UV a mais citada dentre estas.

Observa-se que quase 30% das pesquisas abordam as técnicas cromatográficas com uma ou mais técnicas espectrais em conjunto (n=27). Destes trabalhos, os que possuem uma abordagem quantitativa empregando ambas as técnicas são apenas dois, enquanto 11 agrupam as técnicas cromatográficas com as espectroscópicas para obtenção de resultados do tipo qualitativo. O restante destes 27 artigos (n=13) emprega as técnicas cromatográficas e também as espectrais para obtenção dos dois vieses de resultados, tanto qualitativo quanto quantitativo.

ABORDAGEM DAS TÉCNICAS

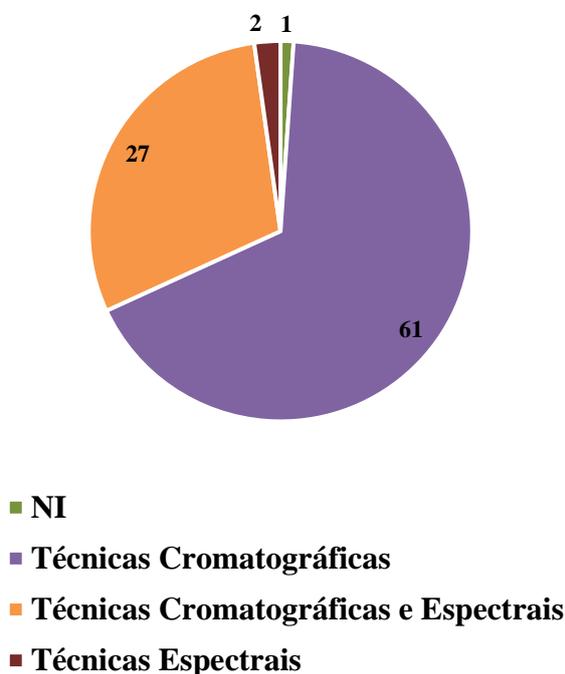


Figura 14: Representação gráfica de técnicas cromatográficas individualmente ou em conjunto nos 91 artigos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dos artigos avaliados, 2 publicações abordaram a utilização de apenas uma técnica espectral nos seus trabalhos, sem nenhuma outra técnica adicional. Nestes casos, citaram o seu uso para quantificar fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu, em que o método espectrofotométrico é utilizado para a análise com o reagente colorimétrico de Folin Ciocalteu. Já, para a quantificação de flavonoides, é descrito pelo método colorimétrico em que o reagente é o cloreto de alumínio, a partir da leitura do espectro, os resultados são expressos em micrograma de flavonoides por grama de massa fresca do marcador químico de interesse, que no caso de Lima e colaboradores (2008) foi a rotina.

Além disso, apenas um artigo diverge dos demais por não explicitar na escrita o tipo de técnica que foi empregado categorizado como NI. Este foi o caso do estudo de Sunitha e Devaki (2009), o qual analisa a atividade antioxidante de folhas de *P. edulis*, porém ao abordar a análise fitoquímica dessa espécie representa o resultado com o sinal de + para presença e – para abstenção dos componentes estudados, mas não menciona qual a técnica empregada, apenas citando na metodologia que foi empregado técnicas farmacopeicas para a determinação de classes de substâncias.

A partir da leitura dos 91 documentos, observa-se que os autores e colaboradores descrevem a utilização de diferentes técnicas cromatográficas incluindo CL, CCD, CG, EC,

além da cromatografia em contracorrente (HSCCC). Aproximadamente 87,91% (n=80) das pesquisas mencionadas nesse trabalho relatam terem utilizado alguma variação de CL, consolidando a relevância dessa técnica não apenas para produtos naturais em geral, mas para análise de amostras contendo *Passiflora*. A presente revisão observou que 17 estudos utilizam a técnica de CCD, sendo que 7 descrevem apenas esta técnica para identificação de compostos das plantas, enquanto 9 complementaram as análises realizadas com CL e 1 descreve a utilização de CCD com CL e HSCCC. Importante salientar que 4 desses 17 estudos abordam uma variação de CCD, denominada HPTLC, cromatografia em camada delgada de alto desempenho. Outra técnica cromatográfica estudada para análise flavonoides foi a CG, descrita em apenas 3 trabalhos. Apesar de apenas Costa e colaboradores (2016) relatarem a utilização de EC para a análise de flavonoides, importante mencionar essa técnica, pois no estudo foi comparada a técnicas de CLAE e CLUE, apresentando uma análise com o tempo curto, picos com boa resolução e simetria nos eletroferogramas obtidos para as espécies *P. alata*, *P. quadrangulares*, *P. bogotensis* e *P. tripartita*.

Como citado anteriormente, 27 estudos descrevem o emprego de técnicas cromatográficas acompanhadas de técnicas espectrais. Juntamente com as técnicas descritas no parágrafo acima, são destacadas três diferentes técnicas espectrais, sendo elas: espectrofotometria, RMN e MS. A espectrofotometria é relatada em 12 artigos, sendo relatada em pesquisas que empregaram CCD (n=3), em conjunto com apenas CL (n=6), com CL e CCD na mesma investigação (n=2) e CL e HSCCC juntas (n=1).

Com relação à técnica de RMN, esta é descrita em 11 artigos, sendo os estudos realizados de forma complementar a outras técnicas para avaliação dos flavonoides, tais como: CCD (n=1), CL (n=7), CL e CG (n=1), CL e HSCCC (n=1) e com CL, CCD e HSCCC (n=1). Por último, a terceira técnica de espectroscopia representada por MS, assim como RMN é empregada em 11 pesquisas, sendo abordada em conjunto com descrição de técnicas de CL (n=6), apenas com CCD (n=1), CL mais CCD (n=1), CL mais CG (n=2) e LC mais HSCCC (n=1). O emprego de ambas é geralmente para caracterização das substâncias de flavonoides isoladas das espécies estudadas.

Como mencionado anteriormente, as técnicas de cromatografia líquida são as mais empregadas nos documentos lidos na íntegra, representando um total de 82 artigos dentro dos que abordaram apenas as técnicas cromatográficas isoladas ou juntamente com as técnicas espectrais. Nessas 82 publicações, 7 variações de metodologia e equipamentos são descritas, sendo elas: HPLC, UHPLC, UFLC, UPLC, RPHPLC (CLAE de fase reversa), MPLC

(cromatografia líquida de média eficiência). Neste momento da revisão, optou-se por manter as siglas das técnicas em inglês, igualmente ao que aparece nos documentos. Conforme pode ser observado na **Figura 15**, a técnica HPLC é a mais descrita, sendo abordada em 58 pesquisas, seguida da UHPLC (n=13), UFLC (n=2), UPLC (n=1) RPHPLC (n=1), MPLC (n=1) e LC (n=1). A publicação categorizada como LC, se refere ao trabalho de Freitas e colaboradores (2007), pois na metodologia, quando especificam as características do método cromatográfico, é explicitado a utilização de cromatógrafo líquido Shimadzu®, no entanto não há a descrição do tipo e modelo do equipamento utilizado. Alguns trabalhos citam o emprego de mais de uma técnica de cromatografia líquida nas avaliações de suas amostras. Isso pode ser observado em 5 artigos que empregaram HPLC mais UPLC (n=2), UHPLC mais LC (n=1), RPHPLC mais UPLC (n=1) e HPLC mais UHPLC (n=1). Nestes trabalhos, a utilização de mais de uma técnica cromatográfica no trabalho justificou-se pelo fato de que a maioria dos estudos possuem como objetivo a identificação e quantificação de flavonoides, como no estudo de Wohlmuth e colaboradores (2010) que empregaram a técnica de HPLC para a quantificação dos componentes químicos de interesse, enquanto que pelo LC-MS identificou e caracterizou quais eram esses flavonoides, pois o seu resultado é dado pela massa específica de cada substância.

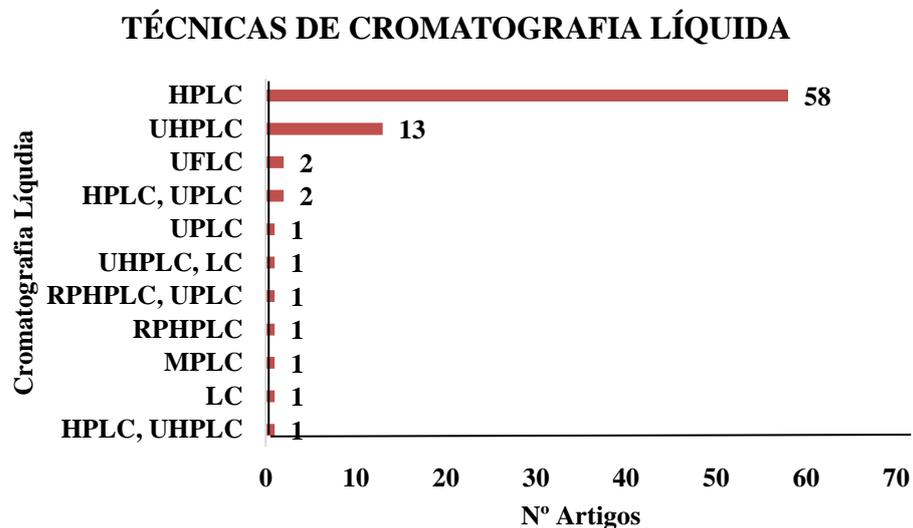


Figura 15: Representação quantitativa dos diferentes modelos de cromatografia líquida descritas nos trabalhos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Dentre as 82 publicações que empregam a utilização de algum tipo de CL para investigação de flavonoides em amostras de diferentes espécies de *Passiflora*, 74 explicitaram os detectores acoplados ao equipamento para realização da análise dos dados da corrida

cromatográfica. Na **Figura 16**, o detector mais relatado é do tipo DAD, com 32 artigos que abordam a sua utilização de maneira isolada, seguido de 27 estudos que empregam mais de 1 detector. Nesse grupo de documentos que empregam mais de um modelo de detector, 24 se referem a pesquisa do DAD acoplado ao MS. Em terceira colocação como o detector mais descrito, o do tipo UV é mencionado em 9 trabalhos com seu uso isolado e o MS é empregado em 6 estudos. Além disso, é possível observar análises com variações do detector MS acoplado ao equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo empregada as denominações ESI-MS para análises com MS acoplado a tecnologia de ESI (n=8) e QqQ-MS para leituras no equipamento com tecnologia QqQ de MS (n=3).

DETECTORES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

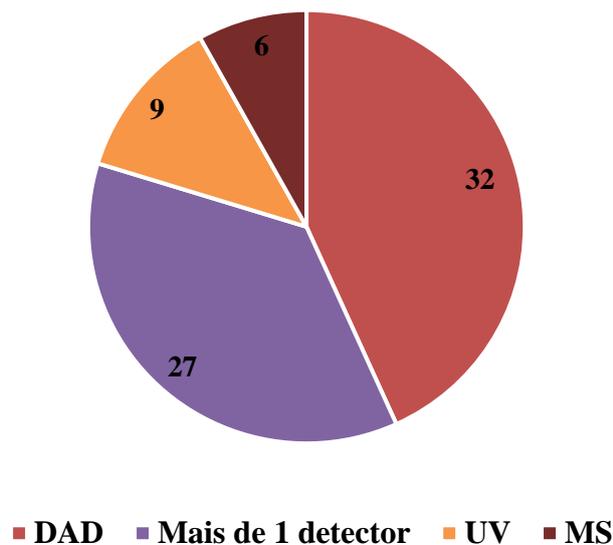


Figura 16: Representação quantitativa dos diferentes modelos de detectores empregados nos artigos que abordam técnicas de cromatografia líquida. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Segundo a extração de dados provenientes da leitura dos 91 documentos, diferentes parâmetros analíticos de validação são utilizados para obter uma melhor performance e confiabilidade dos resultados. Tendo em vista que 82 artigos abordam algum método analítico a partir de CL há diferentes finalidades para o emprego dessa metodologia, sendo desde a identificação, quantificação ou até mesmo caracterização de substâncias isoladas das espécies de *Passiflora* investigadas. Quando se refere ao isolamento de compostos, 8 trabalhos demonstram terem isolado determinadas substâncias em suas pesquisas, sendo empregada as

técnicas de cromatografia líquida com o objetivo de caracterização dessas substâncias. A identificação de flavonoides é relatada em 68 estudos com CL, apesar de ter sido a mais descrita, destaca-se os trabalhos que descrevem a quantificação de metabólitos secundários do tipo flavonoide (n=49). Dentro do grupo de artigos que relatam terem quantificado essas substâncias químicas, 35 relatam terem realizado curva de calibração para avaliação da concentração real do analito e o sinal detectado no cromatograma após a corrida, demonstrando a linearidade do método analítico. Como relatado no Tópico 1.5 da Seção 1 Introdução, a linearidade é um dos parâmetros que a ANVISA preconiza que devem ser avaliados para a validação de determinado método analítico (BRASIL, 2017). Porém, não é o único parâmetro dentro dos que necessitam ser avaliados. Foi verificado que dentre os 39 artigos que descrevem curva de calibração para quantificação de flavonoides, apenas 10 validaram com os demais parâmetros o método de cromatografia líquida empregado.

Com a finalidade de compreensão dos principais resultados das validações dos estudos, foi elaborada a **Tabela 5**. Nessa tabela está descrito as diferentes amostras de espécies de *Passiflora* analisadas, a descrição do método de cromatografia líquida empregado, os parâmetros que foram validados e as SQRs que foram utilizadas como padrão. Para uma compreensão mais adequada e completa, em seguida a **Tabela 5** há uma descrição complementar referente aos 10 artigos descritos, com um foco maior nos cromatogramas obtidos de cada estudo, os flavonoides que foram avaliados pelos métodos validados, além de outras especificações dos métodos cromatográficos variáveis de CL empregados.

Tabela 5: Dados extraídos dos 10 artigos desta revisão que descreveram e validaram método de cromatografia líquida para análise de amostras contendo *Passiflora*. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

Título	Amostras analisadas	Descrição do Método	Parâmetros validados	Substâncias Químicas de Referência	Autores
Stability of the constituents of <i>Calendula</i> , Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS	Tinturas de flores secas de <i>Calendula officinalis</i> L., taças com flores secas de <i>Passiflora incarnata</i> L. e frutos secos de <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	<p>HPLC-DAD</p> <p>Coluna: LiChrosorb RP18 (5 µm, 250 × 4 mm id) (Merck) equipada com uma pré-coluna Fase Móvel: gradiente de CH₃CN/H₂O com H₃PO₄ (pH 3,0); Fluxo: 1,3 mL/min; Volume de injeção: 25 µL</p> <p>HPLC-MS</p> <p>Coluna: LiChrosorb RP18 (5 µm, 250 × 4 mm id) (Merck) equipada com uma pré-coluna Fase Móvel: gradiente de solvente linear de quatro etapas CH₃CN/H₂O com CH₂O₃ aquoso (pH 3,0); Fluxo: 1,3 mL/min; Volume de injeção: 25 µL</p>	Linearidade Repetibilidade Reprodutibilidade	Homorientina Isoquercitrina Isorhamnetin-3- O Glicosídeo Isorhamnetin-3- O –Rutinosídeo Isovitexina Rutina Silibina Taxifolina Vitexina	BILIA et al., 2002
A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids from <i>Passiflora alata</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. incarnata</i> and <i>P. caerulea</i> and Comparison with HPLC Method	Extrato de folhas de <i>P. edulis</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. incarnata</i> e <i>P. caerulea</i> .	<p>HPLC-DAD</p> <p>Coluna: RP18 (250 × 4,0 mm i.d.; 5 µm) com uma pré-coluna Supelco LC18 Supelguard (2 cm × 4,0 mm de diâmetro interno; 5 µm). Fase Móvel: solvente A [2,0% fórmico ácido em água] e solvente B acetonitrila]. Gradiente: 0–10 min 15% B em A, 10–40 min 15–30% B em A e 40–50 min 30–15% B em A. Fluxo: 0,8 mL/min Volume de injeção: 10 µL</p>	Amplitude Exatidão Limite de Detecção Limite de Quantificação Linearidade Precisão Sensibilidade	Isoorientina Orientina Rutina	PEREIRA et al., 2004

Quantification of isoorientin and total flavonoids in <i>Passiflora edulis</i> fruit pulp by HPLC-UV/DAD	Extrato da polpa do fruto de <i>P. edulis</i>	<p style="text-align: center;">HPLC-UV/DAD</p> <p>Coluna: Symmetry® C18 column (250 mm long×4.6 mm i.d.; 5 µm) com uma pré-coluna (2.0 cm long×4.0 mm i.d.; 5 µm) Fase Móvel: 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B) Fluxo: 0,8 mL/min Volume de injeção: 10 µL</p> <p style="text-align: center;">LC-MS/MS</p> <p>Coluna: Symmetry® C18 (250 mm long×4.6 mm i.d.; 5 µm) com uma pré-coluna (2.0 cm long×4.0 mm i.d.; 5 µm) Fase Móvel: 0,2% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,2% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B) Fluxo: 0,2 mL/min</p>	Exatidão Limite de Detecção Limite de Quantificação Linearidade Precisão	Isoorientina Isovitexina Rutina	ZERAIK; YARIWAKE, 2010
Simultaneous Determination of Alkaloids and Flavonoids from Aerial Parts of <i>Passiflora</i> Species and Dietary Supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC	Partes aéreas de <i>P. incarnata</i> L., <i>P. violácea</i> Vell., <i>P. edulis</i> Sims., <i>P. suberosa</i> L., <i>P. morifolia</i> Mast. e <i>P. quadrangulares</i> L. e suplementos dietéticos que contêm <i>Passiflora</i> .	<p style="text-align: center;">UPLC-UV-MS</p> <p>Coluna: Acquity UPLCTM BEH Shield RP18 (100 mm × 2,1 mm D.I., 1,7 µm) equipada com uma pré-coluna LC-18 (Vanguard 2,1 x 5 mm, Waters); Fase móvel: água (0,05% de ácido fórmico) (A), acetonitrila (0,05% de ácido fórmico) (B); Gradiente: 0 min, 90 %A: 10% B aumentou linearmente nos próximos 10 min para 77% A: 23% B.; Fluxo: 0,27 mL/min; Volume de injeção: 2µL.</p>	Exatidão Precisão Linearidade	Isoorientina Isovitexina Orientina Vitexina	AVULA et al., 2012

Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in <i>Passiflora</i> species	<p>Extrato das folhas de <i>Passiflora alata</i>, <i>P. capsularis</i>, <i>P. cincinnata</i>, <i>P. edulis f. flavicarpa</i>, <i>P. edulis f. edulis</i>, <i>P. galbana</i>, <i>P. gibertii</i>, <i>P. maliformis</i>, <i>P. malacophylla</i>, <i>P. morifolia</i>, <i>P. mucronata</i>, <i>P. quadrangularis</i>, <i>P. racemosa</i>, <i>P. setácea</i>, <i>P. suberosa</i>, <i>P. vitifolia</i> e <i>P. tenuifolia</i></p>	<p>HPLC-DAD</p> <p>Coluna: HPLC de fase reversa (Waters XBridge™, BEH C 18, 100 mm × 3,0 mm ID, 2,5 μm de tamanho de partícula). Fase Móvel: 0,2% (p/p) de ácido fórmico em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) Gradiente: 5 a 20% de B em A ao longo de 0 a 30 min. Fluxo: 0,6 mL/miL Volume de injeção: 10 μL</p>	<p>Limite de Detecção</p> <p>Limite de Quantificação</p> <p>Linearidade</p> <p>Precisão</p>	<p>Isoorientina</p> <p>Isovitexina</p> <p>Orientina</p> <p>Rutina</p> <p>Vitexina</p>	GOMES et al., 2017
Analysis of vitexin in aqueous extracts and commercial products of Andean <i>Passiflora</i> species by UHPLC-DAD	<p>Extrato de partes aéreas de <i>P. tripartita var tripartite</i>, <i>P. tripartita var molíssima</i>, <i>P. mixta</i>, <i>P. cumbalensis</i>, <i>P. edulis var flavicarpa</i>, <i>P. edulis var edulis</i>, <i>P. quadrangulares</i>, <i>P. alata</i>, <i>P. ligularis</i> e <i>P. tarminiana</i>. Medicamentos fitoterápicos em gotas de extratos hidroalcoólicos e etanólicos de <i>P. molíssima</i>, gotas de <i>P. incarnata</i> e cápsulas de <i>P. molíssima</i>.</p>	<p>UHPLC-DAD</p> <p>Coluna: Kinetex C18 (100 × 2,1 mm; 2,6 μm). Fase Móvel: 0,5% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Gradiente: iniciou com 10-35% B (0-8 min), seguido por 35% B (8-9 min), 35-85% B (9-15 min) e 85-10% B (15-16 min). Fluxo: 0,3 mL/min Volume de injeção: 3 μL</p>	<p>Especificidade</p> <p>Exatidão</p> <p>Limite de Detecção</p> <p>Limite de Quantificação</p> <p>Linearidade</p> <p>Precisão</p>	Vitexina	SEPÚLVEDA et al., 2018

Optimization of flavonoid extraction from <i>Passiflora quadrangularis</i> leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions	Extrato de folhas de <i>P. quadrangularis</i>	<p style="text-align: center;">HPLC-DAD</p> <p>Coluna: Luna C18 ((250 mm × 4.6 mm i.d. 5 μm) Fase Móvel: fase A (água:acetoneitrila:ácido acético, 90:10:1 v/v/v) e fase B (acetoneitrila:água:ácido acético, 90:10:1 v/v/v) Gradiente: 11% B (0–5 min), 11–15% B (5–20 min) Fluxo: 1,0 mL/min</p>	<p>Exatidão</p> <p>Limite de Detecção</p> <p>Limite de Quantificação</p> <p>Linearidade</p> <p>Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)</p> <p>Seletividade</p>	Isoorientina Isovitexina Orientina Vitexina	ECHEVERRY et al., 2018
Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from <i>Passiflora</i> waste	Casca de frutos de maracujá.	<p style="text-align: center;">UHPLC-PDA</p> <p>Coluna: ACQUITY HSS C18 SB (Waters, Milford, MA, EUA, 1,8 μm; 2,1 × 100 mm) a 40 °C. Fase Móvel: água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetoneitrila (B). Gradiente: iniciando com 10% de B e chegando a 100% de B em um gradiente de 25 min. Fluxo: 0,3 mL/min Volume de injeção: 1 μL</p>	<p>Especificidade</p> <p>Limite de Detecção</p> <p>Limite de Quantificação</p> <p>Linearidade</p> <p>Precisão</p> <p>Recuperação</p>	Isoorientina Isovitexina Orientina	DA SILVA FRANCISCHINI et al., 2020
Towards the cosmetic application of <i>Passiflora coccinea</i> (Aubl.): antioxidant activity and photo protective capacity of the methanolic and glycolic leaf extracts	Folhas de <i>P. coccinea</i>	<p style="text-align: center;">HPLC-DAD</p> <p>Coluna: LiChrospher RP-18e (250 mm x 4 mm di x 5 mm). Fase Móvel: H₂O:H₃PO₄ (pH 2,65) (A) e ACN-THF 95:5 (v/v) (B). Gradiente: 0-11 min, 5-18% B; 11-35 min, 18-19% B; 35-36 min, 19-5% B e 37 min, 5% B. Fluxo: 1,0 mL/min</p>	<p>Limite de Detecção</p> <p>Limite de Quantificação</p> <p>Linearidade</p> <p>Precisão</p> <p>Seletividade</p>	2''-O-β-Dglucopyranosyl-Isovitexina Rutina diidratada Vitexina	DA SILVA; SALVADOR; BOTTOLI, 2020

		LC-QqQ-MS/MS	
<i>In Vivo</i> Antidepressant Effect of <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> into Cationic Nanoparticles: Improving Bioactivity and Safety	Nanopartículas carregadas com extrato de folhas de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener	Coluna: Shim-pack XR-ODS (75 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,2 µm; Shimadzu); Fase Móvel: A (0,1% HCOOH) e B (MeCN:MeOH; 6:4; v/v); Gradiente: 5% B (0–3 min), 5–15% B (3–8 min), 15–30 B (8–33 min), 30–100% (30–50 min) Fluxo: 1mL/min	Exatidão Fator de correlação Limite de Detecção Limite de Quantificação Linearidade Precisão
		UHPLC-UV-DAD Coluna: Shim-pack XR-ODS (75 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,2 µm; Shimadzu); Fase Móvel: A (0,1% HCOOH) e B (MeCN/MeOH; 6:4; v/v), Gradiente: 5% B (0–3 min), 5%–15% B (3–8 min), 15– 30 B (8–33 min), 30–100% (30–50 min); Fluxo: 1 mL/min	Isoorientina Isovitexina Luteolina Orientina Vicenina-2 Vitexina
		ALVES et al., 2020	

Onde: **LC:** Cromatografia líquida; **UHPLC:** Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência; **HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; **DAD, PDA:** Detectores com arranjo de diodo; **UV:** Detector espectrofotométrico; **MS:** Espectrometria de massas; **QqQ:** Espectrometria de massas triplo quadrupolo; **HCOOH:** ácido metanoico; **MeCN:** acetonitrila; **MeOH:** metanol; **H₂O:** água; **H₃PO₄:** ácido fosfórico; **ACN:** acetonitrila; **THF:** tetraidrofurano.

Realizando uma análise em conjunto dos trabalhos descritos na **Tabela 5**, observa-se a variedade de amostras com o emprego de diferentes espécies de *Passiflora* para a validação do método, desde partes da planta como folhas, cascas, partes aéreas até tinturas e formulações, como nanopartículas carregadas com o extrato a soluções e cápsulas comerciais. Dentre as espécies trabalhadas, *P. edulis* e *P. incarnata* são as mais relatadas, porém pesquisas como Gomes (2017) e Sepúlveda (2018) ampliam a análise para uma variedade maior de espécies, diferindo dos 4 artigos que abordam apenas 1 espécie do gênero *Passiflora*. No quesito das diferentes técnicas de CL que foram validadas, UHPLC e HPLC foram as duas investigadas, com detectores do tipo DAD ou MS. Quanto aos parâmetros para a validação da metodologia analítica, todos colocaram em prática avaliação da linearidade, além de exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, seletividade, dentre outros. Com relação às SQRs, apenas uma publicação utiliza somente um flavonoide como padrão, sendo o estudo de Sepúlveda e colaboradores (2018) com a vitexina, os demais investigam com mais de uma substância como padrão, sendo relatadas: isovitexina, vitexina, isoorientina, orientina, rutina, entre outras.

A pesquisa desenvolvida por Bilia e colaboradores (2002), analisou a estabilidade de constituintes presentes em tinturas de três gêneros de plantas diferentes, sendo uma delas do gênero *Passiflora*, representada por *P. incarnata* nessa investigação, destaque dessa revisão. O estudo cromatográfico foi realizado a partir de CLAE-UV e CLAE-EM. Especificamente a *Passiflora*, seu cromatograma evidenciou 7 picos diferentes, sendo homoorientina, vitexina, isovitexina, 6,8-di-C-glucosylapigenin, isoschaftosídeo, schaftosídeo, isovitexin-2''-O-glucoside. O método de gradiente teve duração total de 40 minutos, como observa-se na **Figura 17**. Destaca-se que visivelmente não houve uma resolução satisfatória entre os picos, porém, os autores mesmo assim efetuaram a validação do método para quantificação das substâncias. Os resultados da quantificação de flavonoides com as duas tinturas de *Passiflora* a 40% (v/v) e 60% (v/v), com os estudos de degradação e o tempo que as tinturas ficaram armazenadas, em ambas, o flavonoide que apresentou maior variação percentual de queda na concentração da amostra foi isovitexin-2''-glucoside, na tintura a 60% teve uma queda de 16%, e na de 40% variou 36,6% em 6 meses. Já o isoschaftosídeo/schaftosídeo, foram os com menores variações durante um semestre de armazenamento, em que a tintura de 60%, foi de 2% e em 40% de 3,8%.

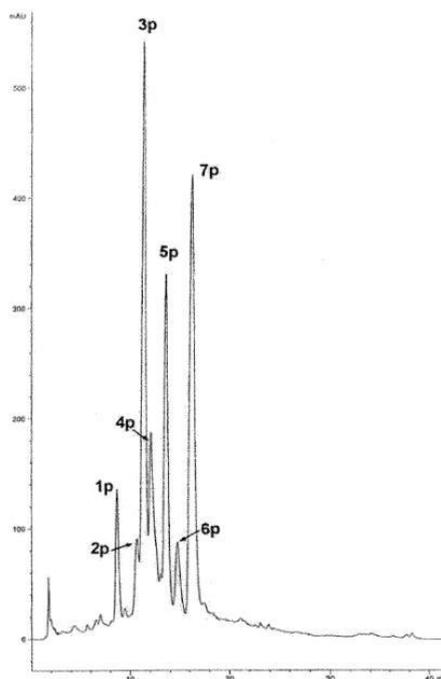


Figura 17 – Cromatograma da tintura de *Passiflora incarnata* (60% v/v) com atribuições de CLAE-UV-EM para detecção dos componentes. Os picos representados são: 6,8-di-C-glucosylapigenin (1p), isoschaftosídeo(2p), schaftosídeo (3p), homoorientina (4p), isovitexin-2''-O-glucoside (5p), vitexina (6p) e isovitexina (7p). Detecção em 350 nm. **Fonte:** Adaptado de Bilia (2002).

A determinação de flavonoides em *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. caerulea* por HPTLC foi comparada a um método de HPLC por Pereira e colaboradores (2004), nessa pesquisa foram validados os dois métodos analíticos. Especificamente para o método utilizado de CLAE-UV, a corrida cromatográfica teve um tempo de 50 minutos, empregando a rutina como padrão quantitativo que foi o marcador químico a ser comparado com vitexina, isoorientina e orientina. Todos os padrões analíticos relatados na validação do método apresentaram uma linearidade com valor de $R \geq 0,999$, os cromatogramas das quatro espécies investigadas podem ser observados na **Figura 18**. Os resultados obtidos para o conteúdo total de flavonoides nos extratos secos mostraram que *P. caerulea* apresentou a maior concentração de todos os padrões avaliados com $16,00 \pm 1,63$, $16,03 \pm 1,63$, $15,90 \pm 1,63$, $15,94 \pm 1,63$ mg/g de rutina, vitexina, isoorientina e orientina, respectivamente, sendo *P. alata* e *P. edulis* com as menores taxas de concentração desses flavonoides. Já, para o extrato aquoso, *P. alata* e *P. edulis* apresentaram maior concentração de rutina, sendo, respectivamente, $19,81 \pm 0,11$ e $28,80 \pm 0,10$ mg/g.

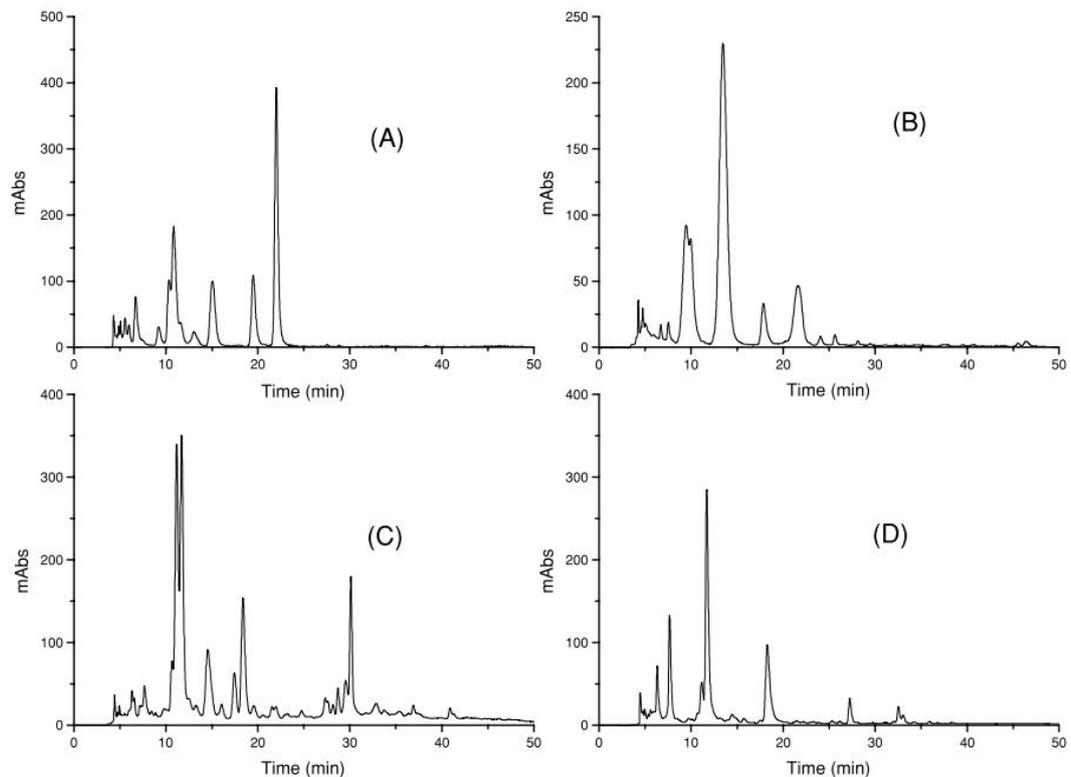


Figura 18: Cromatogramas de CLAE-UV/DAD de extratos contendo flavonoides. *P. incarnata* (A) *P. alata* (B) *P. caerulea* (C) e *P. edulis* (D). Detecção a 337 nm. **Fonte:** PEREIRA et al., 2004.

Zeraik e Yariwake (2010) quantificaram isoorientina e flavonoides totais em diferentes pospas de frutos de *Passiflora edulis*, esse procedimento foi realizado por CLAE-UV/DAD. Foi utilizada a rotina para a determinação de flavonoides totais e a isoorientina, para uma técnica mais específica. Na **Figura 19** é possível observar que o tempo de corrida empregado foi de 30 minutos, sendo que um dos picos identificados além de isoorientina, foi isovitexina, porém para a validação a isoorientina foi a escolhida, já que a isovitexina não apresentou uma separação cromatográfica efetiva e não está dentre os maiores picos do cromatograma da amostra. A quantificação de flavonoides totais na polpa de *P. edulis* resultou em $158,037 \pm 0,0602$ mg/L expressos em rutina e $16,226 \pm 0,050$ mg/L de isoorientina.

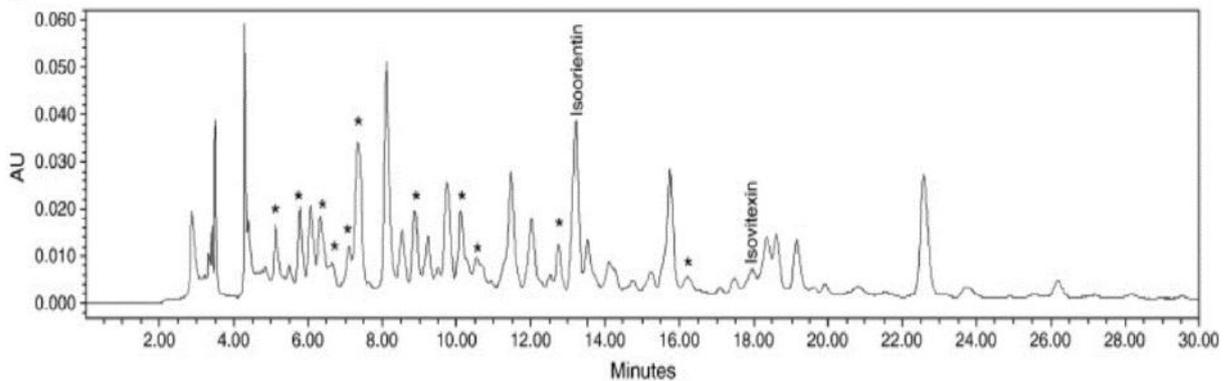


Figura 19 – Cromatograma CLAE-UV/DAD de extrato de polpa de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. Detecção em 330 nm. **Fonte:** Adaptado de ZERAIK; YARIWAKE, 2010.

Avula e colaboradores (2012) desenvolveram um método rápido de CLUE para análise simultânea de cinco alcaloides indólicos e quatro flavonoides em partes aéreas de seis diferentes espécies de *Passiflora* e em suplementos alimentares. O tempo de corrida do método analítico total foi de 10 minutos. O método foi validado para determinação em conjunto dos alcaloides e flavonoides relatados, sendo os flavonoides detectados orientina, isorientina, vitexina e isovitexina. Puderam concluir que o método novo de CLUE é capaz de fornecer rapidamente tempos de retenção, mantendo uma resolução melhor do que do CLAE convencional. Todos os flavonoides foram detectados nas amostras de *P. incarnata*, *P. edulis*, *P. violácea* e *P. morifolia* e em três suplementos dietéticos estudados. É possível observar o perfil do cromatograma das amostras na **Figura 20**. Com esse método, os flavonoides orientina, isorientina, vitexina e isovitexina foram detectados nas amostras de *P. incarnata*, *P. morifolia*, *P. violácea*, *P. edulis* e em três suplementos alimentares contendo *Passiflora*, porém não foram identificados em um dos produtos comerciais de *P. suberosa* e *P. quadrangulares*. Dentre as diversas espécies de *Passiflora* investigadas, orientina foi detectada em uma faixa de concentração de 0,004-0,18% e a isorientina na faixa de 0,004-0,34%. Em todas as espécies de *Passiflora* vitexina foi detectada na faixa de 0,02-0,13%, ficando abaixo do limite de quantificação em *P. edulis*, já a isovitexina esteve presente, quando identificada, em níveis entre 0,035-0,67%. Isoorientina e isovitexina foram os principais marcadores de *P. edulis*, enquanto orientina e isovitexina foram os maiores em *P. violácea* e vitexina e isovitexina foram majoritários em *P. morifolia*.

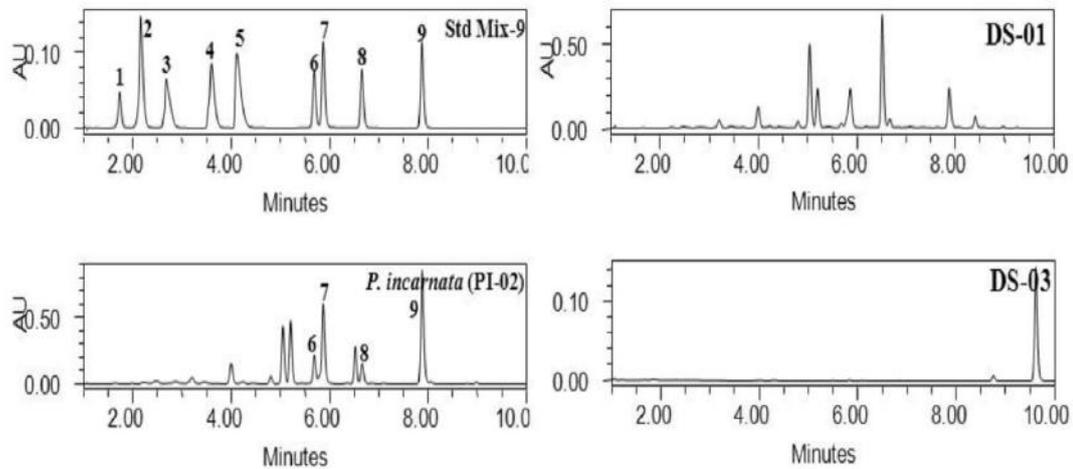


Figura 20: Cromatogramas CLAE da mistura de padrões (esquerda superior), *P. incarnata* (esquerda inferior), e suplementos alimentares (DS-01 e DS-03). Os flavonoides representados por orientina (6), isoorientina (7), vitexina (8) e isovitexina (9). Detecção em 340 nm. **Fonte:** AVULA et al., 2012.

Gomes e colaboradores (2017) exploraram um delineamento Box-Behnken para extração acelerada por solvente de compostos fenólicos e um método CLAE-UV para quantificação de flavonoides em dezessete espécies de *Passiflora*. Esses metabólitos secundários que foram quantificados são isoorientina, orientina, vitexina e isovitexina em uma análise cromatográfica de 30 minutos. A linearidade com coeficiente de correlação foi calculada com curvas de calibração, que resultou em um $R^2 > 0,99$ para todos os flavonoides estudados. É possível observar o perfil cromatográfico e dos picos dos flavonoides em uma amostra de extrato hidroetanólico de *P. edulis f. flavicarpa* na **Figura 21**. O método validado de CLAE-UV possibilitou verificar que a isoorientina apresentou maior concentração em *P. edulis f. flavicarpa* e menor concentração na *P. edulis f. edulis*. Orientina foi encontrada como majoritária em *P. morifolia* e minoritária em *P. malacophylla*. Apenas *P. setacea* apresentou vitexina em níveis vestigiais e apenas duas espécies apresentaram quantificação de rutina, com maior concentração em *P. galbana*. A isovitexina esteve presente em todas as espécies de *Passiflora* estudadas e em suas maiores concentrações. Já para as maiores concentrações de todos os flavonoides C-glicosilados dessa investigação, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edulis f. edulis* e *P. setacea* foram as que apresentaram as maiores quantidades.

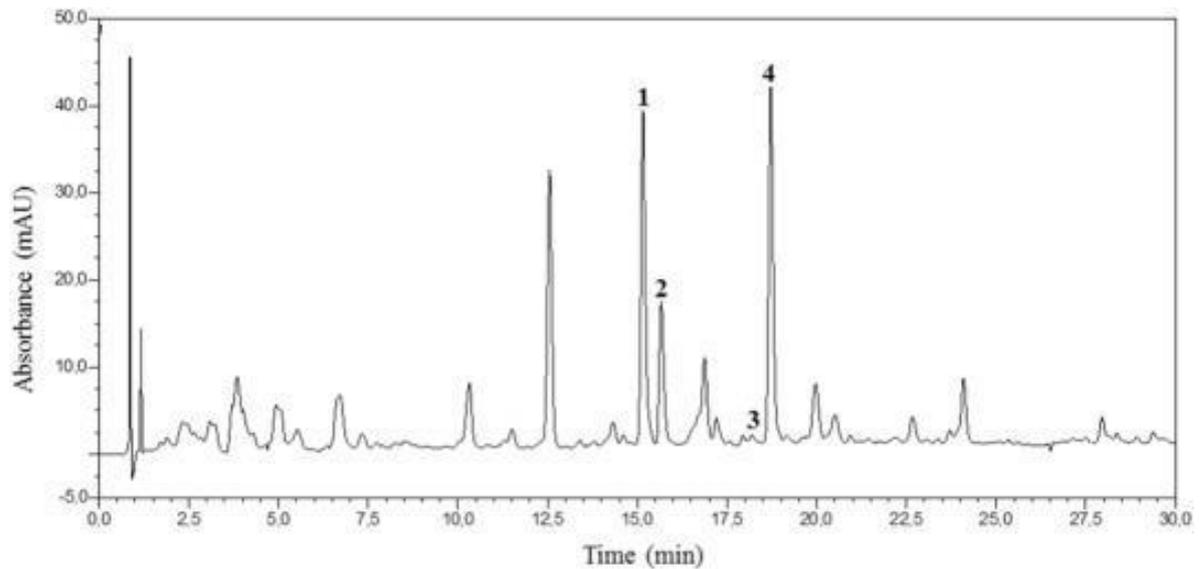


Figura 21: Cromatograma de CLAE do extrato hidroetanólico de *P. edulis f. flavicarpa*, sendo os picos isorientina (1), orientina (2), vitexina (3) e isovitexina (4). Detecção em 337 nm. **Fonte:** GOMES et al., 2017.

Um estudo comparativo com diferentes métodos de extração foi realizado por Echeverry e colaboradores (2018), analisando a otimização da extração de flavonoides de folhas de *P. quadrangulares*, avaliando também sua atividade sedativa e o potencial de estabilidade quando submetida a condições de estresse. Com relação a determinação do conteúdo total de flavonoides, esses e os produtos provenientes da degradação foram quantificados pelo método CLAE-UV, com as especificações na tabela acima, com o tempo de corrida de 20 minutos. Os resultados obtidos com essa pesquisa mostram que em todos os extratos hidroetanólicos, o teor de flavonoides é maior do que no aquoso, sendo a orientina não detectada apenas no extrato aquoso. O principal marcador químico de todos os extratos foi a vitexina 2''- O -xilósídeo, como pode observar na **Figura 22** seu pico sendo o majoritário. A relação da massa de vitexina no extrato seco teve aumento no rendimento do extrato aquoso ($55,10 \pm 1,12$ mg/g) em relação ao extrato hidroalcolico otimizado ($65,29 \pm 2,08$ mg/g), de 2,1% para 38%.

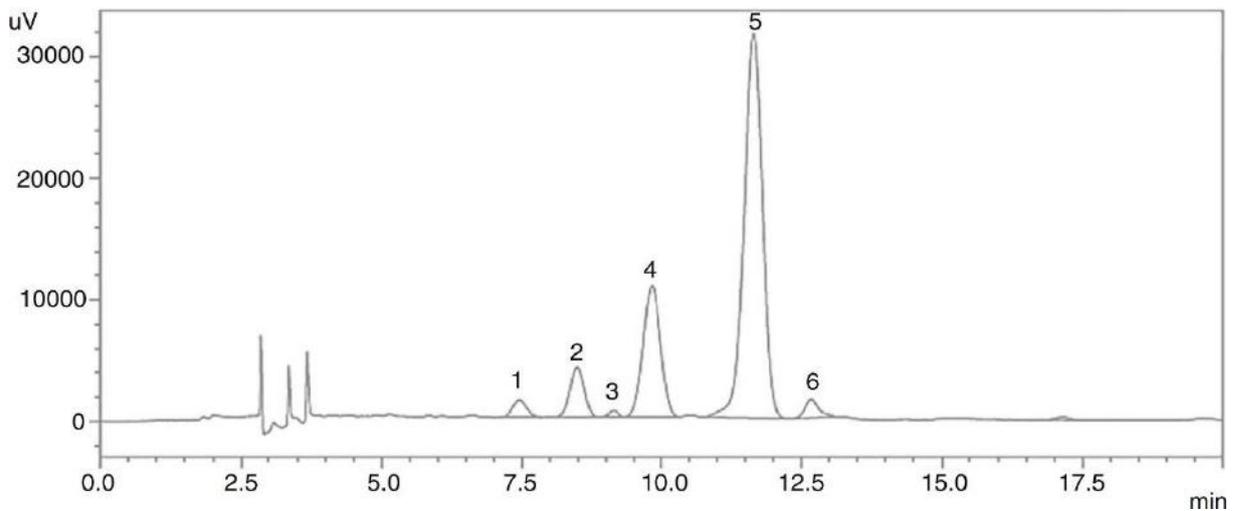


Figura 22 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora quadrangularis*. (1). orientin-2"-O -glucosídeo, (2) orientin-2"- O -xilósídeo, (3) orientina, (4) vitexina-2"- O -glicosídeo, (5) vitexina-2"- O -xilósídeo, (6) vitexina. Detecção a 340 nm. **Fonte:** ECHEVERRY et al., 2018.

No estudo desenvolvido por Sepúlveda e colaboradores (2018), foi determinado o conteúdo do flavonoide vitexina em algumas espécies de *Passiflora* com origem da Colômbia Andina e em produtos comerciais que obtenham alguma das espécies em sua composição. A fim de avaliar a vitexina como um potencial marcador químico, essas amostras foram submetidas a uma análise por UHPLC, relatando a dificuldade de desenvolver um método analítico que seja aplicável a diferentes extratos de *Passiflora* devido a complexidade de marcadores químicos que as plantas desse gênero apresentam. O método foi baseado em uma corrida cromatográfica de 10 minutos, obtendo um R^2 que representa uma boa correlação entre a resposta e a concentração do flavonoide investigado. Os cromatogramas dos extratos e produtos analisados nessa pesquisa, podem ser observados na **Figura 23**. Na pesquisa, a vitexina foi detectada nos extratos de folhas de *P. edulis* var *edulis*, *P. tripartita* var *mollissima*, *P. mixta*, *P. edulis* var *flavicarpa*, *P. tarminiana* and *P. tripartita* var. *tripartita*, sendo as espécies com concentrações acima dos limites de quantificação: *P. edulis* var *edulis* ($0,3 \pm 0,0$ mg/g), *P. tripartita* var *molíssima* ($2,49 \pm 0,2$ mg/g), e a maior concentração em *P. mixta* ($4,58 \pm 1,23$ mg/g). *P. cumbalensis*, *P. ligularis*, *P. quadrangulares* e *P. alata* não houve detecção desse marcador químico. Com relação aos fitoterápicos que foram avaliados, gotas de extrato hidroalcoólico de *P. molíssima* apresentou $24,20 \pm 1,00$ µg/mL, cápsulas de extrato etanólico de *P. molíssima* que apresentou a menor concentração representada por $3,03 \pm 0,18$ µg/mL. As outras duas formulações gotas de *P. molíssima* sem especificação do tipo do extrato apresentaram a maior concentração de vitexina, sendo $39,50 \pm 1,94$ e $55,60 \pm 3,04$ µg/mL. Os produtos referentes a gotas com extrato de *P. incarnata* não foi detectada vitexina.

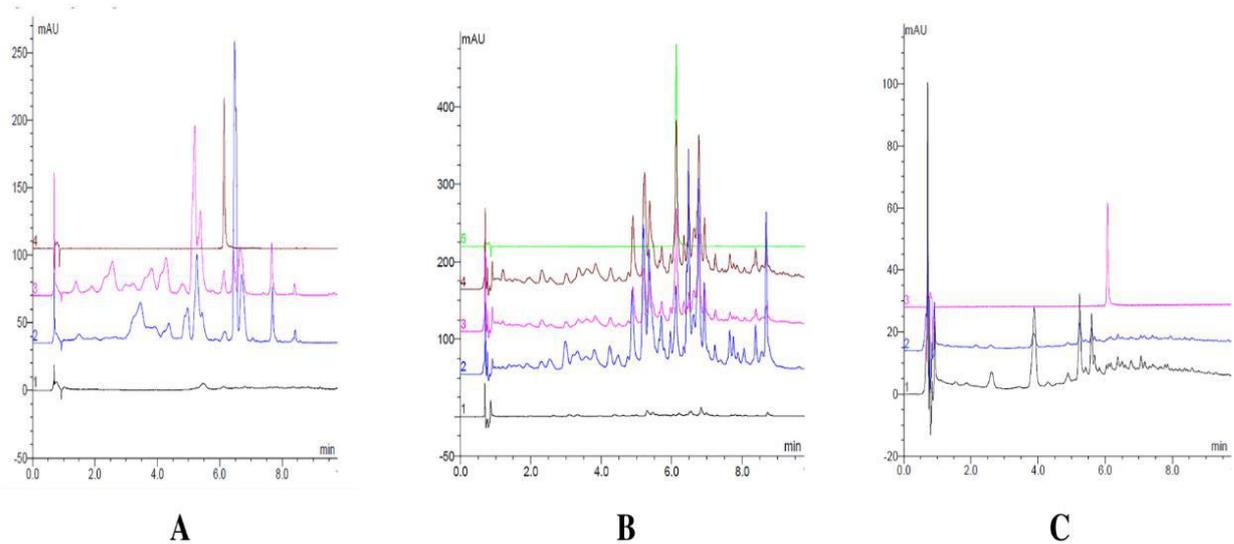


Figura 23: Cromatogramas de Extrato bruto de espécies de *Passiflora* com quantificação de vitexina. *P. edulis* var *edulis* (Preto), *P. tripartita* vai *molíssima* (Azul), *P. mixta* (Rosa), Padrão Vitexina (Marrom). Detecção: 340 nm. **(A)** Produtos provenientes de *Passiflora molíssima*. A-2 (Preto) A-1 (Azul) B-1 (Rosa) B-2 (Marrom) Padrão Vitexina (Verde). Detecção: 340 nm. **(B)** Produtos com *P. incarnata*. C-1 (preto) C-2 (azul) Padrão vitexina (rosa). Detecção: 340 nm. **(C)**. **Fonte:** SEPÚLVEDA et al., 2018.

Alves e colaboradores (2020) realizou uma investigação dos efeitos antidepressivos e de biocompatibilidade em camundongos, utilizando nanopartículas de Eudragit carregadas com extrato de *P. edulis* f. *flavicarpa* preparado e caracterizado pelo grupo de pesquisa. Primeiramente, a partir da técnica de CLAE-EM/EM, realizou uma triagem do extrato de *P. edulis* com os padrões mencionados na **Tabela 5**, comparando os espectros de massas e os tempos de retenção dos picos, confirmou a identificação de cinco flavonoides: vicentina-2, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina (**Figura 24A**). Dentre os flavonoides que foram utilizados como padrões, orientina e isoorientina são provenientes do isolamento de folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, e vicentina-2 também foi isolada da mesma espécie. O extrato foi encapsulado em nanopartículas e a análise deste produto foi feita por CLUE-UV (**Figura 24B**). Importante destacar que o tempo de corrida foi de 50 minutos. A quantificação do extrato mostrou uma massa de 5,20, 0,59, 2,08, 0,20 e 0,96 mg/g de vicentina-2, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, respectivamente.

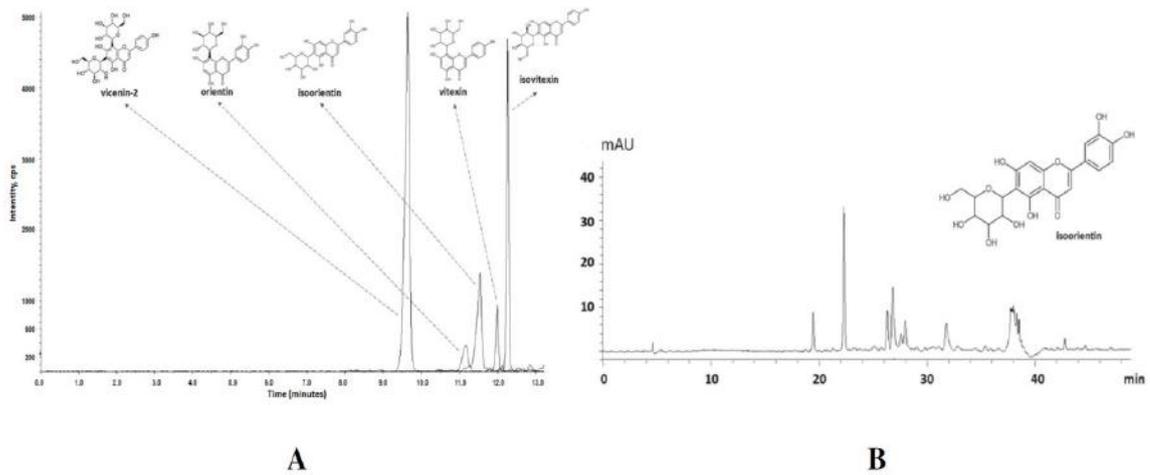


Figura 24: Cromatograma CLAE-EM/EM de extrato de folha de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Compostos: vicenina-2 (1; Rt 9,8 min); orientina (2; Rt 11,3 min); isoorientina (3; Rt 11,5 min); vitexina (1; Rt 11,9 min) e isovitexina (1; Rt 12,3 min) (A). Cromatograma CLUE-UV-DAD do extrato de folha de *Passiflora edulis f. flavicarpa*., composto de isoorientina (1; R t 26,7 min) (B). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2022) Adaptado de ALVES et al., 2020.

Um método analítico sustentável e verde foi desenvolvido e aplicado por Da Silva Francischini e colaboradores (2020) para a extração de flavonoides em resíduos de *Passiflora edulis*. Nesse estudo três diferentes técnicas de extração foram realizadas e comparadas para a quantificação de flavonoides por CLUE-UV. As diferentes técnicas de extração foram por homogeneização assistida (HAE), assistida por ultrassom (UAE) e assistida por micro-ondas (MAE), cada uma representada por um cromatograma na **Figura 25**. O tempo total empregado na corrida cromatográfica foi de 25 minutos. Os três flavonoides determinados foram orientina, isoorientina e isovitexina, e comparando os resultados quantitativos das três metodologias para extração, HAE apresentou o melhor rendimento de extração atrelado ao menor consumo de energia. Os resultados obtidos na extração UAE foram 0,70, 0,68 e 0,17 mg/g, para MAE foram 0,82, 0,94 e 0,34 mg/g, enquanto que em HAE, orientina, isoorientina, isovitexina, apresentaram, respectivamente, 0,94, 1,11 e 0,34 mg/g na amostra analisada.

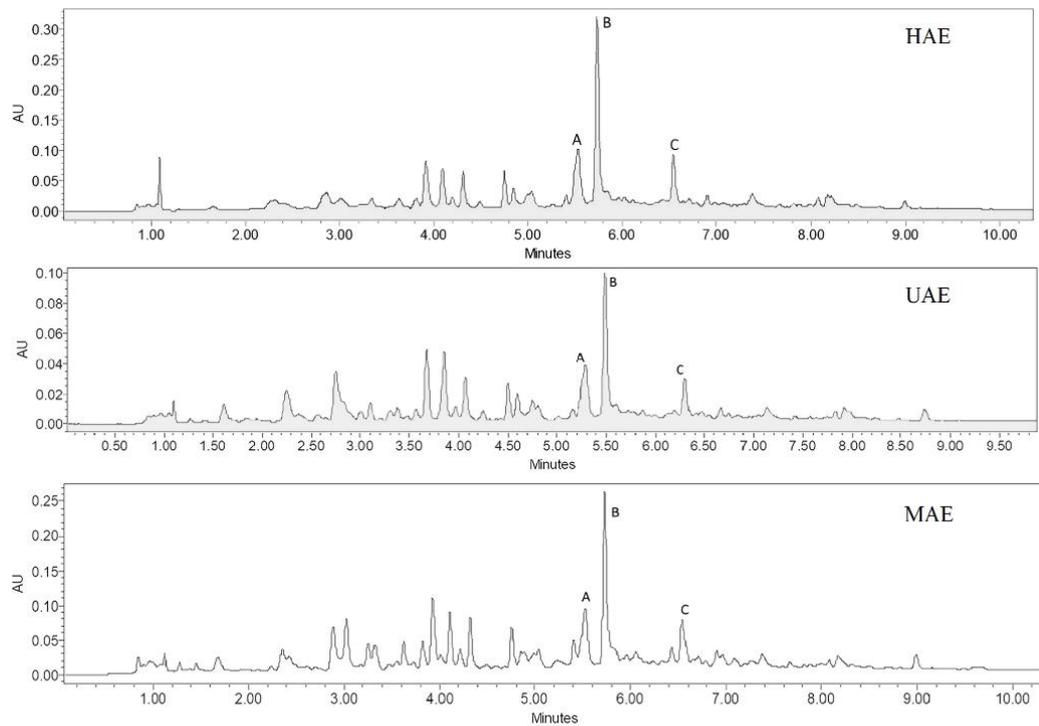


Figura 25: Representação dos cromatogramas por análise CLUE-UV dos três diferentes métodos de extração (HAE, UAE e MAE) empregados com a espécie *P. edulis*. (A) orientina, (B) isoorientina e (C) isovitexina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022) adaptado de Da Silva Francischini (2020).

Da Silva e colaboradores (2020) avaliaram o potencial antioxidante e a capacidade fotoprotetora dos extratos metanólicos e glicólicos das folhas de *P. coccínea* para a aplicação em cosméticos. Entre os flavonoides escolhidos como SQRs nessa pesquisa, foi realizada a identificação de isovitexina, vitexina e 2''-O-β-Dglucopyranosyl-vitexin, esse último proveniente do isolamento de *Alternanthera tenella* (Colla), nos diferentes tipos de extratos (**Figura 26A e 26B**). Apesar dos três flavonoides identificados, um método de CLAE-UV foi validado no estudo para a quantificação apenas de isovitexina com o objetivo de comparar os dois tipos de extratos da planta, se a concentração desse marcador químico indica a variação da atividade antioxidante entre os dois tipos de extrato. Relatam que o pico da isovitexina apresentou uma resolução suficiente maior que 1,5, em uma corrida de 40 minutos, como é possível observar os cromatogramas com pico de isovitexina na **Figura 26C e 26D**. Nesse estudo foi possível quantificar a isovitexina em ambos os extratos, obtendo $2,28 \pm 0,06$ mg/g no extrato metanólico obtido por UAE, enquanto que no extrato glicólico obtido por maceração foi de $0,18 \pm 0,01$ mg/g.

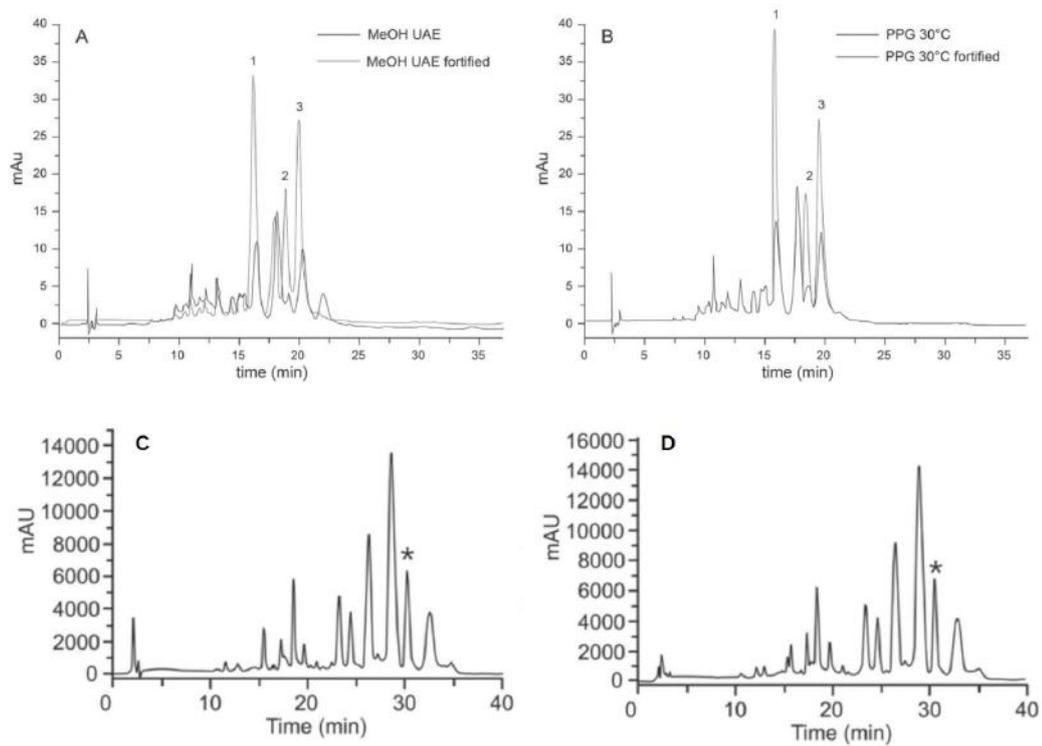
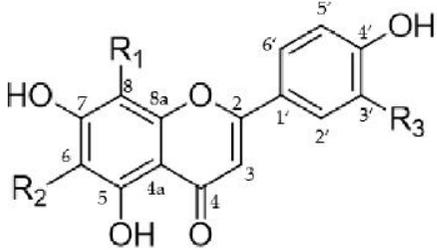
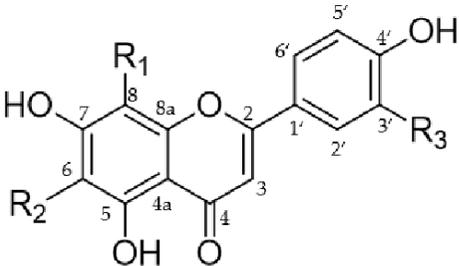


Figura 26: Cromatogramas identificando os três flavonoides em *P. coccinea*, sendo os picos 2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina (1), vitexina (2) e isovitexina (3) do extrato metanólico (A) e extrato glicólico (B). Cromatogramas do extrato metanólico (C) e extrato glicólico (D) com o pico de isovitexina marcado com (*). Detecção em 330 nm. **Fonte:** Adaptado de DA SILVA; SALVADOR; BOTTOLI, 2020.

Complementarmente aos resultados obtidos para os 10 artigos que identificaram, quantificaram e validaram um método cromatográfico para flavonoides em amostras contendo *Passiflora*, foi construída a **Tabela 6** com estrutura química, tempo de retenção, tempo de análise da corrida, comprimento de onda máximo a partir do espectro de UV, íons majoritários obtidos por EM da isovitexina, vitexina, isoorientina, orientina, isoschaftosídeo e schaftosídeo.

Tabela 6 – Levantamento da literatura do tempo de retenção, comprimento de onda máximo e íons majoritários dos principais flavonoides presentes em espécies de *Passiflora*.

Flavonoide	Estrutura Química	Tempo de Retenção (min)	Tempo de Análise (min)	Comprimento de onda máximo (λ máx., nm)	Íons majoritários	Referência
Isovitexina	 <p>R₁ = glicose R₂ = H R₃ = H</p>	24,893	60	269,8; 337,7	433,1 [M+H] ⁺ 455,1 [M+Na] ⁺ 415,1 [M+H-H ₂ O] ⁺ 313 [M+H-120] ⁺ 283,1 [M+H-120-CH ₂ O] ⁺	TREMMELE; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;
Vitexina	 <p>R₁ = H R₂ = glicose R₃ = H</p>	24,092	60	268,6; 300,0; 337,7	433,1 [M+H] ⁺ 313 [M+H-120] ⁺	TREMMELE; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;

Isoorientina		19,575	60	257,9; 269,8; 350,9	449,1 [M+H] ⁺ 471,1 [M+Na] ⁺ 431,1 [M+H-H ₂ O] ⁺ 329 [M+H-120] ⁺ 299,1 [M+H-120- CH ₂ O] ⁺	TREMMELE; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;
Orientina		20,620	60	255,5; 267,4; 300,0; 349,7	449,1 [M+H] ⁺ 329 [M+H-120] ⁺	TREMMELE; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;

R₁ = glucose
R₂ = H
R₃ = OH

R₁ = H
R₂ = glucose
R₃ = OH

Isoschaftosídeo		18,106	60	271,0; 341,3	565.2 [M+H] ⁺ 587.3 [M+Na] ⁺ 547.4 [M+H-H ₂ O] ⁺ 475.2 [M+H-90] ⁺ 445.0 [M+H-120] ⁺	TREMMEL; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;	
R ₁ = ramnose R ₂ = glicose R ₃ = H	Schaftosídeo		18,766	60	271,0; 336,5	565.2 [M+H] ⁺ 587.2 [M+Na] ⁺ 547.4 [M+H-H ₂ O] ⁺ 475.2 [M+H-90] ⁺ 445.0 [M+H-120] ⁺ 409.1 [M+H-120-2H ₂ O] ⁺	TREMMEL; PAETZ; HEILMANN, 2021; ARGENTIERI et al., 2015; AVULA et al., 2012;
R ₁ = glicose R ₂ = ramnose R ₃ = H							

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho realizou uma revisão de escopo para mapear as evidências científicas que descrevem a utilização de técnicas analíticas para identificação e quantificação de flavonoides em produtos contendo espécies de *Passiflora*.

A revisão respondeu ao questionamento proposto “Quais são as técnicas analíticas de determinação de flavonoides, métodos validados e quais são os marcadores químicos avaliados em produtos contendo espécies do gênero *Passiflora*?”. Destaca-se que para isso empregou uma metodologia reprodutível e sistematizada de forma a buscar evidências científicas em diferentes bases de dados, abrangendo uma busca nacional e internacional de artigos, dos quais apenas foram selecionados os revisados por pares. O processo de seleção dos artigos ocorreu de forma satisfatória, com aplicação de critérios de inclusão e exclusão e utilização de um software de gerenciamento, resultando em 91 artigos condizentes com os objetivos desse estudo, que possibilitaram a extração e visualização de dados relevantes para a presente revisão.

Através do mapeamento dos resultados desta revisão, pôde-se observar que as espécies mais estudadas do gênero *Passiflora* no mundo são *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, mas apesar disso é significativa a quantidade de pesquisas com outras espécies do gênero. Com relação aos flavonoides relatados, isovitexina e vitexina são os mais relatados, aparecendo em quase metade dos artigos, sendo a maioria para investigações quali e quantitativas, desde a identificação a quantificação desses marcadores químicos. Portanto, pesquisadores utilizam de técnicas cromatográficas e espectrais para conseguirem atingir os objetivos das suas investigações. Dentro da quantidade de estudos que empregaram alguma análise cromatográfica, 80 relatam terem utilizado um tipo de cromatografia líquida.

O grande destaque desse levantamento é que grande parte dos pesquisadores destes trabalhos realizam as análises cromatográficas e empregam o ensaio de linearidade para a quantificação dos flavonoides em amostras contendo *Passiflora*, porém não validaram por completo o método. Sendo evidenciado no presente estudo, apenas 10 artigos que apresentam a validação de método analítico em suas pesquisas.

Conclui-se que apesar de muitos estudos avaliarem o teor de flavonoides em diversas amostras de *Passiflora*, muitas vezes a sua quantificação ocorre de forma não totalmente adequada conforme a legislação pertinente exige.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, n. 2, p. 81–91, 2002.

AKHONDZADEH, S. et al. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, n. 5, p. 363–367, 2001.

ALVES, J. S. F. et al. In vivo antidepressant effect of *Passiflora edulis f. flavicarpa* into cationic nanoparticles: Improving bioactivity and safety. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 4, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha de Orientações Sobre o Uso de Fitoterápicos e Plantas Medicinais**. Brasília, 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**. Brasília, 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira (2021). Formulário de Fitoterápicos Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa 2ª EDIÇÃO**. 2021.

APPEL, K. et al. Modulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 838–843, 2011.

ARGENTIERI, M. P. et al. Phytochemical analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 1603–1612, 2015.

AROMATARIS, E.; RIITANO, D. Systematic Reviews: Constructing a Search Strategy and Searching for Evidence. **AJN The American Journal of Nursing**, v. 114, n. 5, p. 49–56, maio 2014.

AVULA, B. et al. Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids from aerial parts of *Passiflora* species and dietary supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 9, p. 1177–1180, 2012.

AYANOGLU, E. et al. O-glycosylated C-glycosylflavones from *Passiflora platyloba*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 799–801, 1982.

AYRES, A. S. F. S. J. et al. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 499–505, 2015.

AYRES, A. S. F. S. J. et al. Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *edulis*. **Neuroscience Letters**, v. 660, p. 79–85, 2017.

BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seeds combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1595, p. 144–157, 2019.

BANDARA, K. R. V.; PADUMADASA, C.; PEIRIS, D. C. Potent antibacterial, antioxidant and toxic activities of extracts from *Passiflora suberosa* L. leaves. **PeerJ – the Journal of Life and Environment**, v. 2018, n. 5, 2018.

BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos. **Revista Fitos**. V. 1, n. 1, p. 14-17, 2005.

BILIA, A. R. et al. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 613–624, 2002.

BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E. Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. 47, 2020.

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 Métodos Analíticos**. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. **Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus — Português (Brasil).** 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 971, de 03 de maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 03 maio. 2006a.

BRAVO, K. et al. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 168, p. 78–88, 2017.

CABRAL, B. et al. Cardiovascular effects induced by fruit peels from *Passiflora edulis* in hypertensive rats and fingerprint analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. **Planta medica**, ago. 2021.

CABRAL, B. et al. Hypoglycemic and vasorelaxant effect of *Passiflora edulis* fruit peel by-product. **Plant foods for human nutrition** (Dordrecht, Netherlands), set. 2021.

CARMONA-HERNANDEZ, J. C. et al. Polyphenol extracts from three colombian *Passifloras* (passion fruits) prevent inflammation-induced barrier dysfunction of Caco-2 cells. **Molecules**, v. 24, n. 24, 2019.

CARVALHO, M. J. DE et al. Estudo farmacognóstico e atividade *in vitro* sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae) TT - Pharmacognostic study and *in vitro* activity on blood coagulation and platelet aggregation of leav. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 199–206, 2010.

CASTELLANOS, L. et al. Metabolic fingerprinting of banana passion fruits and its correlation with quorum quenching activity. **Phytochemistry**, v. 172, 2020.

CECHINEL-ZANCHETT, Camile C. Legislação e controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos nospaíses do Mercosul. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**. Conselho Federal de Farmácia. v. 28, n. 3, 2016.

CHABARIBERI, R. D. A. O. et al. Spectrometric determination of flavonoids from *Maytenus* (Celastraceae) and *Passiflora* (Passifloraceae) leaves and comparison with an HPLC-UV method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 860–864, 2009.

CHAGAS, M. B. et al. Bioinspired oxidation in cytochrome P450 of isomers orientin and isoorientin using Salen complexes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. S3, 2020.

CORDEIRO, L.; SOARES, C. B. Revisão de escopo: potencialidades para a síntese de metodologias utilizadas em pesquisa primária qualitativa. **BIS. Boletim do Instituto de Saúde**, v. 20, n. 2, p. 37–43, 2019.

COSTA, A. R. T. et al. Dissolution test of herbal medicines containing *Passiflora* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 525–531, 2011.

COSTA, G. M. et al. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 451–458, 2016.

COSTA, G. M. et al. Isolation of C-glycosylflavonoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences**, v. 990, p. 104–110, 2015.

DA SILVA FRANCISCHINI, D. et al. Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from *Passiflora* waste. **BMC Chemistry**, v. 14, n. 1, 2020.

DA SILVA, I. C. V. et al. Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an enriched flavonoid extract from *Passiflora mucronata*. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 1405–1416, 2018.

DE ARAUJO, M. H. et al. Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian restinga. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 6, p. 702–710, nov. 2017.

DE CARVALHO, M. V. O.; DE OLIVEIRA, L. D. L.; COSTA, A. M. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. **Food Chemistry**, v. 266, p. 350–358, 2018.

DE LAVOR, É. M. et al. Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytomedicine**, v. 47, p. 58–68, 2018.

DE SOUZA, C. G. et al. Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 4, p. 1362–1368, 2018.

DE-PARIS, F. et al. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5–8, 2002.

DONG, M. W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.

DOS REIS, L. C. R. et al. Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2679–2691, 2018.

DOS REIS, L. C. R. et al. Stability of functional compounds and antioxidant activity of fresh and pasteurized orange passion fruit (*Passiflora caerulea*) during cold storage. **Food Research International**, v. 106, p. 481–486, 2018.

DOS SANTOS, K. C. et al. *Passiflora actinia* hydroalcoholic extract and its major constituent, isovitexin, are neuroprotective against glutamate-induced cell damage in mice hippocampal slices. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 282–291, 2016.

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. 49, n. 4, p. 565–573, 2006.

ECHEVERRY, S. M. et al. Optimization of flavonoid extraction from *Passiflora quadrangularis* leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 610–617, out. 2018.

ELSAS, S.-M. et al. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 940–949, 2010.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 1 maio 2019.

FERRERES, F. et al. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10187–10193, 2007.

FONSECA, L. R. DA et al. Herbal medicinal products from *Passiflora* for anxiety: an unexploited potential. **The Scientific World Journal**, v. 2020, p. e6598434, 20 jul. 2020.

FREITAS, M. S. M. et al. Flavonoids and mineral composition the leaf in yellow passion fruit plant in function of leaves at positions in the branch. **Ciencia Rural**, v. 37, n. 6, p. 1634–1639, 2007.

GARCIA, Eloi S. Biodiversidade, biotecnologia e saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, p. 495–500, Set 1995.

GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

GRUNDMANN, O. et al. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Medica**, v. 74, n. 15, p. 1769–1773, 2008.

GUSEINOV, M. D., BOBKOVA, N. V., SVISTUNOV, A. A., TARASOV, V. V., BOKOV, D. O., SERGUNOVA, E. V., KOVALEVA, T. Y. (2019). Flavonoids in *Passiflora incarnata* L. dry extract of Russian Origin. **Pharmacognosy Journal**, 11, 5, 1143-1147, 2019.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Pharmazie**, v. 58, n. 12, p. 881–885, 2003.

JÚNIOR, C.; MELO, E. DE. Metodologias analíticas utilizadas na identificação e quantificação de compostos presentes na *Passiflora incarnata* L.: revisão de literatura. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Faculdade Maria Milza. 2020.

KONTA, E. M. et al. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in spontaneously hypertensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 1, p. 28–32, 2014.

LEAL-COSTA, Marcos V. e AMÉLIA, Renata P. Anatomia foliar de *Varronia curassavica* Jacq. (Cordiaceae). **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, 2017.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “*edulis*” and *Passiflora edulis* “*flavicarpa*”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1085–1090, 2011.

LIMA, G. P. P. et al. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1838–1843, 2008.

LOPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756–763, 2013.

MCCULLAGH, M.; PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H. Use of ion mobility mass spectrometry to enhance cumulative analytical specificity and separation to profile 6-C/8-C-glycosylflavone critical isomer pairs and known–unknowns in medicinal plants. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 424–436, 2019.

MESQUITA, L. S. S. DE. **Estudo de revisão e prospecção biotecnológica das espécies *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims**. Tese De Doutorado - Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde. Universidade Federal do Maranhão. 29 mar. 2019.

MIRODDI, M. et al. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791–804, 12 dez. 2013.

MIYASAKA, L. S.; ATALLAH, Á. N.; SOARES, B. *Passiflora* for anxiety disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2007.

MORAIS, D. R. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI (-) -MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392–399, 2015.

MOREIRA, C.; GONTIJO, C.; ALMEIDA, V. **Propriedades químicas e medicinais do maracujá**. v. 33, p. 7–13, 1 ago. 2012.

MORRONE, M. D. et al. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food And Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.

MOUČKOVÁ, K. et al. Evaluation of structurally different ionic liquid-based surfactants in a green microwave-assisted extraction for the flavonoids profile determination of *Mangifera* sp. And *Passiflora* sp. leaves from Canary Islands. **Molecules**, v. 25, n. 20, 2020.

MÜLLER, Simony Davet. **LC and UV determination of alcaloid and flavonoid *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae Extracts. 2006.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

NÁPOLES LÓPEZ, R. et al. Validation of flavonoid quantification method in *Passiflora incarnata* L. tablets. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 48, n. 1, p. 129–138, 2014.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do et al. **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos.** E-book. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. 334 p. (Estudos da Pós-Graduação).

NEGRI, G.; DE SANTI, D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024–1034, 2012.

NGUYEN, T. Y. et al. Anti-inflammatory flavonoids isolated from *Passiflora foetida*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, 2015.

OLIVEIRA, M. S.; PINHEIRO, I. O.; SILVA, F. S. B. Vermicompost and arbuscular mycorrhizal fungi: An alternative to increase foliar orientin and vitexin-2-O-ramnoside synthesis in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 754–757, 2015.

OLIVEIRA, A. R. M. **Controle de Qualidade [recurso eletrônico].** 1. Ed. Rio de Janeiro. Atheneu, 2019.

PARÉ, G.; TRUDEL, M. C.; JAANA, M.; KITSIOU, S. Synthesizing information systems knowledge: a typology of literature reviews. **Information & Management Canada**, v. 52, n. 2, p. 183-199, 2015.

PAULINO, R. R. **Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações”. Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Cromatografia Líquida, Avanços e Inovações”.** Anais... Em: RELATÓRIOS DE ESTÁGIO E MONOGRAFIA INTITULADA “CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA, AVANÇOS E INOVAÇÕES”. 30 set. 2020.

PAUTASSO, M. Ten simple rules for writing a literature review. **Plos Computational Biology**, France, v. 9, n. 7, p. e1003149, 2013.

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. 15, n. 4, p. 241–248, 2004.

PEREIRA, S. M. T. **O uso medicinal da *Passiflora incarnata* L.** Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. set. 2014.

PERES, Terezinha B. Noções básicas de cromatografia. **Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental-Instituto Biológico.** Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.227-229, jul./dez., 2002

PIETTA, P. G. et al. An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. **Chromatographia**, v. 27, n. 9–10, p. 509–512, 1989.

PIETTA, P.; MANERA, E.; CEVA, P. Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. **Journal of Chromatography A**, v. 357, n. C, p. 233–237, 1986.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.** Dissertação de mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. 2014.

POVOLERI, Enza Rafaela Demaria. **Métodos extrativos utilizados para obtenção de flavonoides de *Passiflora* spp. visando o tratamento de afecções cutâneas e cuidados com a pele: uma revisão de escopo.** 2022. 82 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2022.

QIMIN, L. et al. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 562, n. 1–2, p. 435–446, 1991.

RAFFAELLI, A. et al. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v. 777, n. 1, p. 223–231, 1997.

RAHMAN, K. et al. Isoscoparin-2''-O-glucoside from *Passiflora incarnata*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1093–1094, 1997.

RECH, Katlin S.; MOURA, Paula F.; GRIBNER, Caroline; RATTMANN, Yanna D.; MIGUEL, Obdúlio G.; GOMES, Eliane E.C.; MIGUEL, Marilis D. **Brazilian panorama about the registration and use of herbal medicines.** Universidad de Santiago de Chile. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. vol. 16, núm. 6, noviembre pp. 556-569, Santiago, Chile, 2017.

REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 69, n. 3, p. 153–158, 1994.

REIMBERG, M. C. H.; COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H. Multivariate analysis of the effects of soil parameters and environmental factors on the flavonoid content of leaves of *Passiflora incarnata* L., Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 853–859, 2009.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), 771–780, 2004.

RIBEIRO, Núbia M., NUNES, Carolina R. Análise de pigmentos em pimentões por cromatografia em papel. **Química Nova na Escola**, nº 29, agosto 2008.

ROJANO, B. A.; ACOSTA, K. Z.; CORTES CORREA, F. B. Free radical trapping capacity of *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 4, p. 408–419, 2012.

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, n. 6, p. 1219–1232, 2012.

SANTOS, A. P. M.; GALINDO, A. S.; QUEIROZ, E. DE S. Propriedades neuropsicofarmacológicas, compostos quimicamente ativos e uso medicinal da *Passiflora incarnata* / Neuropsycharmacological properties, chemically active compounds and medical use of *Passiflora incarnata*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 94823–94836, 5 dez. 2020.

SANTOS, T. R. et al. Improvement of bioactive compounds content in granadilla (*Passiflora ligularis*) seeds after solid-state fermentation. **Food science and technology international = Ciencia y tecnologia de los alimentos internacional**, v. 27, n. 3, p. 234–241, abr. 2021.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 2, p. 56–64, 2014.

SEPÚLVEDA, P. et al. Analysis of vitexin in aqueous extracts and commercial products of Andean *Passiflora* species by UHPLC-DAD. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 9, p. 081–086, 2018.

SHANMUGAM, S. et al. HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 760–771, 2019.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. The *Passiflora tripartita* (banana passion) fruit: A source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1672–1692, 2013.

SIMÕES, Cláudia M. O. e colab. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIRCILI, M. P.; TRABULSI, L. R. “Quorum sensing”: estudo do fenômeno em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) típicas e atípicas. 2004.

SOARES, A. C. F. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings | Fungos micorrízicos arbusculares e a ocorrência de flavonóides em raízes de mudas de maracujazeiro amarelo. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 331–336, 2005.

SOARES, R. D. F. et al. Development of a chitosan hydrogel containing flavonoids extracted from *Passiflora edulis* leaves and the evaluation of its antioxidant and wound healing properties for the treatment of skin lesions in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 3, p. 654–662, 2020.

SOUSA, Sandra Alves de. **Development and validation of analytical methods liquid chromatography and high performance test solution for quality assessment containing herbal cupana *Kunth paullinia***. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 2015.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SUDASINGHE, H. P.; PEIRIS, D. C. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. **PeerJ – the Journal of Life and Environment**, v. 2018, n. 2, 2018.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L. **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. v. 21, n. 1, p. 9, 2003.

TREMMEL, M., KIERMAIER, J., HEILMANN, J. *In Vitro* Metabolism of Six C-Glycosidic Flavonoids from *Passiflora incarnata* L. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, 6566, 2021.

TREMMEL, M.; PAETZ, C.; HEILMANN, J. *In Vitro* Liver Metabolism of Six Flavonoid C-Glycosides. **Molecules**, v. 26, p. 6632, 1 nov. 2021.

URREGO, N. et al. Flavonoids and saponins from *Passiflora edulis f. edulis* leaves (purple passion fruit) and its potential anti-inflammatory activity. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 73, n. 11, p. 1530–1538, out. 2021.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763–778, 16 abr. 2018.

VIEGAS, C., DA SILVA BOLZANI, V., & BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 29(2), 326–337, 2006.

WOSCH, L. et al. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: Ii. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 40–49, 2017.

ZERAIK, M. L. et al. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 541–545, 2012.

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, n. 1, p. 86–91, 2010.

ZUCOLOTTI, S. M. et al. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232–239, 2012.