



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Campus Professor Aloísio Teixeira
Curso de Farmácia



**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDE C-GLICOSILADO E
AVALIAÇÃO *in vivo* DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE FORMULAÇÃO
CONTENDO *Passiflora mucronata***

Arielly Rodrigues Ribeiro Barreto

Macaé
Julho de 2015

Arielly Rodrigues Ribeiro Barreto

Título: Isolamento e identificação de flavonoide C-glicosilado e avaliação *in vivo* da atividade cicatrizante de formulação contendo *Passiflora mucronata*.

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dra. Michelle Frazão Muzitano

Coorientador: Prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho

Macaé

Julho de 2015

*Dedico esse trabalho primeiramente
ao Senhor Jesus Cristo, a minha querida
família, a Michelle e amigos por todo
incentivo e paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo minha eterna gratidão e adoração por me permitir realizar o grande sonho de estudar em uma universidade federal, estagiar em laboratório de pesquisa, por iluminar os meus caminhos, pelos livramentos, por me fazer forte e capaz quando sou fraca e limitada. Senhor da minha vida, obrigada por me honrar na conclusão da minha primeira faculdade e permitir honrar aos meus pais com o diploma de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos meus pais e irmãos por todo amor, carinho, zelo, incentivo, paciência, dedicação que tiveram comigo durante toda a minha existência.

A minha orientadora Michelle por toda paciência, confiança, compreensão, sinceridade, atenção, apoio, incentivo e carinho comigo. Principalmente, pelo cuidado em me conceder um projeto em que eu sempre desejei trabalhar.

Ao professor Edison por me auxiliar no desenvolvimento das formulações utilizadas nesse projeto, pela orientação e por estar sempre disposto a me ajudar.

À Pollyana por todos os ensinamentos, amizade, apoio, paciência, atenção durante esses cinco anos de convivência. Principalmente, por dividir comigo uma parte da pesquisa.

A todos os professores, alunos e técnicos do grupo LaPron pelos ensinamentos e colaborações sejam de forma direta ou indiretamente. Em especial, os professores Thiago, Shaft e Denise pela dedicação em compartilhar conhecimento, paciência, apoio e ajudas; alunas Rafaela, Katherine, Isabela, Amélia, Isabel e Jéssyca.

A Renata e Mariana pela paciência, amizade, sinceridade, humildade, apoio, pelas palavras de ânimo, conselhos, atenção e “helps”. Enfim, obrigada por tornar essa caminhada mais alegre em meio aos desafios que enfrentamos.

A Nívia e Fernanda pela amizade e momentos que compartilhamos nesses cinco anos.

A todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, pela dedicação em passar conhecimento e por terem me feito aprender.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e auxiliaram para a realização desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!!
Que Deus abençoe a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação de uma pequena amostra de parte do PNRJ.....	2
Figura 2:	Distribuição geográfica do PNRJ.....	2
Figura 3:	Ilustração das flores e frutos das espécies <i>P. edulis</i> (A), <i>P. alata</i> (B) e <i>P. incarnata</i> (C).....	4
Figura 4:	Estrutura química base de núcleos das classes dos flavonoides.....	10
Figura 5:	Alguns dos flavonoides encontrados nas espécies de <i>Passiflora</i> L.....	13
Figura 6:	Estrutura química básica de alcaloides.....	16
Figura 7:	Estrutura química de alcaloides encontrados em espécies do gênero <i>Passiflora</i>	17
Figura 8:	Ilustrações da flor e do fruto da espécie <i>Passiflora mucronata</i> e do principal polinizador dessa espécie vegetal.....	18
Figura 9:	Destino de parte da massa de extrato bruto de <i>P. mucronata</i>	24
Figura 10:	Esquema da partição líquido-líquido a partir do extrato bruto de <i>P. mucronata</i>	25
Figura 11:	Coluna cromatográfica após a aplicação da amostra de fração acetato de etila.....	26
Figura 12:	Resumo esquemático de procedimentos empregados à fração acetato de etila.....	28
Figura 13:	Fórmula estrutural do polímero hidroxietilcelulose.....	30
Figura 14:	Ilustração esquemática da diluição da rutina padrão I.....	34
Figura 15:	Ilustração esquemática da diluição da rutina padrão II.....	35
Figura 16:	Estrutura básica de flavonas e flavonóis e as suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	39
Figura 17:	Estruturas químicas dos flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina, vitexina e rutina. Glu=glicose.....	39
Figura 18:	Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 µm; Nucleosil e Nucleodur®), sistema eluente em gradiente de MeOH/H ₂ O (pH 3,2 H ₂ PO ₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma e espectro de UV do composto isolado PM18 com picos de absorção no UV em 269 e 349 nm.....	41

Figura 19: Cromatograma da subfração PM23 e espectros de UV referentes aos três picos majoritários dessa mesma subfração.....	42
Figura 20: Cromatograma da solução padrão de rutina preparada na concentração de 62,5 µg/mL e seu espectro de UV com picos de absorção na faixa de 255 e 354 nm.....	42
Figura 21: Cromatograma da subfração PM28 com zoom entre os t_R 20,0 e 40,0 min.....	43
Figura 22: Espectros de UV dos picos característicos de flavonoides detectados entre os tempos de retenção 22,09 e 37,81 min.....	43
Figura 23: Cromatograma da subfração PM33 com zoom entre os t_R 21,0 e 31 min.....	44
Figura 24: Espectros de UV de quatro picos principais com comprimentos de onda característicos de flavonoides.....	44
Figura 25: Espectro de RMN de 1H a 400 MHz da amostra PM18 diluída em DMSO- d_6	46
Figura 26: Espectro de RMN 2D-HSQC da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz. Os pontos vermelhos correspondem a grupos CH e CH ₃ enquanto que os pontos azuis aos grupos CH ₂	48
Figura 27: Espectro de RMN 2D-HMBC da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz.....	49
Figura 28: Espectro de RMN 2D-COSY da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz.....	50
Figura 29: Representação estrutural da flavona isoorientina.....	50
Figura 30: Estrutura química do composto PM18 (isoorientina) isolado de <i>P. mucronata</i>	52
Figura 31: Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 µm; Nucleosil e Nucleodur®), sistema eluente em gradiente de MeOH/H ₂ O (pH 3,2 H ₂ PO ₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma do extrato bruto de <i>P. mucronata</i> na concentração de 0,0012 g/mL com zoom entre os t_R entre 18,0 e 20,0 min.....	54
Figura 32: Cromatograma do extrato bruto de <i>P. mucronata</i> na concentração de 0,0025 g/mL com zoom entre os t_R 16,0 e 22,0 min.....	54

- Figura 33:** Cromatograma do extrato bruto de *P. mucronata* na concentração 0,0050 g/mL com zoom entre os t_R 16,0 e 22,5 min.....55
- Figura 34:** Espectro de UV dos picos majoritários nos tempos de retenção 18,41 e 18,87 minutos do extrato bruto de *P. mucronata* na menor concentração (0,0012 g/mL).....56
- Figura 35:** Cromatogramas obtidos por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatogramas do creme não iônico branco (A) e do creme 0,12% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* (B).....57
- Figura 36:** Cromatograma do creme não iônico 0,25% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 17,5 e 20,0 minutos.....57
- Figura 37:** Cromatograma do creme não iônico 0,50% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 18,0 e 20 minutos.....58
- Figura 38:** Espectro de UV dos picos detectados no creme 0,50% p/p nos tempos de retenção 18,36 e 18,83 minutos, correspondentes aos picos majoritários observados no extrato bruto.....58
- Figura 39:** Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma da amostra de gel 001 contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 20,0 e 24,0 minutos.....60
- Figura 40:** Espectro de UV dos quatro picos com faixa de absorção entre 265 e 333 nm.....60
- Figura 41:** Curva de calibração da rotina. Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3).....61
- Figura 42:** Cromatograma do extrato bruto de *Passiflora mucronata* na concentração de 14,8 mg/mL com zoom entre os t_R 22,0 e 31,0 minutos.....65
- Figura 43:** Espectro de UV do extrato bruto de *P. mucronata* no comprimento de onda de 254 nm de seis picos com faixa de absorção no UV típicos de flavonoides.....65

- Figura 44:** Cromatograma do extrato bruto diluído (0,74 mg/mL) com zoom entre os tempos de retenção 25,0 e 30,0 minutos.....**66**
- Figura 45:** Espectro de UV dos picos majoritários observados na amostra do extrato bruto diluído nos comprimentos de onda de 265- 333 nm e 265-356 nm e nos tempos de retenção 26,77 e 28,88 minutos, respectivamente.....**66**
- Figura 46:** Cromatograma do gel não iônico sem o extrato bruto de *P. mucronata*.....**66**
- Figura 47:** Cromatograma do gel 002 contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os tempos de retenção 22,0 e 37,0 minutos.....**67**
- Figura 48:** Espectro de UV da substância detectada no tempo de retenção 36,13 minutos, a qual apresentou picos de absorção característicos de flavonoides.....**68**
- Figura 49:** Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização.....**68**
- Figura 50:** Avaliação da atividade cicatrizante da formulação gel contendo extrato bruto de *P. mucronata* (gel 002). Dados apresentados como média \pm EPM, grupos com $n > 4$, $*p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado.....**69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações quanto ao modo de uso e indicação terapêutica de sete espécies do gênero <i>Passiflora</i>	6
Tabela 2: Constituintes químicos encontrados em espécies do gênero <i>Passiflora</i>	7
Tabela 3: Estrutura química de alguns flavonoides de ocorrência natural em plantas.....	11
Tabela 4: Alcaloides provenientes do metabolismo secundário de espécies encontradas em diferentes reinos dos seres vivos.....	14
Tabela 5: Representa o número do frasco que acondicionou as amostras coletas nesses gradientes.....	26
Tabela 6: Relação entre o código das subfrações e suas respectivas massas.....	27
Tabela 7: Percentual das massas de cada excipiente.....	29
Tabela 8: Relação das massas pesadas para obter cada formulação.....	29
Tabela 9: Método de eluição da fase móvel em CLAE.....	31
Tabela 10: Gradiente de diluição utilizado em cada amostra.....	32
Tabela 11: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) de cada fração obtida a partir do extrato bruto de <i>Passiflora mucronata</i>	37
Tabela 12: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) de cada subfração obtida da fração acetato de etila de <i>Passiflora mucronata</i>	38
Tabela 13: Comprimentos de onda de flavonoides encontrados em espécies de <i>Passiflora</i>	40
Tabela 14: Soma das áreas dos principais picos observados mais de uma vez nas subfrações.....	45
Tabela 15: Dados de RMN ¹ H (400 MHz) do composto isolado PM18 e dados da isoorientina obtidos da literatura.....	51
Tabela 16: Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) do composto isolado PM18 e dados da isoorientina obtidos da literatura.....	51
Tabela 17: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) dos cremes não iônicos à base de <i>Passiflora mucronata</i> e o creme não iônico branco.....	53

- Tabela 18:** Resultado da quantidade de rutina injeta em 20 μ L, média das áreas (n=3), desvio padrão (n=3) e coeficiente de variação de cada amostra de rutina padrão analisada.....**61**
- Tabela 19:** Soma das áreas referentes aos picos com faixa de absorção no UV típicos de flavonoides, observados em duas injeções do gel 001.....**62**
- Tabela 20:** Massa de flavonoides totais presente na amostra de gel 001 analisada, obtida através da equação da reta da curva de calibração de rutina e teor (% p/p) de flavonoides totais com resultados expressos como média \pm padrão (n=2).....**62**
- Tabela 21:** Resultados da média e desvio padrão da área da ferida aberta obtidos nos dias 1, 3, 7, 10 e 14 de pós-operatório referente aos grupos não tratados, tratados com gel branco e tratados com gel contendo o extrato bruto de *P. mucronata*, n>4, *p<0,05 comparado com o grupo não tratado.....**70**

LISTA DE ABREVIACOES

BAW: n-Butanol: Acid acetic: Water

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY: Homonuclear Correlation Spectroscopy

DAD: Detector com arranjo de diodos

DMSO-*d*₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DP: Desvio Padrão

EPM: Erro Padrão

EtOH: etanol

F.: frao

F. Aq. Residual: Frao Aquosa residual

F. ButOH: Frao butanólica

F. AcEt: Frao Acetato de Etila

g: grama

C: graus Celsius

H₂O: gua

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

J: Constante de acoplamento

kg: quilograma

m: massa

min: minuto

mm: milímetro

m: micrmetro

L: microlitros

g: microgramas

nm: nanmetro

PNRJ: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

p/p: peso/peso

p/v: peso/volume

%: porcentagem

®: marca registrada

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

Subst.: substância

TMS: Tetrametilsilano

t_R: tempo de retenção

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Restinga de Jurubatiba	1
1.2. Família Passifloraceae	3
1.3. Gênero <i>Passiflora</i>	4
1.3.1. Flavonoides	9
1.3.2. Alcaloides	14
1.4. Espécie <i>Passiflora mucronata</i>	17
1.5. Forma farmacêutica semissólida contendo extratos vegetais	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Material botânico.....	23
4.2. Obtenção do extrato bruto	23
4.3. Partição líquido-líquido a partir do extrato de <i>P. mucronata</i>	24
4.4. Cromatografia em coluna da fração acetato de etila.....	25
4.5. Obtenção do creme não iônico	28
4.6. Obtenção do creme não iônico à base de <i>P. mucronata</i>	29
4.7. Obtenção do gel não iônico base.....	30
4.8. Obtenção do gel não iônico à base de <i>P. mucronata</i>	30
4.9. Análise das amostras por CLAE-DAD.....	31
4.9.1. Preparo das amostras para análise por CLAE-DAD	32
4.9.1.1. Subfrações da coluna	32
4.9.1.2. Cremes não iônicos	32
4.9.1.3. Extrato bruto de <i>P. mucronata</i>	32

4.9.1.4. Géis não iônicos	33
4.9.1.5. Extrato bruto de <i>P. mucronata</i>	33
4.9.1.6. Rutina padrão	33
4.10. Elucidação estrutural do composto isolado	35
4.11. Ensaio biológico	36
4.11.1. Avaliação da atividade cicatrizante do gel não iônico à base de <i>P. mucronata</i>	36
4.11.2. Análise estatística	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Rendimento das frações	37
5.2. Rendimento da coluna	37
5.3. Análise qualitativa das subfrações isoladas da fração acetato de etila	38
5.4. Elucidação estrutural do composto isolado	45
5.5. Rendimento do creme	52
5.6. Análise qualitativa I do experimento por CLAE-DAD	53
5.6. Análise qualitativa II e quantitativa do experimento por CLAE-DAD	59
5.7. Análise qualitativa III do experimento por CLAE-DAD	63
5.8. Ensaio biológico	68
5.8.1. Avaliação da atividade cicatrizante da formulação à base de <i>P. mucronata</i> em feridas cutâneas de ratos	68
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

Estudos têm demonstrado que além da atividade ansiolítica as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora mucronata* têm apresentado atividade cicatrizante significativa. No gênero *Passiflora* os flavonoides comumente encontrados são flavonas do tipo C-glicosiladas os quais possuem atividade biológica e são de interesse quimiotaxonômico. O presente trabalho teve por objetivos isolar, quantificar e identificar flavonoides presentes no extrato bruto de *Passiflora mucronata* para utilizá-los como marcadores químicos. Além de incorporar o extrato bruto de *P. mucronata* a uma formulação semissólida e testar a ação cicatrizante dessa formulação. As amostras foram analisadas por CLAE-DAD, utilizando coluna de fase reversa C-18 e um gradiente de solventes, água ultrapura acidificada (pH 3,2 ajustado com ácido fosfórico) como solvente A e acetonitrila como solvente B (2 %, 18 %, 20 %, 22 % e 100 %). A elucidação estrutural do composto isolado foi feita através da análise de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMBC, HSQC, COSY e comparação com dados obtidos da literatura. No ensaio biológico foram utilizados 17 ratos da linhagem *Wistar*, os quais foram divididos em três grupos com n>4 cada em: grupo 1 não tratado, grupo 2 tratado com gel não iônico sem extrato bruto de *P. mucronata* e grupo 3 tratado com gel não iônico contendo extrato bruto de *P. mucronata*. A aplicação diária das formulações semissólidas foi realizada sobre ferida padronizada de 1 cm² na região dorsal de cada animal. A avaliação da ferida foi feita por meio de fotografias adquiridas em 1, 3, 7, 10 e 14 dias após a cirurgia e a área da ferida aberta calculada por meio do programa ImageJ, ensaio aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do CCS-UFRJ (MACAE 003). Ao comparar os resultados obtidos com os dados da literatura, verificou-se que o composto isolado da fração acetato de etila de *P. mucronata* é a flavona isoorientina. Após avaliar os resultados obtidos da atividade cicatrizante frente às formulações semissólidas testadas em feridas cutâneas de ratos *Wistar*, evidenciou-se a partir do dia 7^o, a área da ferida do grupo 3 apresentou uma redução significativa quando comparada ao grupo 1. No dia 10^o de pós-operatório, essa redução significativa promovida por esse grupo tratado com *Passiflora* continuou evidente quando comparado ao grupo 1, podendo inferir uma melhora no processo de cicatrização, em especial, na fase de fibroplasia, visto que entre o 7^o e 14^o dia correspondem ao período de fibroplasia da cicatrização, com presença dos fibroblastos e miofibroblastos.

Palavras-chave: *Passiflora mucronata*; CLAE; formulação; flavonoides; isoorientina; RMN.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Restinga de Jurubatiba

A região Sudeste possui 26 Unidades de Conservação de Proteção Integral, sendo 12 (46,1% do total) Parques Nacionais, que representam 23% do total de Parques Nacionais existentes no território brasileiro. Entre os biomas protegidos tem-se a Mata Atlântica, os Campos Sulinos e os Ecótonos Cerrado-Caatinga (BRASIL, 2007).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) localizado no Estado do Rio de Janeiro possui uma vegetação, como o próprio nome sugere de restinga. De acordo com a Resolução CONAMA, nº 7, de 23 de julho de 1996, entende-se por vegetação de restinga o conjunto das comunidades vegetais, fisionomicamente distintas, sob influência marinha e fluvio-marinha. Essas comunidades, distribuídas em mosaico, ocorrem em áreas de grande diversidade ecológica, sendo consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do solo que do clima. Esse tipo de vegetação se forma em praias, cordões arenosos, dunas e depressões. Geograficamente, as restingas se distribuem ao longo do litoral brasileiro que possui aproximadamente 9.000 km de extensão, não ocorrendo de forma contínua, mas em pontos específicos. Exemplos de Estados brasileiros onde é possível encontrar esse tipo de formação vegetacional é Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Alagoas, Sergipe, Bahia, entre outros (SILVA, 1999; BRASIL, 2012; FARIAS *et al.*, 2013). A grande diversidade de ecossistemas e áreas naturais características do Brasil faz como que este seja um país detentor de cerca de 10 a 20% do total de espécies descritas no mundo (BRASIL, 2007). No entanto, estima-se que ainda há três milhões de espécies a serem descritas, sendo que muitas desaparecem antes e outras têm grande parte de sua variabilidade genética comprometida. As principais causas de diminuição da biodiversidade relacionam-se à urbanização, contaminação, uso exaustivo dos recursos naturais, industrialização e a exploração turística de forma insustentável (MORAIS, 2009). Com isso, visando assegurar a continuidade dos processos mantenedores da biodiversidade, o Brasil e outros países no mundo todo, utilizam-se dos instrumentos de conservação *in situ*, ou seja, estabelece a criação de espaços naturais sob proteção (BERSUSAN, 2002).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (**Figura 1**) é uma unidade de conservação federal administrado pelo Instituto Chico Mendes, desde 29 de abril de

1998, com objetivo de conservar e preservar, para fins científicos, educacionais, paisagísticos e recreativos (BRASIL, 1998). Esse rico e belo patrimônio natural localizado ao longo do litoral nordeste do Estado do Rio de Janeiro, que engloba áreas do município de Macaé (1%), Carapebus (34%) e Quissamã (65%), possui 17 lagoas costeiras e uma extensão territorial de 14.860 hectares (**Figura 2**). Além disso, apresenta diversas espécies de fauna e floras brasileiras associadas ao Bioma da Mata Atlântica (VAINER, 2010).



Figura 1: Representação de uma pequena amostra de parte do PNRJ.

(Fonte: www.ururau.com.br/cidades52603)

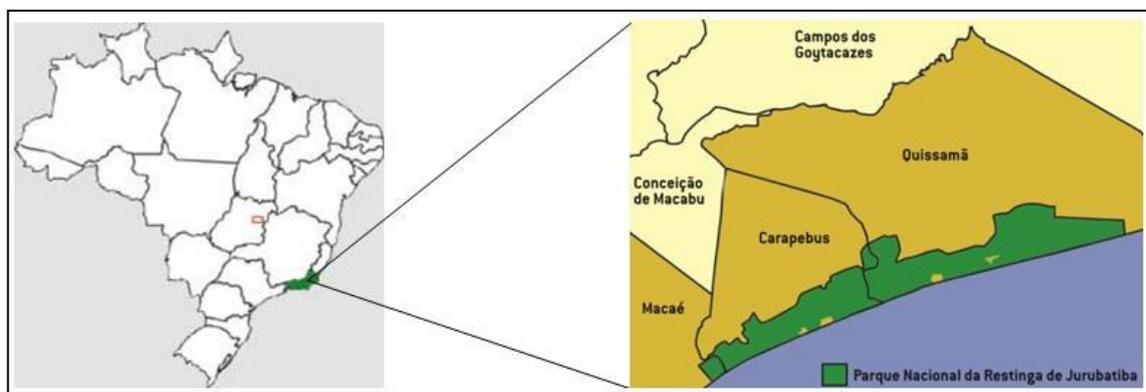


Figura 2: Distribuição geográfica do PNRJ.

Nos últimos anos, o Parque tornou-se uma das mais bem estudadas porções do litoral brasileiro, com a atuação de instituições e centros de pesquisa nacionais, como a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal Fluminense (UFF) e o Núcleo de Pesquisas Ecológicas e Sócio-Ambientais de Macaé (NUPEM), entre outras instituições públicas. Afinal, o PNRJ foi considerado, desde 1999, pelo Ministério da Ciência e da Tecnologia/Conselho Nacional de Pesquisa, área prioritária para sediar um sítio do Programa de Pesquisas Ecológicas

de Longa Duração (PELD-Sítio 5). A partir disso, diversas pesquisas científicas vêm sendo desenvolvidas no Parque por um número crescente de instituições de pesquisa do exterior também, em parceria com o NUPEM/UFRJ. Entre estas entidades, podem ser destacadas a *University of Lund* (Suécia), a *University of Kalmar* (Suécia), a *University of Minnesota* (EUA), a *University of Florida* (EUA) e a *University of Munich* (Alemanha) (BRASIL, 2007). Com a atuação de pesquisadores botânicos responsáveis por identificar e registrar as exsicatas em herbários foi possível identificar diversas famílias de plantas localizadas na Restinga de Jurubatiba, por exemplo, Polypodiaceae, Pteridaceae, Thelypteridaceae, Lycopodiaceae, Gleicheniaceae, Blechnaceae (SANTOS *et al.*, 2004), Passifloraceae (BOSCOLO *et al.*, 2007), entre outras.

1.2. Família Passifloraceae

A família Passifloraceae destaca-se entre os principais grupos vegetais nativos utilizados na medicina popular brasileira e a mesma é dividida em duas tribos, *Paropsieae* e *Passiflorieae*. Sendo essa última representada no continente latino-americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (CERVI, 2005). Segundo Strasser (2011) esta família engloba aproximadamente 23 gêneros e 600 espécies distribuídas majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais, sendo que 120 dessas espécies ocorrem no Brasil e 38 apenas no Estado de São Paulo. Entretanto, espécies silvestres dessa família podem ser encontradas na Índia Ocidental, Galápagos, Austrália, Sudeste Asiático, Malásia, Filipinas, Polinésia e em algumas ilhas do Oceano Pacífico (VANDERPLANK, 2000) e ainda algumas espécies de clima temperado nas Américas, sul da China e Nova Zelândia (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007). Os gêneros que compõem a família Passifloraceae com o maior número de espécies são *Passiflora* e *Adenia* com cerca de 400 e 100 espécies, respectivamente (VILLAS-BÔAS, 2007). A família abrange espécies trepadeiras herbáceas a arbustos, e até mesmo árvores lenhosas. É conhecida por apresentar estípulas, as quais são ramos modificados, além disso, possuem flores isolados e axilares, hermafroditas, pentâmeras, com pétalas e sépalas alternando entre si, com presença de filamentos de corona, opérculo, androginóforo, 5 estames, anteras dorso fixas, óvulos numerosos, placentação perietal, 3-4 estiletos, estigmas

captados, orbiculares ou reniformes que permitem a caracterização da família (NUNES & QUEIROZ, 2006).

1.3. Gênero *Passiflora*

O nome *Passiflora* é atribuído ao significado místico das características físicas de suas flores, nas quais os escritores do século XVI interpretaram suas diferentes partes como representando os símbolos da Paixão de Cristo. O nome *Passiflora* provém do latim “*passio*”, o equivalente a paixão e “*flos oris*” o equivalente a flor. Por essa razão, esses vegetais são conhecidos na Europa e América do Norte como flor-da-paixão (VILLAS-BÔAS, 2007; STRASSER, 2011; LESSA, 2011).

Os frutos das espécies de *Passiflora* são conhecidos popularmente no Brasil como maracujás, denominação indígena de origem tupi que significa “alimento em forma de cuia” (SIEBRA, 2013). Dentre as centenas de espécies do gênero *Passiflora*, Coppens D`eeckenbrugge (2003) relatou 81 que produzem frutos comestíveis. No entanto, deste total, apenas algumas espécies alcançaram o cultivo com fins comerciais. Entre estas espécies destacam-se a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (**Figura 3A**), conhecida popularmente como “maracujazeiro amarelo” e *Passiflora alata* Curtis (**Figura 3B**), ou “maracujazeiro doce” (STRASSER, 2011). Além dessas duas espécies, há também a espécie *Passiflora incarnata* (**Figura 3C**) bastante utilizada pelas indústrias de medicamentos como fitoterápico para fins ansiolíticos, sedativos, diurético e analgésico. Dentre as espécies, a *P. incarnata* é a espécie mais estudada, e inscrita nas Farmacopeias Europeia (2005), Britânica (2005), Francesa (1965) e Suíça (1971), entre outras (BERALDO & KATO, 2010).

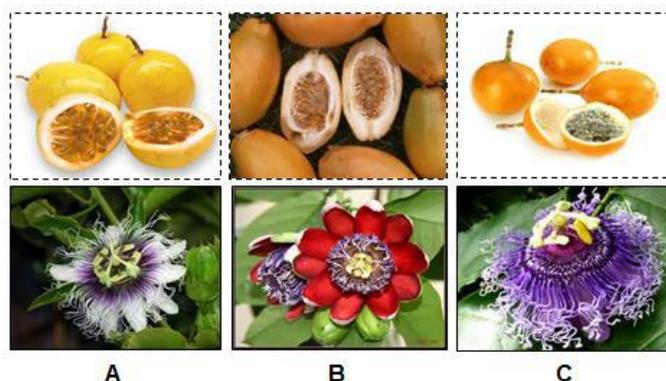


Figura 3: Ilustração das flores e frutos das espécies *P. edulis* (A), *P. alata* (B) e *P. incarnata* (C). (Fonte: <https://www.google.com.br/>; palavras-chave: “*Passiflora incarnata* e fruto”; “*Passiflora alata* e fruto” e “*Passiflora edulis* e fruto”; <http://emplastrum.blogspot.com.br/2013/02/passiflora.html>)

O Brasil é o maior produtor de maracujá, apresentando produção de 684 mil toneladas numa área aproximada de 48.700 hm². O cultivo deve-se as características alimentícias, medicinais e ornamentais que apresenta (DE ARRUDA, 2013). Segundo Córdova e colaboradores (2005), vinte e seis Estados brasileiros cultivam o maracujá, sendo que dez desses respondem por mais de 40% do volume de produção, entre os quais encontram-se os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Pernambuco e Alagoas. Essa ampla utilização e cultivo podem ser justificados pelo seu consumo no preparo de sucos e outros produtos alimentícios, tais como sorvetes, sobremesas, bebidas alcoólicas; produtos cosméticos, entre outros, e ao uso popular tradicional, tanto do suco quanto do chá preparado a partir das folhas para o tratamento de insônia, irritabilidade, inquietação, entre outros sintomas relacionados à agitação psicomotora (DE ARRUDA, 2013). De modo geral, essas e outras propriedades medicinais observadas em plantas ocorrem devido à presença de constituintes químicos nas folhas, flores, raízes ou caules das plantas, por exemplo, alcaloides, flavonoides, saponinas, glicosídeos, taninos, cumarinas, entre outros. Sabe-se que as plantas produzem essas substâncias químicas como metabólito secundário para fins de defesa contra patógenos e herbívoros, para atrair animais polinizadores e dispersores de sementes, ou quando as condições ambientais não são adequadas para o seu desenvolvido, entre outras finalidades (GOSMANN *et al.*, 2011).

A **Tabela 1** a seguir apresenta algumas informações encontradas na literatura quanto à forma de uso e indicação terapêutica. Entretanto, vale ressaltar que apenas três (*P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*) das sete espécies citadas abaixo se encontram no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) o qual reúne informações de orientação para preparações extemporâneas de plantas medicinais listadas na Farmacopeia Brasileira, bem como, advertências, indicações, modo de usar e nomenclatura popular. As informações sobre a espécie *P. cincinnata* foi citado por Siebra (2013) em seu trabalho, no entanto, essas informações advêm de levantamentos etnofarmacológicos. Enquanto que as informações obtidas das demais espécies foram obtidas de trabalhos recentes os quais têm indicado essas possíveis ações terapêuticas frente aos extratos testados em ratos, no entanto, faz-se necessário realizar mais estudos de forma a garantir eficácia, qualidade e segurança ao usuário.

Tabela 1: Informações quanto ao modo de uso e indicação terapêutica de sete espécies do gênero *Passiflora*.

Nome botânico	Formas de uso	Indicação terapêutica	Referências bibliográficas
<i>Passiflora actinia</i>	Extrato	Ansiolítico	LOLLI <i>et al.</i> , 2007.
<i>Passiflora alata</i>	Infuso (folhas)	Ansiolítico e sedativo leve	BRASIL, 2011.
<i>Passiflora caerulea</i>	Infuso	Sedativo	FELIÚ-HEMMELMANN <i>et al.</i> , 2013.
<i>Passiflora cincinnata</i>	Infuso (toda planta)	Inflamações, ansiolítico, antigripal, hipotensivo, sedativo	SIEBRA, 2013.
<i>Passiflora edulis</i>	Infuso (folhas)	Ansiolítico e sedativo leve	BRASIL, 2011.
<i>Passiflora incarnata</i>	Infuso, tintura, extrato	Ansiolítico e sedativo leve	BRASIL, 2006 e BRASIL, 2011.
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Extrato hidro-alcoólico	Ansiolítico	DE CASTRO <i>et al.</i> , 2007.

Quimicamente, estudos com diversas espécies do gênero *Passiflora* evidenciam, principalmente, a presença de flavonoides e alcaloides (MÜLLER, 2006). Entretanto, é possível encontrar outros constituintes químicos como cumarinas, ácidos fenólicos, saponinas, taninos, lignanas, esteroides, ácidos graxos, heterosídeos cianogênicos, aminoácidos, maltol, alcaloides indólicos (harmana, harmol, harmina e seus derivados di-hidrogenados) além dos inúmeros flavonoides (BARBOSA, 2006; MÜLLER, 2006). Os estudos fitoquímicos para investigar a presença de alcaloides indólicos do tipo harmânico nas espécies desse gênero tinha uma força maior até meados da década de 60, onde ensaios farmacológicos com alcaloides harmânicos permitiram relatar vários efeitos relacionados ao sistema

nervoso central como alucinações, tremores e convulsões crônicas inibição da monoamino oxidase; além de propriedades estimulantes, anti-helmíntica, antitripanosômica e antileishmania. Com o passar dos anos houve uma mudança de enfoque rumo ao estudo de compostos de natureza flavonoídica sem, entretanto, ocorrer fato que justificasse este direcionamento (STRASSER, 2011). De acordo com Pereira e colaboradores (2004) os flavonoides C-glicosilados são os constituintes químicos mais citados na literatura para as espécies do gênero *Passiflora*. Embora esses metabólitos secundários apresentem uma vasta distribuição nesse gênero, diferenças qualitativas e quantitativas foram relatadas nas espécies de *P. alata*, *P. edulis* Sims e *P. caerulea* L. para essa classe de composto (PEREIRA *et al.*, 2004).

A **Tabela 2** abaixo reúne algumas espécies do gênero *Passiflora* bem como, os constituintes detectados nessas espécies, como se pode observar, algumas espécies têm sido mais estudadas do que outras quanto ao seu aspecto fitoquímico.

Tabela 2: Constituintes químicos encontrados em espécies do gênero *Passiflora*.

Espécies	Constituintes químicos	Referências bibliográficas
<i>Passiflora actinia</i>	Flavonoide (isovitexina)	VILLAS-BÔAS, 2007.
<i>Passiflora alata</i>	Flavonoides (vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina); saponinas; alcaloides β -carbolínicos.	GOSMANN <i>et al.</i> , 2011; BARBOSA, 2006.
<i>Passiflora caerulea</i>	Flavonoides, glicosídeos cianogênicos, ácidos graxos e antocianinas.	GOSMANN <i>et al.</i> , 2011.
<i>Passiflora cincinnata</i>	Taninos condensados, flavonas, flavonóis, flavononóis, chalconas, auroras, flavanonas, leucoantocianidina, catequinas, alcaloides e flobacênicos; β -caroteno	SIEBRA <i>et al.</i> , 2014; ROCHA, 2011.

	e antocianinas.	
<i>Passiflora edulis</i>	Glicosídeos passiflorina, glicosídeos cianogênicos, flavonoides derivados C-glicosídeos e O-glicosídeos, compostos fenólicos, carotenoides, antocianinas, aminoácidos, açúcares; terpenos, alcaloide.	GOSMANN <i>et al.</i> , 2011; BARBOSA, 2006; MADOGGIO, 2011; MÜLLER, 2006.
<i>Passiflora incarnata</i>	Alcaloides derivados do indol, como harmina; como isovitexina; óleo essencial, glicosídeos cianogênicos, maltol, carboidratos, aminoácidos.	NICOLETTI <i>et al.</i> , 2007; MADOGGIO, 2011. vitexina,
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Flavonoides, saponinas, alcaloides, glicosídeos cianogênicos (prunasina e samburigrina).	SAKALEM <i>et al.</i> , 2012; VILLAS-BÔAS, 2007; MÜLLER, 2006; GOMES, 2013.

Todavia, a busca por se estudar espécies de plantas e isolar os seus constituintes químicos não se resumem em apenas entender o motivo pelo qual essas plantas produzem essas substâncias oriundas de seu metabolismo secundário. Mas, porque os mesmos são de interesse econômico devido as suas diferentes propriedades terapêuticas. Afinal, ensaios biológicos usando combinações isoladas mostraram que os flavonoides apresentam uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobianos, antiviral, anti-ulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo,

hipolipidêmico, anti-inflamatório, antiplaquetário; além de aumentar a permeabilidade capilar, inibir exsudação proteica e migração de leucócitos (MACHADO *et al.*, 2008).

Entre os fármacos utilizados na clínica terapêutica derivados do metabolismo secundário de plantas estão o taxol (antitumoral), arglabina (antitumoral), artemisinina (antimalárico), forskolina (bronco- e vasodilatador) e plaunotol (antiúlcera) (LAGE, 2011). De fato, esses fármacos inovadores são a força motriz que impulsiona os pesquisadores a investigarem novos compostos com atividade farmacológica a partir de fontes naturais. A razão dessa afirmação pode ser facilmente comprovada quando se analisa os valores que movem o mercado e o número de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. De acordo com Calixto (2003) o mercado mundial do grupo de drogas de origem natural atinge vários bilhões de dólares. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Somente no período entre 1983 e 1994, das 520 drogas aprovadas pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (FDA), 220 (39%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais. Além disso, a vantagem de produzir um fitomedicamento ao invés de desenvolver um novo medicamento sintético é que este último envolve vultosas somas de recursos (cerca de US\$ 350 milhões a US\$ 800 milhões) e cerca de 10 a 15 anos de pesquisa, enquanto os fitomedicamentos requerem muito menos recursos, e também menor tempo de pesquisa (CALIXTO, 2003).

1.3.1. Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. Afinal, os flavonoides desempenham funções importantes nas plantas, entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra micro-organismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (KARAM *et al.*, 2013). Esse metabólito secundário pode ser encontrado em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e frutos, entretanto, a concentração pode variar dependendo do órgão vegetal em que se encontra. Além disso, podem ocorrer nas formas livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos) (YAO *et al.*, 2004).

Do ponto de vista químico, os flavonoides constituem substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico. Este grupo de compostos polifenólicos apresenta uma estrutura caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C), formando um sistema C₆-C₃-C₆ (**Figura 4**). Outro aspecto estrutural comum é a ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, isto é, derivados difenilpropânicos. O esqueleto C₁₅ dos flavonoides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C₆-C₃) e três unidade de acetato (C₆). Portanto, os flavonoides são compostos de biossíntese mista, ou seja, derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (ALMEIDA *et al.*, 2013; DOS SANTOS, 2010).

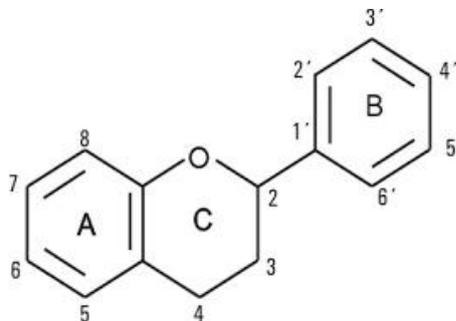
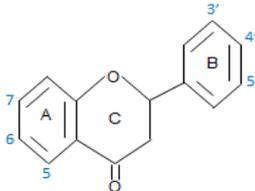
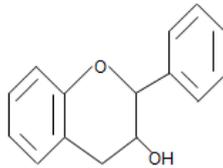
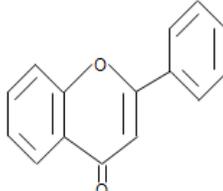
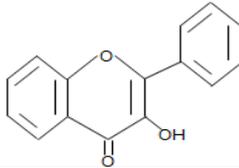
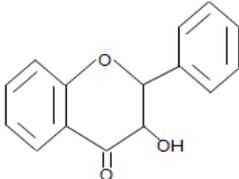
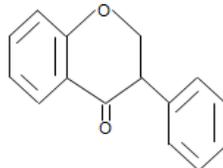


Figura 4: Estrutura química base de núcleos das classes dos flavonoides.
(Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2013)

A classe flavonoídica engloba diferentes subgrupos, entre os quais compreendem-se as flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanonóis, antocianidinas, flavanas, auroras. Entre estes grupos, as flavonas são os compostos mais abundantes, e as auroras constituem os mais raros, existindo aproximadamente 25 compostos desta classe. As diferenças individuais dentro de cada grupo resultam de uma variação no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificação nos núcleos e pelo grau de metilação e glicosilação. Isso porque na biossíntese desses subgrupos, os mesmos podem sofrer várias modificações mediadas por reações de adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxilas ou do núcleo dos flavonoides, dimerização (produzindo biflavonoides), glicosilação de grupos hidroxila (produzindo O-glicosídeos) ou em algum núcleo carbônico (produzindo C-glicosídeos) (WILHELM-FILHO *et al.*, 2001; LAGE, 2011). A **Tabela 3** a seguir apresenta a estrutura química de algumas subclasses dos flavonoides e exemplos de flavonoides.

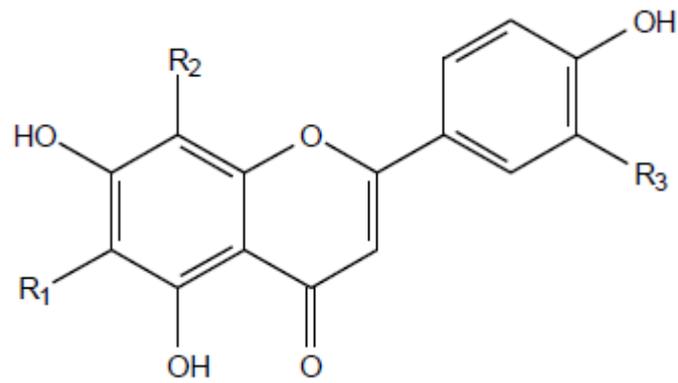
Tabela 3: Estrutura química de alguns flavonoides de ocorrência natural em plantas.(Adaptado, Fonte: MACHADO *et al.*, 2008)

Fórmula estrutural	Flavonoides	Substituições				
		5	6	7	3'	4'
Flavanona 	Erioditiol	OH	H	OH	OH	OH
	Hesperitina	OH	H	OH	OH	OMe
	Naringenina	OH	H	OH	H	OH
Flavanol 	Catequina	OH	H	OH	OH	OH
	Galocatequina	OH	H	OH	OH	OH
Flavona 	Apigenina	OH	H	OH	H	OH
	Crisina	H	H	OH	H	H
	Luteolina	OH	H	OH	OH	OH
Flavonol 	Kaempferol	OH	H	OH	H	OH
	Miricetina	OH	H	OH	OH	OH
	Quercetina	OH	H	OH	OH	OH
Flavononol 	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH
Isoflavona 	Daidazina	H	H	OH	H	OH
	Ginesteína	OH	H	OH	H	OH
	Gliciteína	OH	OMe	OH	H	OH
	Formononetina	H	H	OH	H	OMe

A biossíntese dos flavonoides ocorre por uma via mista, a via do ácido chiquímico e a do acetato. O ácido chiquímico é o precursor do composto inicial da síntese dos flavonoides, a fenilalanina. Este aminoácido aromático depois de desaminado pela fenilalanina-amônia-liase (PAL) produz ácido cinâmico que por ação da 4-hidroxilase cinamato é convertido em ácido *p*-cumárico. Estas duas enzimas estão associadas, o ácido cinâmico não é libertado pela PAL, mas sim, transferido diretamente para o centro ativo da segunda enzima. Posteriormente, ocorre a adição da CoA, catalisada pelo *p*-cumarato-CoA liase, originando a *p*-cumaroil-CoA, que ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a naringenina chalcona. Esta reação é catalisada pela chalcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel C, catalisada pela chalcona isomerase, para formar a naringenina que por fim origina a hispidulina, por meio de metoxilação. Desta forma, nos flavonoides, o anel A é formado via acetato enquanto o B resulta da via chiquimato e os três átomos de carbono que ligam o anel A ao B derivam do fosfoenopiruvato (MARQUES, 2008; KARAM *et al.*, 2013).

No gênero *Passiflora* os flavonoides comumente encontrados são do tipo C-glicosilados os quais possuem atividade biológica e são de interesse quimiotaxonômico, sendo frequentemente utilizados como marcadores químicos nas análises de medicamentos fitoterápicos. Esses flavonoides C-glicosilados são menos solúveis em acetato de etila do que as agliconas de flavonas e podem permanecer na fase aquosa após hidrólise (PEREIRA & VILEGAS, 2000).

Müller (2006) cita em seu trabalho que estudos feitos por Oga e colaboradores (1984) verificou a presença dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina na espécie *P. alata* através da técnica de CCD. Além disso, cita também que após Freitas (1985) analisar os flavonoides glicosilados de *P. incarnata*, *P. edulis*, *P. alata* e *P. quadrangularis*, através de CCD, notou-se a presença de quatro flavonoides principais nestas espécies identificados como: vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (**Figura 5**). Com relação aos flavonoides detectados com maior frequência no gênero *Passiflora* observou-se a orientina, homo-orientina, isovitexina, vitexina, schaftosídeo e swertisina (MÜLLER, 2006). Vale ressaltar que a diferença de dados em relação à detecção de flavonoides nas espécies de *Passiflora* pode variar devido às metodologias aplicadas, os órgãos empregados na análise, à época e o local de colheita (STRASSER, 2011).



Orientina	R ₁ = H	R ₂ = glicose	R ₃ = OH
Isoorientina	R ₁ = glicose	R ₂ = H	R ₃ = OH
Vitexina	R ₁ = H	R ₂ = glicose	R ₃ = H
Isovitexina	R ₁ = glicose	R ₂ = H	R ₃ = H

Figura 5: Alguns dos flavonoides encontrados nas espécies de *Passiflora* L.

(Fonte: STRASSER, 2011)

1.3.2. Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos nitrogenados encontrados principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em micro-organismos e animais (DEWICK, 2002). Esses metabólitos nitrogenados provenientes do metabolismo secundário dos seres vivos são na maioria das vezes farmacologicamente ativos (DE OLIVEIRA, 2008). A **Tabela 4** a seguir exemplifica alguns alcaloides encontrados nos reinos dos seres vivos.

Tabela 4: Alcaloides provenientes do metabolismo secundário de espécies encontradas em diferentes reinos dos seres vivos.

Organismo			
Reino	Espécie	Alcaloide	Referência
Animal	<i>Moschus moschiferus</i>	Muscopiridina	BRUCE, 1999.
Vegetal	<i>Catharantus roseus</i>	Vincristina e vimblastina	GAJALAKSHMI, 2013.
Protista	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Anatoxinas	FEUILLADE, 1992.
Fungi	<i>Claviceps purpurea</i>	Ácido lisérgico	NISHIMURA, 2007.
Monera	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1,1,3-tris (3-indolil) butano	VELURI <i>et al.</i> , 2003.

De modo geral, algumas substâncias que compõem essa classe de compostos são conhecidas desde a antiguidade devido aos efeitos sobre o sistema nervoso, sendo muitas das vezes utilizadas como venenos ou alucinógenos. Por exemplo, a execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*), uma fonte do alcaloide coniina (DA SILVA, 2011). Outras civilizações utilizavam a tubocurarina, um alcaloide proveniente do extrato do curare (*Chondodredron tomentosum*) para o envenenamento de flechas empregadas em caçadas e guerras. Considerando a sociedade atual, diversos alcaloides são utilizados de forma lícita como a nicotina e ilícita como os entorpecentes

comercializados pelo narcotráfico, por exemplo, o LSD (dietilamida do ácido lisérgico) e a cocaína (DE OLIVEIRA, 2008). Os alcaloides desempenham funções fisiológicas e psicológicas em seres humanos devido à capacidade de interagirem com neurotransmissores, como a cocaína, dopamina, propranolol, metoprolol e nadolol (MARTINS, 2012). A aplicação dessas substâncias em altas concentrações apresenta ação tóxica, contudo, em baixas concentrações tem ação terapêutica, agindo como relaxantes musculares, tranquilizantes e analgésicos (MARTINS, 2012). O que torna um interessante objeto de estudos para prospecção de novos fármacos (ATHAYDE, 2013). Nas plantas, os alcaloides apresentam função de defesa contra patógenos, por exemplo, aumento da concentração de solanina em batatas quando estas são atacadas por micro-organismos (DA SILVA, 2011).

Do ponto de vista químico, os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que possuem um ou mais átomos de nitrogênio. Entretanto, são definidos como alcaloides verdadeiros aqueles que são derivados de aminoácidos e apresentam um anel heterocíclico com o nitrogênio. Protoalcaloides aqueles em que o nitrogênio, derivado de um aminoácido, não apresenta anel heterocíclico. Enquanto que os pseudoalcaloides são considerados compostos heterocíclicos nitrogenados que não são derivados de aminoácidos (SILVA, 2011). Os principais aminoácidos envolvidos na biossíntese dos alcaloides são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico, niacina e histidina (ATHAYDE, 2013). A partir dos aminoácidos alifáticos, têm-se os alcaloides pirrolidínicos e tropânicos (ornitina) e os piperidínicos (lisina), e dos aminoácidos aromáticos, têm-se os alcaloides isoquinolínicos (tirosina) e os indólicos (triptofano) (DE OLIVEIRA, 2008). Através de reações de descarboxilação dos aminoácidos ou a partir de intermediários envolvidos na síntese destes aminoácidos, os alcaloides são sintetizados (MARTINS, 2012). A **Figura 6** reúne as estruturas químicas básicas de alcaloides, ou seja, as estruturas de alcaloides podem derivar dessas estruturas.

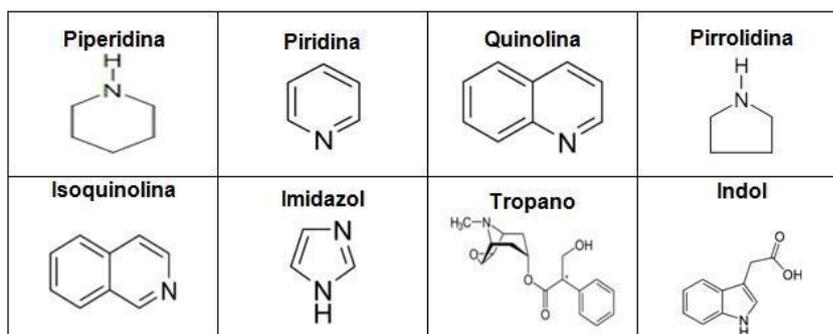


Figura 6: Estrutura química básica de alcaloides.

(Fonte: <http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/alcaloides/>)

Os alcaloides já encontrados no gênero *Passiflora* são do tipo indólico simples, derivados do sistema β -carbolina, conhecidos como alcaloides β -carbolínicos (MÜLLER, 2006). Os alcaloides indólicos apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como analgésica, anti-inflamatória, bactericida, estrogênica, estimulante e depressora do sistema nervoso central, dentre outras (DA SILVA *et al.*, 2014). Muitos dos alcaloides β -carbolínicos são substituídos em C-1 por um grupo metila, como, por exemplo, harmana. Entre o período de 1954 e 1956, Neu isolou o alcaloide harmana a partir de partes aéreas de *P. incarnata*, e posteriormente detectou a mesma substância nas espécies *P. edulis* e *P. quadrangularis*. Em contrapartida, estudos realizados com *P. incarnata* durante a década de 1960 detectaram, através de análises cromatográficas e espectroscópicas, não apenas harmana, mas também os alcaloides harmol, harmalol, harmalina e harmina (**Figura 7**). Vale enfatizar que as contradições dos dados na detecção de alcaloides em espécies de *Passiflora* publicados na literatura podem ser justificadas pelas diferentes metodologias empregadas, órgão vegetal utilizado, a época e o local de colheita (MÜLLER, 2006).

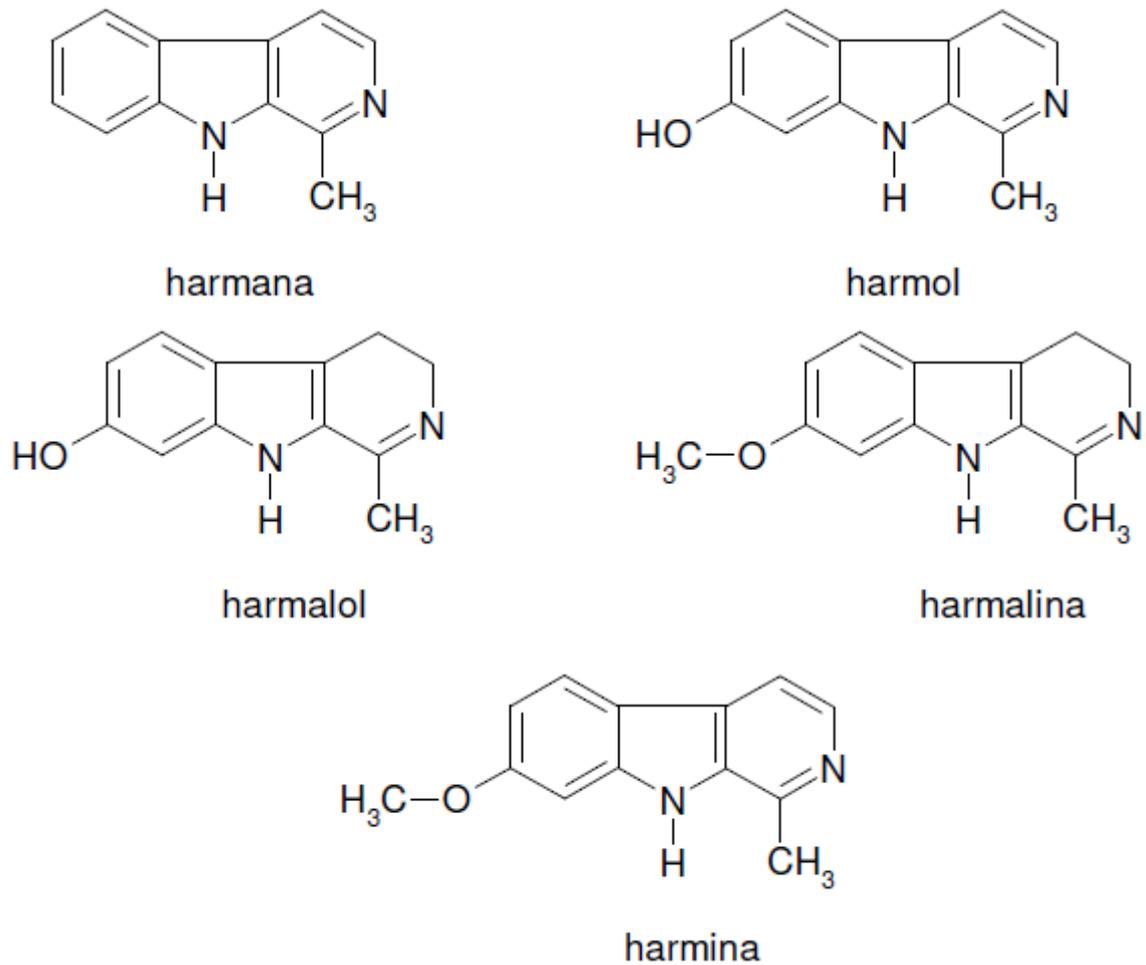


Figura 7: Estrutura química de alcaloides encontrados em espécies do gênero *Passiflora*.
(Fonte: MÜLLER, 2006)

1.4. Espécie *Passiflora mucronata*

A espécie *P. mucronata* Lam. (**Figura 8**) é encontrada nos Estados do Espírito Santo, Bahia e Rio de Janeiro, entre vegetações predominantemente arbustivas e de restingas (PASSOS, 2007). Morfologicamente, esta espécie é uma trepadeira herbácea, com caule delgado não lenhoso; volúvel, que se enrosca de maneira espiralada em torno de um suporte; com órgão preensor que apresenta sensibilidade localizada na estrutura responsável pela aderência ao suporte. Além disso, possui flores brancas, fosforescentes e a sua polinização é feita principalmente por intermédio de morcegos, isso porque a abertura das flores inicia-se no começo da noite e permanece aberta por um curto período da manhã o que favorece a polinização por insetos também, a floração é intensa e quase contínua

pelo ano todo (PASSOS, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2014). Assim como as outras espécies do gênero, *Passiflora mucronata* também possui propriedades medicinais sedativas e calmantes sendo frequentemente utilizada na medicina popular para tratamento de insônia. No entanto, além dessa atividade terapêutica a mesma também é indicada para o tratamento de vermes e hemorroidas (BOSCOLO & VALLE, 2008). Uma característica agrônômica importante dessa espécie é a de ser resistente à bacteriose nas folhas, e, altamente resistente à antracnose nos frutos e ramos (JUNQUEIRA *et al.*, 2005).



Figura 8: Ilustrações da flor e do fruto da espécie *Passiflora mucronata* e do principal polinizador dessa espécie vegetal.

(Fonte: <https://www.google.com.br/>; palavras-chave: “passiflora mucronata” e “passiflora mucronata fruto”; <http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/imagensbag/foto11.jpg>)

Vetore-Neto e colaboradores (2008) detectaram em seu estudo de triagem fitoquímica, a presença de flavonoides, taninos e saponinas e pela técnica de CCD constatou-se a presença de alcaloides em quantidade mínima no extrato bruto. Além disso, descreve que após fazer o doseamento de taninos e flavonoides do extrato hidro-etanólico a 60% obtido a partir de folhas e caules de *P. mucronata*, observou-se razoável teor de taninos (17,93%) e baixo teor de flavonoides (0,34%).

Um estudo feito por De Oliveira e colaboradores (2012) empregando a técnica de CLAE-UV para obter o perfil cromatográfico do extrato bruto (hidro-alcoólico 85%) e frações obtidas a partir das folhas de *Passiflora mucronata* resultou na detecção de dois picos majoritários, os quais apresentaram espectro de UV característicos de flavonoides. Após comparar os espectros e tempos de retenção do extrato hidro-alcoólico e das frações obtidas pelo procedimento de partição líquido-líquido, notou-se que um dos picos majoritários observados no extrato apareceu concentrado na fração acetato de etila no tempo de retenção 18,44 minutos correspondente ao

tempo de retenção do extrato. Posteriormente, calculou-se a quantidade em μg de flavonoides, tendo como parâmetro a curva da rutina, constatando, então que os flavonoides representavam 13,32% p/p do extrato (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Um ensaio também realizado por nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade cicatrizante desse mesmo extrato bruto de *P. mucronata* em feridas cutâneas de ratos *Wistar* e o mesmo revelou uma promissora atividade cicatrizante ao aplicar uma dose de 0,6 mg do extrato em 1 cm^2 de área ferida. Visto que o tratamento com extrato de *P. mucronata* teve um efeito significativo na redução da área da ferida ($39,7 \pm 1,8\%$) quando comparada com os animais não tratados ($57,5 \pm 6,7\%$) a partir do 5º dia após a cirurgia (VENTURA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido tendo como base esses resultados obtidos por De Oliveira e colaboradores (2012) e Ventura e colaboradores (2012). Dessa maneira, visionou-se isolar substâncias flavonoídicas presentes na fração acetato de etila e incorporar esse mesmo extrato bruto de *P. mucronata* testado, em uma formulação semissólida e testá-lo quanto a sua atividade cicatrizante.

1.5. Forma farmacêutica semissólida contendo extratos vegetais

Preparações à base de espécies vegetais sempre foram utilizadas pelo homem a fim de sanar seus problemas de saúde (BORELLA *et al.*, 2010). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) define medicamentos fitoterápicos na RDC nº 14/2010, artigo 1, como sendo os medicamentos “obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas.” Além disso, não considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (BRASIL, 2010).

As preparações semissólidas contendo extratos vegetais são elaboradas a partir da incorporação de matérias-primas vegetais. Na sua concepção, são derivados extrativos vegetais, em bases hidro ou lipofílicas como cremes, géis, pomadas e loções para uso tópico. Tais preparações abrangem desde as formas

sólidas, como extratos secos e pós, até as líquidas, como soluções extrativas nos mais diversos sistemas de solventes (ADRIANO, 2009).

Embora sejam preparações à base de material vegetal, estes produtos devem ser padronizados qualitativa e quantitativamente, exigindo rigoroso estudo da planta, do plantio, das condições de obtenção e da sua composição. Visando evitar possíveis alterações na composição química das substâncias ativas, vindo a interferir na qualidade do produto final bem como garantir ao consumidor qualidade, segurança e eficácia (BORELLA *et al.*, 2010). Afinal, a legislação brasileira considera preparações à base de espécies medicinais como medicamentos, já que a composição química da planta é a responsável por seus efeitos terapêuticos (BRASIL, 2004). Entre os requisitos mínimos exigidos pela legislação no controle de qualidade da matéria prima vegetal e do medicamento fitoterápico é a padronização de marcadores químicos, que são compostos ou classe de compostos químicos (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade (KLEIN *et al.*, 2009; BRASIL, 2010).

Dentre as bases farmacêuticas para a via tópica, destacam-se os géis, cuja escolha se deve em grande parte à ausência de substâncias graxas, à tendência de se espalhar facilmente com aplicação por pressão ou fricção, como também darem origem a um veículo transparente ou translúcido facilitando a validação do método de análise (ADRIANO, 2009).

Pesquisas por tratamentos alternativos de uso tópico têm sido realizados visando produtos de baixo custo, baixa toxicidade e que sejam eficazes no tratamento e cura de enfermidades. Nessa perspectiva, vários fitoterápicos usados na medicina popular têm sido testados, alguns com resultados promissores, tais como, o uso de calêndula (*Calendula officinalis*), maracujá (*Passiflora edulis*), babosa (*Aloe vera*), óleo de girassol (*Helianthus annuus*), papaína (*Carica papaya*), jaqueira (*Artocarpus heterophyllus*), entre outros (GORDEIRO *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Ao considerar o contexto mundial, nos últimos anos, tem-se observado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visto que as plantas têm contribuído de forma bastante significativa para a obtenção de compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Espécies do gênero *Passiflora* têm sido estudadas quanto aos aspectos fitoquímicos e biológicos, sabe-se que *P. incarnata* e *P. edulis* possuem atividade ansiolítica (PROVENSI, 2007; BRASIL, 2011). Além dessa atividade farmacológica observada em espécies do gênero *Passiflora*, o estudo realizado por Ventura e colaboradores (2012) evidenciou uma atividade cicatrizante significativa da espécie *Passiflora mucronata*. Sendo esta última propriedade terapêutica de bastante relevância visto que a aplicação desta planta medicinal em uma formulação como fitoterápico pode ser um recurso terapêutico alternativo.

Adicionalmente, considerando os estudos feitos por De Oliveira e colaboradores (2012) que verificaram um teor de flavonoides representativo nessa espécie; além disso, que há poucos estudos fitoquímicos sobre a espécie *P. mucronata* e escassez de estudos que envolvam a incorporação de extrato bruto de *P. mucronata* em uma formulação semissólida o presente trabalho foi desenvolvido.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo isolar, quantificar e identificar flavonoides presentes no extrato bruto de *Passiflora mucronata*, bem como, fazer a incorporação desse extrato em uma formulação semissólida e testar a sua ação cicatrizante.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar flavonoides presentes no extrato bruto para utilizá-los como marcadores químicos;
- Preparar creme não iônico em diferentes concentrações contendo extrato bruto de *Passiflora mucronata* e analisar qualitativamente por CLAE-DAD;
- Preparar gel não iônico contendo extrato bruto de *Passiflora mucronata*;
- Quantificar por CLAE-DAD os flavonoides totais presentes na formulação gel 001 contendo o extrato bruto de *P. mucronata*;
- Analisar qualitativamente a formulação gel 002 contendo o extrato bruto de *P. mucronata*;
- Identificar por CLAE-DAD nas formulações de gel contendo o extrato bruto de *P. mucronata* o marcador químico isolado;
- Avaliar a ação cicatrizante da formulação gel 002 *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material botânico

As folhas de *Passiflora mucronata* utilizadas nesta pesquisa foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, localizado na cidade de Macaé, município do Estado do Rio de Janeiro. A identificação botânica das mesmas foi feita pela Prof. Dra. Tatiana U.P. Konno e as exsiccatas foram previamente depositadas no herbário do NUPEM/UFRJ. As folhas foram devidamente separadas e pesadas, obtendo-se 201,34 g de massa.

4.2. Obtenção do extrato bruto

O extrato bruto de *P. mucronata* foi preparado através do método de maceração na proporção de 10% p/v, sendo utilizado uma solução de EtOH/H₂O (85:15). Dessa forma, 50,4 g das folhas foram pulverizadas em liquidificador com 75 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 429 mL de EtOH a este. O extrato foi filtrado a cada 24 horas e submetido novamente à maceração, porém com metade do volume inicialmente utilizado de EtOH.

Após observar o clareamento na cor do extrato decorrente da constante troca de solvente, foi feita a cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica gel 60 F₂₅₄ no sistema eluente n-BuOH:CH₃COOH:H₂O - BAW (8:1:1) e as cromatoplasmas foram reveladas com sulfato cérico para o monitoramento dos extratos, visando avaliar a necessidade de continuar a maceração.

Ao término da extração, o extrato obtido foi evaporado em rota-evaporador, em temperatura monitorada para que a mesma não ultrapassasse 60 °C, em seguida transferido para frasco de vidro, o qual foi levado para congelar para que fosse liofilizado.

Após liofilizar obteve-se o extrato bruto seco o qual apresentou 7,4188 g de massa final. Parte dessa massa foi utilizada no preparo do creme e gel à base de *P. mucronata*, realização das análises e procedimentos desenvolvidos no projeto em questão, conforme mostra a **Figura 9** a seguir:

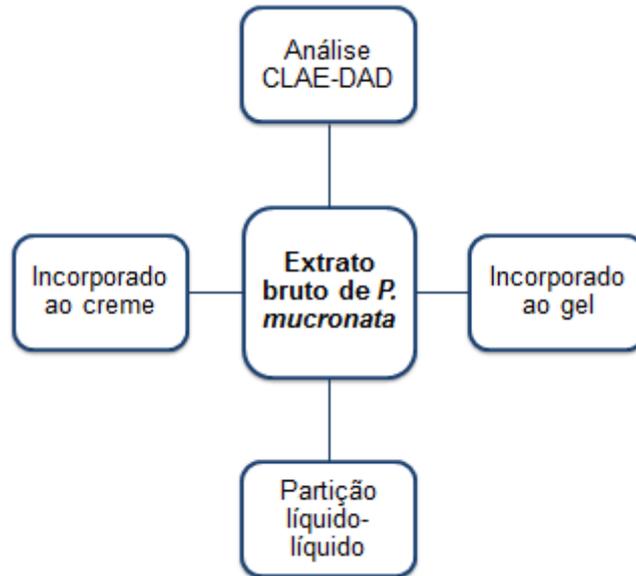


Figura 9: Destino de parte da massa de extrato bruto de *P. mucronata*.

4.3. Partição líquido-líquido a partir do extrato de *P. mucronata*

A partir do extrato bruto de *P. mucronata* obtido após a liofilização (m= 7,4188 g), iniciou-se o processo de partição líquido-líquido com solventes extratores em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água.

Foram pesados 6,9611 g de extrato bruto o qual foi redissolvido em 160 mL de MeOH e filtrado. Em seguida, foram adicionados 160 mL de hexano ao filtrado. Após a separação das fases, a fase metanólica foi novamente colocada no funil de separação e misturada a 80 mL de hexano, metade do volume utilizado anteriormente. Este último foi realizado em triplicata. Posteriormente, a fração metanólica foi evaporada em banho-maria, transferida a um frasco de vidro e levada para congelar e liofilizar, visando remover qualquer resíduo de água. Entretanto, durante a transferência para o frasco de vidro notou-se a formação de um precipitado amarelado, chamado de substância isolada 1, o qual foi separado do extrato, solubilizado em metanol, evaporado em banho-maria, congelado e liofilizado, tendo o seu sobrenadante separado também. Depois a fração metanólica foi ressuspensa em 250 mL de água, realizando assim as partições com diclorometano, acetato de etila e butanol. Logo a seguir as partições foram transferidas para frascos tarados e levadas ao banho-maria até a evaporação dos solventes, obtendo-se assim a massa de cada fração (**Figura 10**). Além disso,

durante a evaporação da fração acetato de etila houve a formação de um precipitado de cor amarela que foi chamado de substância isolada 2, sendo este separado, lavado com acetato de etila, evaporado e liofilizado.

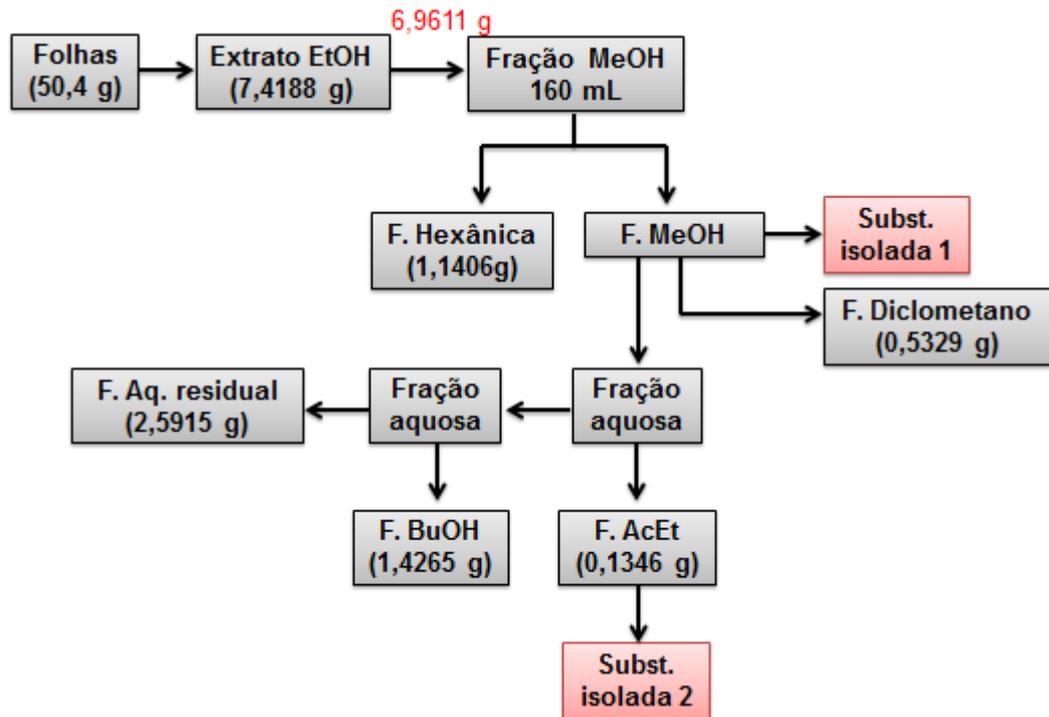


Figura 10: Esquema da partição líquido-líquido a partir do extrato bruto de *P. mucronata*.

4.4. Cromatografia em coluna da fração acetato de etila

A fração acetato de etila (substância isolada 2) foi escolhida para análise cromatográfica com a finalidade de separar os compostos, bem como, isolar as substâncias de natureza flavonoídica evidenciadas com um teor bastante significativo no estudo feito por De Oliveira e colaboradores (2012), visando utilizá-las como marcador químico na formulação semissólida.

Com isso, foi preparada uma coluna cromatográfica (**Figura 11**) utilizando uma coluna com 61,0 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro. A sílica de fase reversa quimicamente ligada ao grupamento C18 foi utilizada como fase estacionária e ocupou 18,5 cm de todo o comprimento da coluna. Inicialmente, a sílica foi misturada ao metanol e em seguida, essa solução foi adicionada a coluna. Após esperar a fase estacionária ocupar 18,5 cm de comprimento na coluna, a sílica foi estabilizada com a adição de 50 mL da fase móvel composta por MeOH: H₂O. Entretanto, os gradientes dessa fase variaram a MeOH 100%, 70%, 50%, 10% e por

fim água 100%. Ao obter gradiente em água 100%, foi aplicado 54,2 mg da fração acetato de etila. Todavia, para solubilizar a amostra foram adicionados 1200 μL de MeOH e 600 μL de água; antes de aplicar a amostra, o béquer contendo a mesma foi colocado em banho-maria por alguns minutos para evaporar o metanol e aplicar a amostra em água com o mínimo possível de MeOH. Após aplicar a amostra foram adicionados 50 mL de água destilada e os gradientes da fase móvel foram variando até obter gradiente de MeOH 100% (**Tabela 5**). Com a finalidade de aumentar o fluxo da coluna e otimizar o tempo, utilizou-se uma bomba durante todo o processo de eluição da coluna e isolamento das subfrações.



Figura 11: Coluna cromatográfica após a aplicação da amostra de fração acetato de etila.

Tabela 5: Representa o número do frasco que acondicionou as amostras coletas nesses gradientes.

Nº do frasco	Gradiente (%)
01-03	MeOH: H ₂ O (0:100)
04-17	MeOH: H ₂ O (10:90)
18-19	MeOH: H ₂ O (15:85)
20-22	MeOH: H ₂ O (20:80)
23-27	MeOH: H ₂ O (30:70)
28-30	MeOH: H ₂ O (40:60)
31-33	MeOH: H ₂ O (50:50)
34-36	MeOH: H ₂ O (60:40)
37-40	MeOH: H ₂ O (70:30)
41-44	MeOH: H ₂ O (80:20)
45-47	MeOH: H ₂ O (90:10)
48	MeOH: H ₂ O (100:0)

Ao terminar a cromatografia em coluna, as subfrações coletadas em frascos foram levadas para evaporar em banho-maria e concomitantemente, foi feita a cromatografia em camada delgada (CCD) das mesmas, visando juntar as subfrações pela semelhança entre o fator de retenção. O eluente utilizado na fase móvel foi BAW (8:1:1) e o sulfato cérico foi utilizado como revelador; a alíquota das subfrações foi aplicada na cromatoplaça 20 vezes. Após reunir as mesmas e evaporar todo o metanol presente nas amostras, às mesmas foram congeladas e colocadas para liofilizar. Enquanto as subfrações 38 a 48 estavam evaporando no banho-maria as mesmas foram contaminadas por uma amostra hexânica que também estava evaporando e por esse motivo foram descartadas.

Após liofilizar as subfrações, as mesmas foram pesadas em balança semi-analítica (**Tabela 6**) e reservadas para as análises em CLAE-DAD. A subfração 1-17 (ou PM1) não foi analisada por CLAE visto que ao fazer análise prévia por CCD não foi detectado a presença de substâncias cromóforas, sendo a sua massa apenas quantificada para o cálculo do rendimento da coluna. A subfração purificada (PM18) foi analisada por RMN (**Figura 12**).

Tabela 6: Relação entre o código das subfrações e suas respectivas massas.

Subfrações	Código	Massa (g)
1-17	PM1	0,0287
18-22	PM18	0,0053
23-27	PM23	0,0175
28-32	PM28	0,0062
33-37	PM33	0,0023

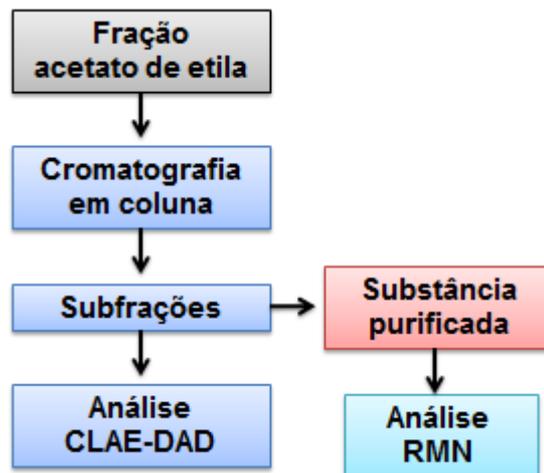


Figura 12: Resumo esquemático de procedimentos empregados à fração acetato de etila.

4.5. Obtenção do creme não iônico

Para a obtenção do creme não iônico empregou-se o método de emulsificação. Primeiramente, pesou-se aproximadamente 1,0 g de miristato de isopropila líquida em um gral de vidro previamente tarado. Posteriormente, pesou-se 0,8 g do estearato de glicerina e 0,5 g de álcool cetostearílico etoxilado, sendo estes adicionados ao gral e levados para aquecer sob temperatura de 65 °C. Em um erlenmeyer pesou-se 7,7 g de água destilada e esta também foi levada para aquecer. Após completar a fusão dos componentes da fase oleosa e início da fervura da fase aquosa, a mesma foi adicionada aos poucos a fase oleosa e misturando os componentes das fases com o auxílio de um pistilo de vidro. Após adicionar toda a água destilada, os excipientes das fases começam a se fundir e apresentar uma forma semissólida. Ao observar isso, a amostra foi retirada do aquecimento e então, reservada em local até atingir a temperatura ambiente. A **Tabela 7** a seguir representa o percentual (p/p) de cada excipiente da formulação necessário para se obter um creme de massa final igual a 10 gramas.

Tabela 7: Percentual das massas de cada excipiente.

Creme não iônico	
Excipientes	(p/p)
Estearato de glicerina	8%
Álcool ceto estearílico etoxilado	5%
Miristato de isopropila líquida	10%
Água destilada (qsp.)	10g

4.6. Obtenção do creme não iônico à base de *P. mucronata*

O creme não iônico contendo o extrato bruto de *Passiflora mucronata* foi preparado em três concentrações diferentes: 0,12%, 0,25% e 0,50% (p/p). Portanto, foram preparadas três amostras de creme nessas respectivas concentrações. O procedimento farmacotécnico para o preparo dos cremes descritos neste item foi semelhante ao descrito no item 4.5. A diferença é que o extrato bruto foi pesado primeiro no gral tarado e posteriormente, foram adicionados nessa ordem o miristato de isopropila líquida, o estearato de glicerina e o álcool ceto estearílico, sendo o extrato adicionado na fase lipofílica. Além disso, as massas de cada excipiente pesadas não foram exatas, mas, foram bem próximas dos valores médios, conforme observado na **Tabela 8** a seguir.

Tabela 8: Relação das massas pesadas para obter cada formulação.

Creme não iônico contendo extrato bruto de <i>P. mucronata</i>			
Excipientes	Creme a 0,12% Massas (g)	Creme a 0,25% Massas (g)	Creme a 0,50% Massas (g)
Estearato de glicerina	0,807	0,803	0,804
Álcool ceto estearílico etoxilado	0,509	0,502	0,502
Miristato de isopropila líquida	1,004	1,010	1,016
Água destilada (qsp.)	7,684	7,761	7,766
Extrato de <i>P. mucronata</i>	0,012	0,025	0,050

4.7. Obtenção do gel não iônico base

O gel base foi preparado por gelificação a frio em geral, na concentração de 1%. Inicialmente, pesou-se 1 g de Natrosol[®] (hidroxietilcelulose - HEC) (**Figura 13**) e este foi umectado com um pouco de água até entumecer e com o pistilo foi feita a incorporação da água e desfazendo os grumos. Neste processo adicionou-se 60 mL. Por fim, incorporou-se aproximadamente 39 mL de água restante. Foi preparado aproximadamente 100 g de gel.

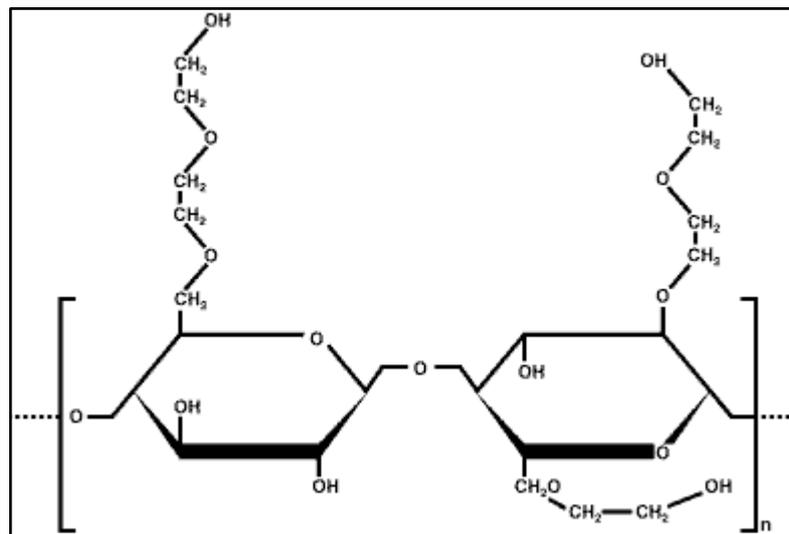


Figura 13: Fórmula estrutural do polímero hidroxietilcelulose.

(Fonte: http://www.gianniberti.it/Editoriali/aaq/Natrosol/bro_nat_chemistr.html)

4.8. Obtenção do gel não iônico à base de *P. mucronata*

A partir do gel base descrito no item 4.7 foi preparado 50 g do gel contendo o extrato bruto de *Passiflora mucronata*. Sendo assim, pesou-se 49,9990 g do gel base e 0,150 g do extrato bruto de *Passiflora mucronata*, sendo este último diluído em 2 mL de EtOH e incorporado ao gel base com o auxílio de um pistilo até que os ingredientes tornassem homogêneos. Essa formulação foi codificada como **gel 001**. Essa formulação foi utilizada nas análises por CLAE-DAD e também no ensaio biológico para testar a atividade cicatrizante, no entanto, devido a fatores externos não previstos a avaliação biológica foi comprometida e com isso, não foi possível obter resultados confiáveis. Dessa forma, consideraram-se apenas as análises por CLAE-DAD para essa formulação gel 001.

Quando acabou a formulação preparada acima, foi preparada mais 20 g do gel contendo o extrato bruto de *Passiflora mucronata*, o qual foi utilizado nos ensaios biológicos e análises por CLAE-DAD. Com isso, foram pesados 19,9995 g de gel base e posteriormente, pesou-se 0,0550 g de extrato o qual foi diluído com 1 mL de EtOH e incorporado ao gel base com o auxílio de um pistilo até que os ingredientes tornassem homogêneos. Essa formulação foi codificada como **gel 002**.

A concentração final de ambas as formulações preparadas foram de 0,3% p/p.

4.9. Análise das amostras por CLAE-DAD

O extrato bruto, os cremes e os géis com e sem o extrato bruto, as subfrações isoladas na técnica de cromatografia em coluna e a rotina padrão foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em aparelho Shimadzu Proeminence equipado com detector ultravioleta em arranjo de diodos (CLAE-DAD). Nas análises foi utilizada a coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 µm; Nucleosil e Nucleodur[®]), vazão de 1,0 mL/min. Foram injetados 20 µL tanto das amostras de rotina padrão quanto das demais amostras. Os comprimentos de onda utilizados para a detecção foram 254 e 340 nm. Os solventes usados para análise em CLAE-DAD foram a grau espectroscópico para HPLC, oriundos da Tedia[®] e a água utilizada nas análises foi purificada pelo sistema Elga Purelab. Dessa forma, para eluição das amostras utilizou-se o gradiente de H₂O Milliq (pH 3,2 ajustado com H₃PO₄) e acetonitrila de conforme a **Tabela 9** a seguir.

Tabela 9: Método de eluição da fase móvel em CLAE.

T (min.)	% Acetonitrila
0-10	2
10-30	18
30-35	22
35-45	100
45-48	100
48.01-60	2

4.9.1. Preparo das amostras para análise por CLAE-DAD

4.9.1.1. Subfrações da coluna

As amostras purificadas ou semi-purificadas PM18, PM23, PM28 e PM33 obtidas após a técnica de cromatografia em coluna foram analisadas em cromatógrafo (CLAE-DAD) para confirmar pureza cromatográfica das mesmas antes de encaminhar para a análise de RMN. Dessa forma, foram pesados 0,5 mg de cada subfração e cada massa foi diluída em 500 μ L de MeOH e água ultrapura, porém, em gradientes diferentes, conforme mostra a **Tabela 10**.

Tabela 10: Gradiente de diluição utilizado em cada amostra.

Subfração	% MeOH
PM18	80
PM23	70
PM28	50
PM33	100

4.9.1.2. Cremes não iônicos

Inicialmente, pesou-se 1 g de cada amostra de creme nas concentrações de 0,12%, 0,25%, 0,50% (p/p) e o creme sem o extrato em frascos previamente tarados e diluiu em 3 mL de uma solução de acetonitrila: água Milliq (1:1). Devido à viscosidade e o teor de gordura presente nos excipientes da forma farmacêutica, estas amostras foram filtradas no filtro Millipore 0,45 μ m. Após filtrar, obteve-se 1 mL da solução e em seguida adicionou-se a esse 1 mL mais 2 mL da solução de acetonitrila: água Milliq. Esses 3 mL foram centrifugados, transferidos para um vial e analisados com n=1 cada amostra. A concentração final das amostras foi de 0,1 g/mL.

4.9.1.3. Extrato bruto de *P. mucronata*

Em frascos previamente tarados foram pesadas as seguintes massas do extrato bruto 0,006 g; 0,0125 g e 0,025 g. Essas massas foram diluídas em 5 mL da solução preparada de acetonitrila: água Milliq (1:1). Após diluir, as amostras foram transferidas para os eppendorf, os quais foram centrifugados e por fim o

sobrenadante foi transferido para o vial e analisadas com n=1 cada amostra. A concentração final das amostras foram de 0,0012 g/mL, 0,0025 g/mL e 0,0050 g/mL. Essas amostras foram preparadas para obter o perfil cromatográfico do extrato e comparar qualitativamente este perfil com as amostras de creme não iônico preparadas no item **4.9.1.2**.

4.9.1.4. Géis não iônicos

Foram feitas duas análises por CLAE-DAD em dias distintos das amostras de gel não iônico contendo extrato bruto de *P. mucronata*. Portanto, na primeira análise foi pesado 0,500 g de **gel 001** e essa massa foi diluída em 2,5 mL de MeOH, em seguida, foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para o vial.

Na segunda análise foi pesado 0,550 g de **gel 002**, o qual foi diluído em 2 mL de MeOH, em seguida a solução foi centrifugada e o sobrenadante transferido para o vial. Juntamente com essa amostra gel 002 foi preparada também a amostra de gel base, sendo pesado 0,550 g de gel base e diluído em 2 mL de MeOH, em seguida, foi centrifugado e amostra transferida para o vial.

Todas as amostras de gel foram analisadas em triplicata e a concentração final da amostra **gel 001** foi de 0,200 g/mL enquanto que a amostra **gel 002** foi de 0,275 g/mL.

4.9.1.5. Extrato bruto de *P. mucronata*

O extrato bruto de *P. mucronata* foi preparado em duas concentrações diferentes 14,8 mg/mL (amostra concentrada) e 0,74 mg/mL (amostra diluída). Ambas as amostras foram diluídas em MeOH, centrifugadas e transferidas para o vial. As mesmas foram analisadas em triplicata. Os perfis cromatográficos dessas amostras de extrato foram comparados de forma qualitativa com os perfis do **gel 002**. A amostra diluída foi preparada nessa concentração para fins de comparação com o gel 002, visto que em 0,275 g/mL tem 0,75 mg de extrato.

4.9.1.6. Rutina padrão

Inicialmente, foram preparadas soluções de rutina em cinco concentrações diferentes (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL e 62,5 µg/mL), visando

avaliar a o perfil cromatográfico da solução padrão de rutina no método de eluição utilizado, bem como, a viabilidade de utilizar essas concentrações para quantificar os flavonoides totais na amostra de gel 001. As cinco soluções de rutina foram preparadas através da diluição em série, conforme representado na **Figura 14**. Após preparar as soluções, as mesmas foram transferidas para os vials e analisadas em unicata, juntamente a essas foram analisadas as amostras de gel 001(n=3) e subfrações isoladas da fração acetato de etila (n=1 cada).

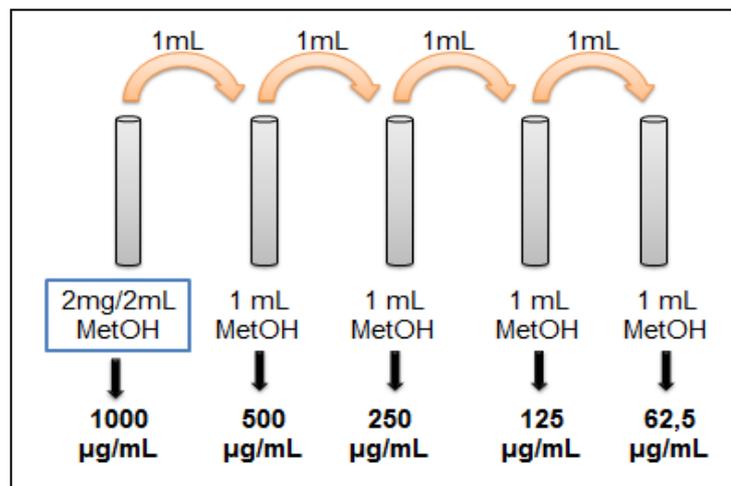


Figura 14: Ilustração esquemática da diluição da rutina padrão I.

Entretanto, devido à dificuldade de quantificar os flavonoides totais presentes na amostra de gel 001 foram preparadas soluções de rutina padrão mais diluídas, em cinco concentrações distintas, 0,15 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,6 µg/mL; 1,2 µg/mL e 2,4 µg/mL, as quais foram obtidas por diluição. Inicialmente, foram pesadas 10 mg de rutina padrão que foram diluídas com MeOH em balão volumétrico de 100 mL, obtendo uma concentração igual a 100 µg/mL. A partir dessa primeira solução retirou-se 240 µL e transferiu para um balão volumétrico de 10 mL e este foi completado com MeOH, obtendo-se concentração igual a 2,4 µg/mL. Através dessa solução foi feita a diluição em série das demais concentrações, onde foram preparadas as outras quatro concentrações. Foram adicionados previamente em quatro vial 500 µL de MeOH e em seguida, 500 µL mL da solução anterior, ou seja, realizando a diluição em série e sempre homogeneizado bem a solução antes de transferir para o vial seguinte, conforme a **Figura 15**. Após preparar as soluções, as mesmas foram analisadas em cromatógrafo.

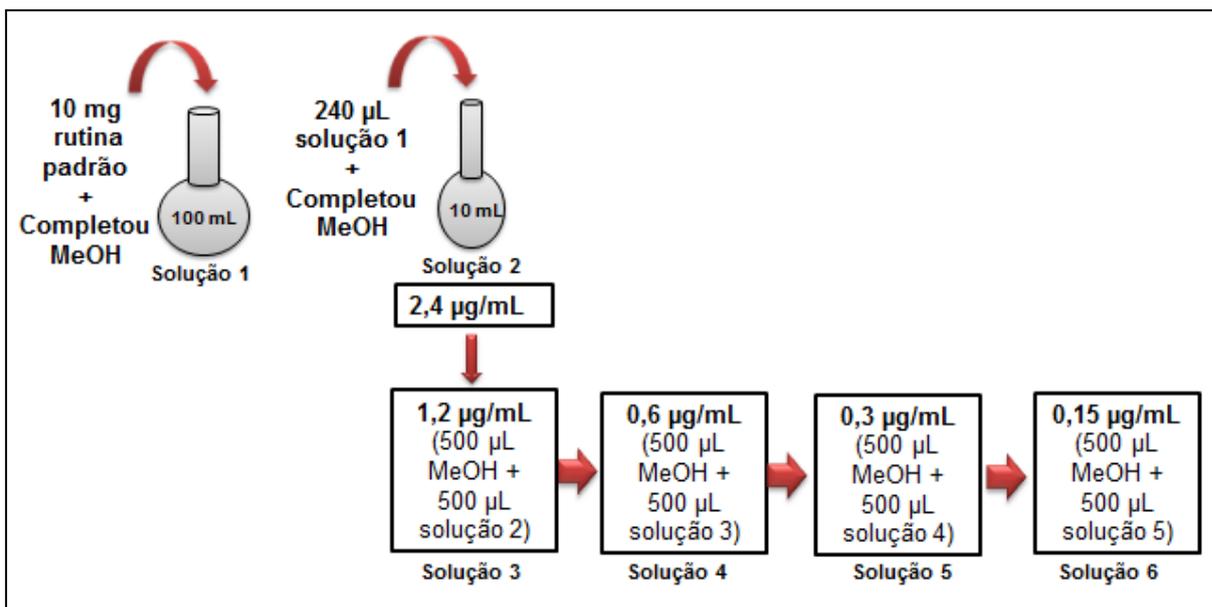


Figura 15: Ilustração esquemática da diluição da rutina padrão II.

A quantificação de flavonoides totais presente na formulação **gel 001** à base de *P. mucronata* foi feita utilizando como parâmetro a curva de calibração da rutina contendo cinco concentrações diferentes da substância, 0,15 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,6 µg/mL; 1,2 µg/mL e 2,4 µg/mL. Cada solução foi analisada em triplicata no cromatógrafo, com volume de injeção de 20 µL. As medidas das áreas dos picos de cada uma das amostras foram lançadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações nas abscissas. A equação da reta obtida é expressa por $y=a+bx$, onde o coeficiente angular (a) é a inclinação da reta em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) é a interseção da reta com o eixo y.

4.10. Elucidação estrutural do composto isolado

Para a elucidação estrutural do composto isolado da fração acetato de etila foi utilizado o método espectroscópico de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram obtidos no equipamento Agilent 400-MR, operando a 400 MHz e a 100 MHz, na frequência do hidrogênio (^1H) e do carbono (^{13}C), respectivamente. O solvente utilizado na dissolução da amostra para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e dos espectros de RMN 2D de HSQC, HMBC e COSY foi o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm), sendo que o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como

padrão interno. Essas análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN/UFRJ).

4.11. Ensaio biológico

4.11.1. Avaliação da atividade cicatrizante do gel não iônico à base de *P. mucronata*

Para a realização do experimento utilizou-se ratos, da linhagem Wistar pesando entre 180-200 g e estes foram anestesiados com a associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Após tricotomia do dorso foi realizada excisão da epiderme e derme com área de 1 cm². Após o procedimento os animais foram mantidos em caixas individualizadas e divididos de forma aleatória em três grupos com n>4 cada grupo:

- Grupo 1: animais sem tratamento.
- Grupo 2: controle, animais tratados com gel sem extrato bruto de *P. mucronata*.
- Grupo 3: animais tratados com gel à base de *P. mucronata*.

Os animais foram mantidos no Biotério e recebiam água e comida *ad libitum*. Passado um dia da cirurgia iniciou-se o tratamento que compreendia em aplicar aproximadamente 200 mg do **gel 002** na ferida de 1 cm² dos animais, diariamente, exceto nos finais de semana. O processo de cicatrização foi avaliado por meio de fotografias realizadas perpendicularmente à ferida utilizando câmera digital. As fotos foram adquiridas em 1, 3, 7, 10 e 14 dias após a cirurgia e a área da ferida aberta calculada por meio do programa ImageJ. Todos os procedimentos envolvendo cuidados e uso de animais de laboratório foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais do CCS-UFRJ (MACAE 003). Esse ensaio foi realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé em colaboração com o Prof. Dr. André Gustavo Calvano Bonavita.

4.11.2. Análise estatística

Os resultados da atividade cicatrizante foram expressos como média ± E.P.M. de *n* animais por grupo. A avaliação estatística dos dados foi realizada usando a análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Dunnett. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento das frações

A massa de extrato bruto de *P. mucronata* utilizada para fazer a partição foi de 6,9611 g. A partir dessa massa foi possível calcular o rendimento das frações obtidas após a partição líquido-líquido através da relação percentual da massa do material vegetal recuperado no processo e a massa total do extrato utilizado (**Equação 1**). Na **Tabela 11** encontram-se os rendimentos das frações.

$$\% p/p = \frac{\text{Massa obtida} \times 100\%}{\text{Massa total}} \quad (\text{Equação 1})$$

Tabela 11: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) de cada fração obtida a partir do extrato bruto de *Passiflora mucronata*.

Fração	Massa (g) obtida	Rendimento (% p/p)
Hexânica	1,1406	16,38
Diclorometano	0,5329	7,65
Aquosa residual	2,5915	37,22
Acetato de etila	0,1346	1,93
Butanólica	1,4265	20,49

5.2. Rendimento da coluna

A massa da fração acetato de etila aplicada na coluna foi de 0,0542g. A partir dessa massa e das massas de cada subfração obtidas foi possível calcular o rendimento das subfrações através da substituição dos valores na **Equação 1**, conforme está apresentado na **Tabela 12** a seguir:

Tabela 12: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) de cada subfração obtida da fração acetato de etila de *Passiflora mucronata*.

Código das Subfrações	Massa (g)	Rendimento (%p/p)
PM1	0,0287	52,95
PM18	0,0053	9,77
PM23	0,0175	32,28
PM28	0,0062	11,43
PM33	0,0023	4,24

5.3. Análise qualitativa das subfrações isoladas da fração acetato de etila

Após fazer a análise por CLAE-DAD das subfrações isoladas da fração acetato de etila de *P. mucronata* obteve-se os cromatogramas referentes às subfrações codificadas como PM18, PM23, PM28 e PM33. Com a análise prévia dos resultados obtidos das subfrações observou-se que somente a subfração PM18 estava purificada e que os picos majoritários de todas as subfrações analisadas apresentaram espectro de UV típicos de flavonoide, com bandas de absorção na região de 240-400 nm.

Segundo Chagas e colaboradores (2014) os flavonoides com esqueleto de flavona e flavonol produzem duas bandas de absorção características na região de 240-400 nm. Eles são conhecidos como banda I (300-380 nm), que está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B, e a banda II (240-280 nm), ocasionada pela absorção do sistema benzoil do anel A (**Figura 16**).

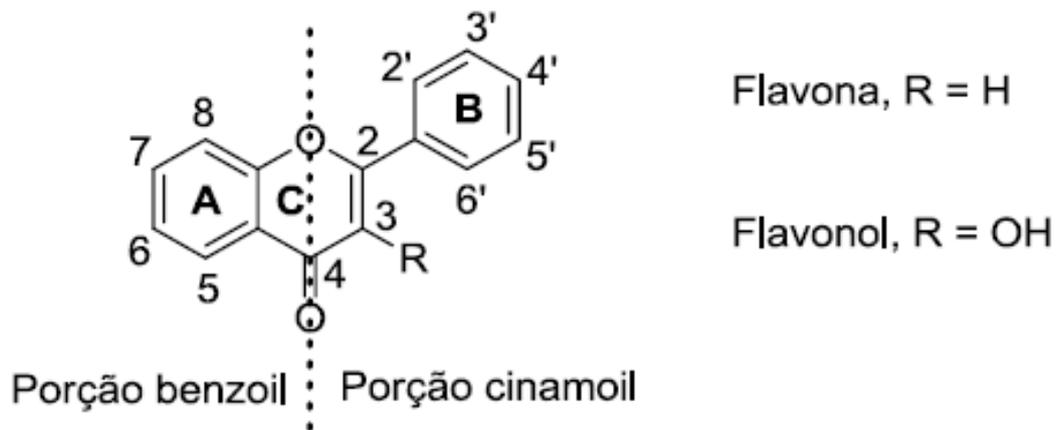


Figura 16: Estrutura básica de flavonas e flavonóis e as suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

Segundo Gomes (2013) os flavonoides C-glicosilados, principalmente, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, são os constituintes químicos mais frequentemente citados para as espécies de *Passiflora* e que apresentam ampla distribuição no gênero. Esse mesmo autor realizou um estudo para investigar nos perfis cromatográficos a presença dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e rutina de dezessete espécies de *Passiflora*, através da comparação destes perfis com os cromatogramas das soluções-padrão e espectros UV obtidos pelo detector de arranjo de diodo do aparelho de CLAE. Dentre as espécies estudadas estava à espécie *Passiflora mucronata* que foi detectada a presença de isoorientina, orientina, isovitexina e rutina (**Figura 17**).

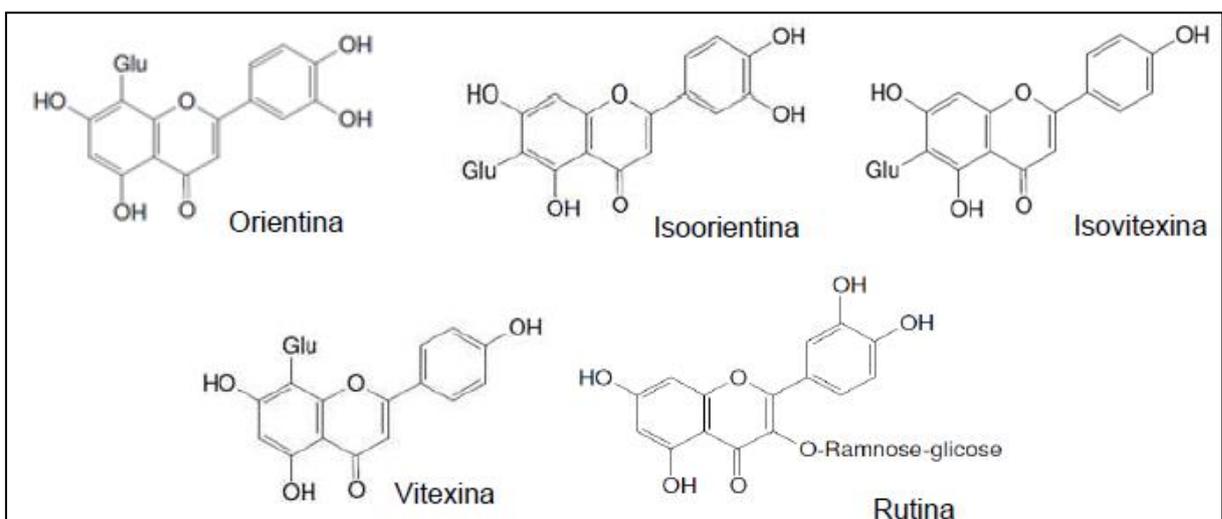


Figura 17: Estruturas químicas dos flavonoides orientina, isoorientina, isovitexina, vitexina e rutina. Glu=glicose (Fonte: GOMES, 2013)

Entretanto, ao fazer uma análise mais apurada dos resultados e compará-los com dados obtidos da literatura (BIANCO & SANTOS, 2003; PENG *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2011; FERNANDES, 2011; GOMES, 2013; CHAGAS *et al.*, 2014) foi possível fazer algumas observações e sugestões. A **Tabela 13** reúne as informações das faixas de absorção no UV características de algumas substâncias flavonoídicas que Gomes (2013) detectou na espécie *Passiflora mucronata* e em outras 16 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*.

Tabela 13: Comprimentos de onda de flavonoides encontrados em espécies de *Passiflora*.

Referências Bibliográficas	Comprimento de onda (nm)				
	Orientina	Isoorientina	Isovitexina	Vitexina	Rutina
BIANCO & SANTOS, 2003	-	-	-	270-332	-
PENG <i>et al.</i> , 2005	-	270-348	270-334	-	-
FERNANDES, 2011	-	-	-	267-341	-
MOURA <i>et al.</i> , 2011	-	-	-	-	257-356
COSTA <i>et al.</i> , 2011	266-348	270-348	270-337	-	-
GOMES, 2013	268-345	270-348	271-337	269-339	258-353
CHAGAS <i>et al.</i> , 2014		267-348	269-338		

Na comparação do comprimento de onda apresentados na **Tabela 13** com os obtidos nas análises das subfrações, observou-se na subfração PM18 (**Figura 18**) que o único pico majoritário com tempo de retenção (t_R) em 22,08 min e máximos de absorção no UV em 269 e 349 nm, parece ser sugestivo da presença do flavonoide isoorientina.

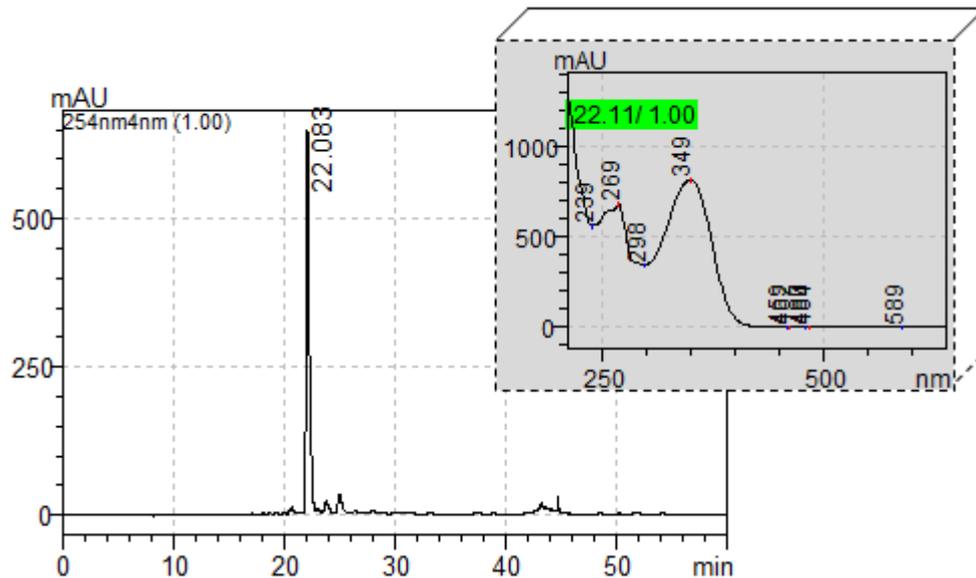


Figura 18: Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma e espectro de UV do composto isolado PM18 com picos de absorção no UV em 269 e 349 nm.

Em relação aos resultados da subfração PM23 (**Figura 19**), foram detectados três picos majoritários sendo que os picos com t_R em 28,04 e 29,84 min e máximos de absorção no UV em 269-337 nm e 255-354 nm, respectivamente, ao comparar com os dados da **Tabela 13**, sugere-se que o pico com t_R em 28,04 min seja a flavona isovitexina e o pico com t_R em 29,84 min seja a rutina. Além disso, ao comparar com espectro de absorção no UV da amostra de rutina padrão (**Figura 20**) analisada juntamente com subfrações, verificou-se que os máximos de absorção foram iguais aos obtidos nas análises das subfrações entre 255 e 354 nm.

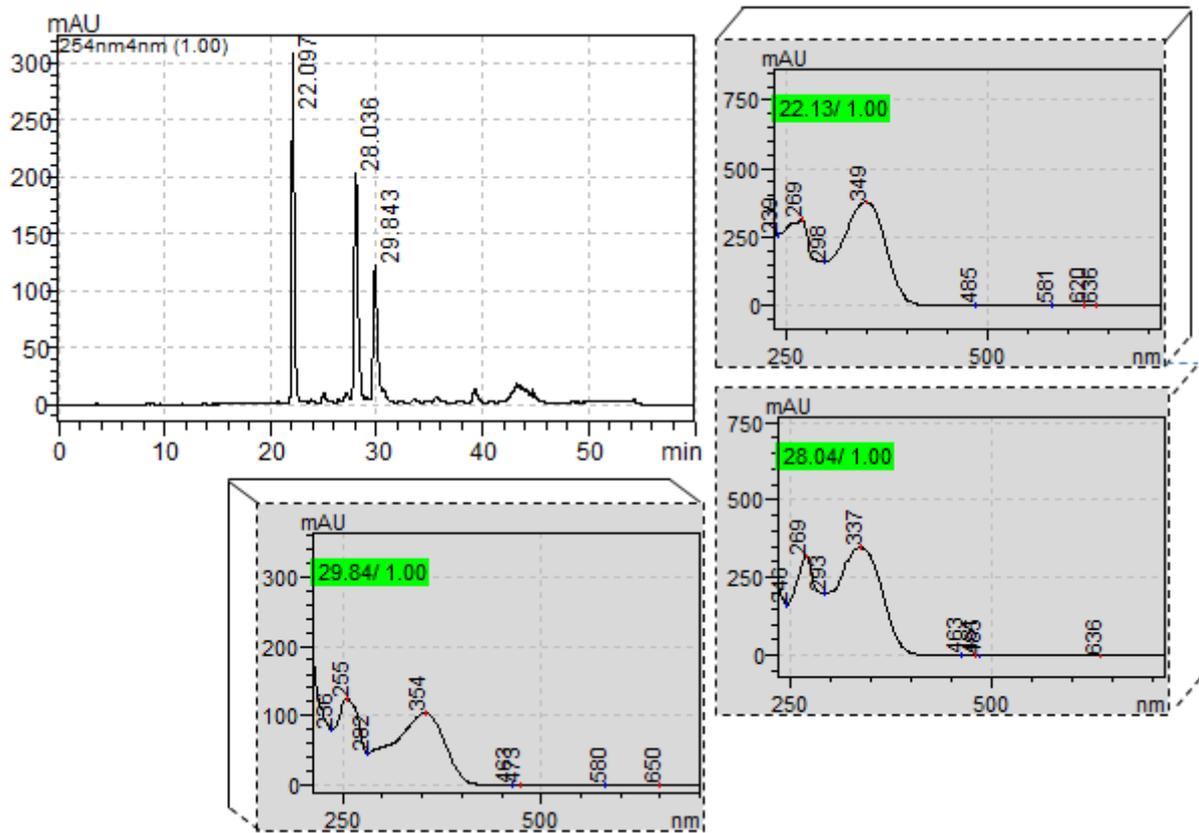


Figura 19: Cromatograma da subfração PM23 e espectros de UV referentes aos três picos majoritários dessa mesma subfração.

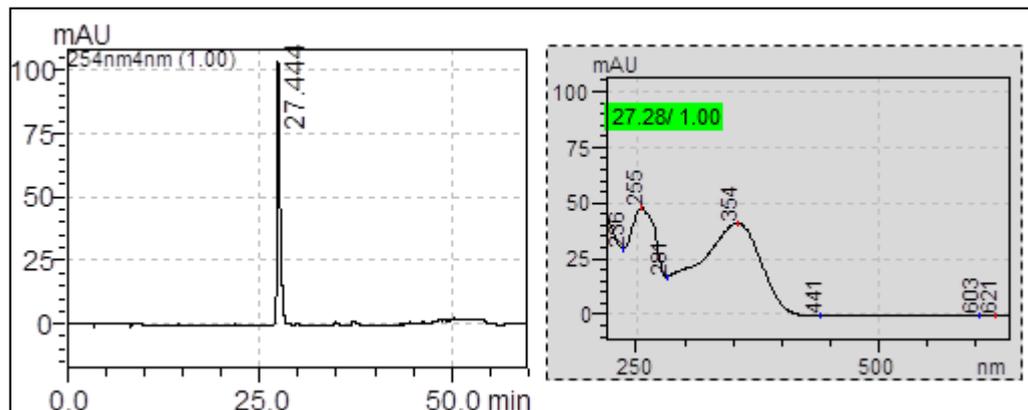


Figura 20: Cromatograma da solução padrão de rutina preparada na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e seu espectro de UV com picos de absorção na faixa de 255 e 354 nm.

Em relação aos resultados da subfração PM28 (**Figura 21**), notou-se quatro picos majoritários, entretanto, podemos destacar um pico com t_R em 30,67 que embora seja menor quando comparado aos outros majoritários, apresentou um

máximo de absorção no UV em 268 e 347 nm (**Figura 22**), ao comparar com os dados da **Tabela 13**, sugere-se que a substância detectada nessa faixa de absorção seja a flavona orientina.

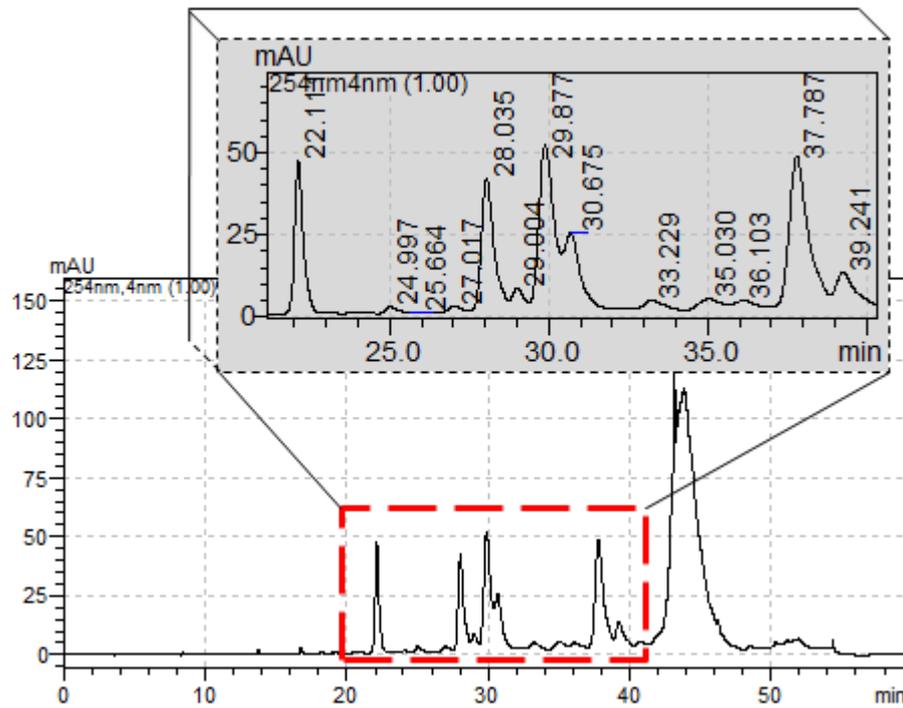


Figura 21: Cromatograma da subfração PM28 com zoom entre os t_R 20,0 e 40,0 min.

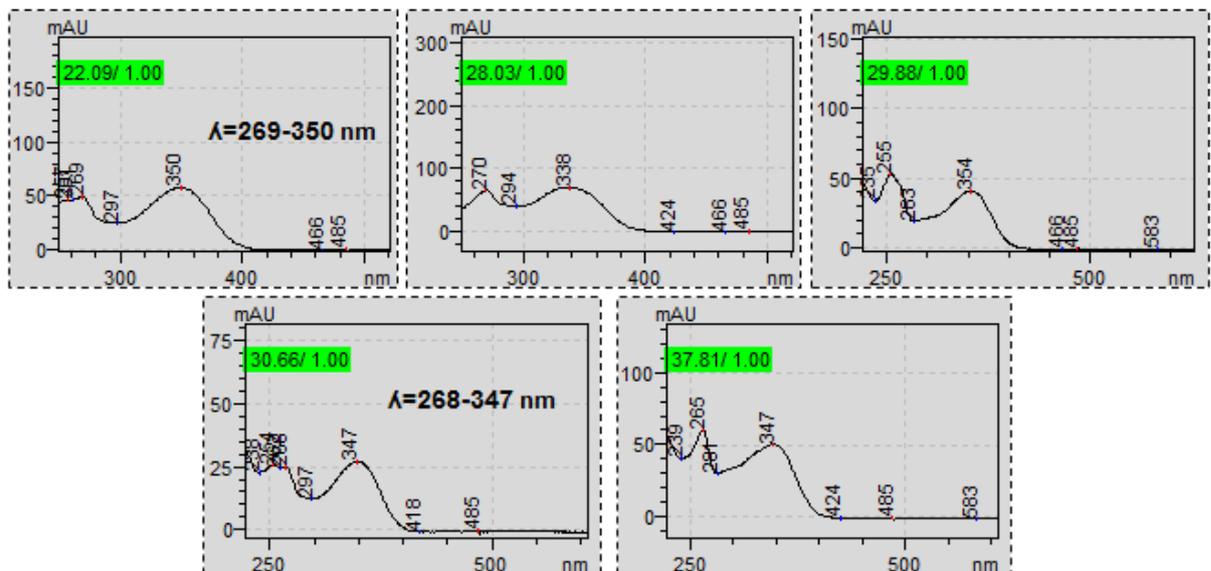


Figura 22: Espectros de UV dos picos característicos de flavonoides detectados entre os tempos de retenção 22,08 e 37,81 min.

Nos resultados da subfração PM33 (**Figura 23**), observou-se em seu cromatograma quatro picos em destaque com espectros de absorção no UV típicos de substâncias flavonoídicas, nos t_R de 22,09 min; 27,99 min; 28,99 min e 30,16 min (**Figura 24**). Entretanto, nota-se que apenas na subfração PM33 foi possível observar um pico com tempo de retenção em 27,98 min e ao comparar os picos de absorção obtidos com os dados da literatura apresentados na **Tabela 13**, sugere-se que a substância seja o flavonoide vitexina.

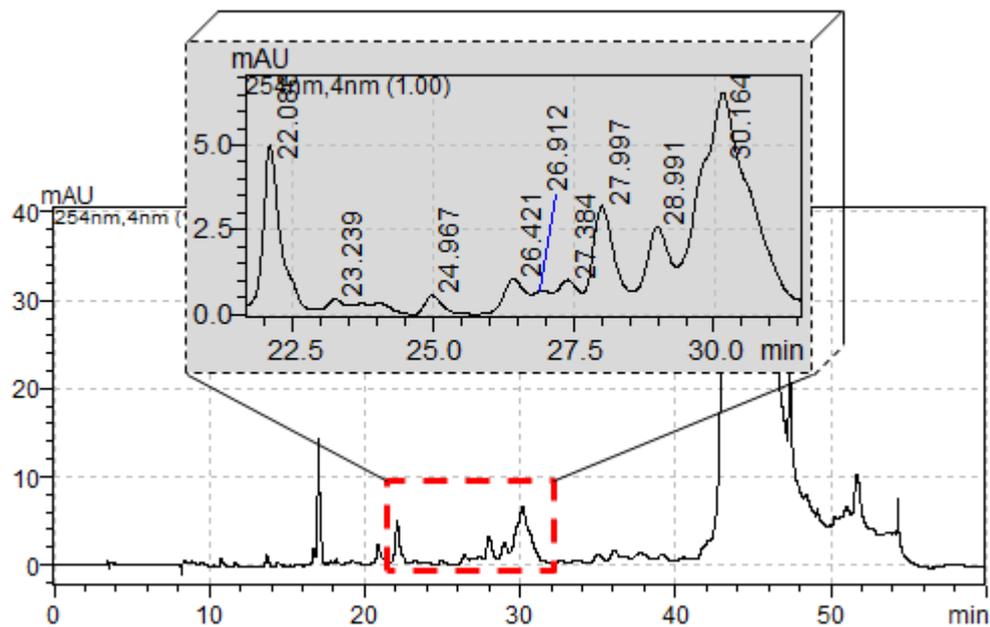


Figura 23: Cromatograma da subfração PM33 com zoom entre os t_R 21,0 e 31 min.

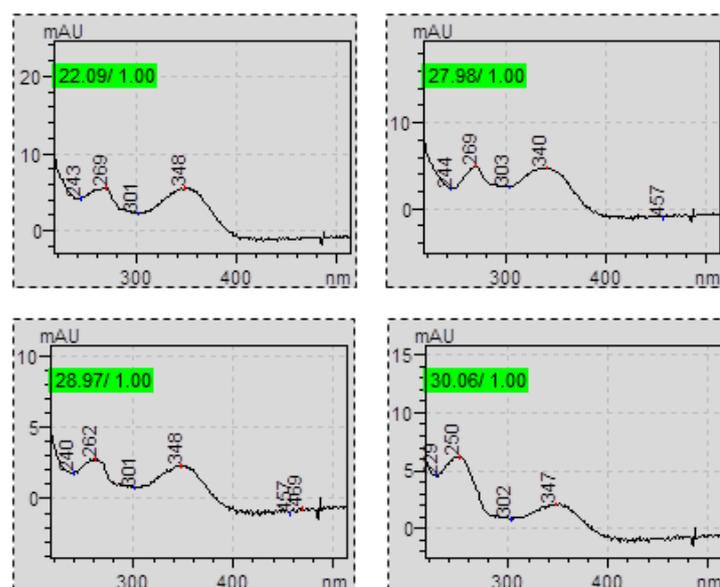


Figura 24: Espectros de UV de quatro picos principais com comprimentos de onda característicos de flavonoides.

Após comparação dos cromatogramas de cada subfração e verificação das áreas dos picos detectados em mais de uma amostra, observou-se que três picos com tempos de retenção em 22,0; 28,0 e 29,8 minutos apresentaram as maiores áreas (**Tabela 14**). Dessa forma, pode-se inferir que o composto isolado com tempo de retenção em 22,0 minutos é o flavonoide majoritário detectado no extrato bruto de *P. mucronata* e que estava concentrado na fração acetato de etila, conforme descrito no estudo de De Oliveira e colaboradores (2012).

Tabela 14: Soma das áreas dos principais picos observados mais de uma vez nas subfrações.

Subfração	T _R (min)	Área	T _R (min)	Área	T _R (min)	Área
PM18	22,083	12500495	-	-	-	-
PM23	22,097	5127620	28,036	4818118	29,843	2939377
PM28	22,111	876998	28,035	1116039	29,877	1656400
PM33	22,086	97958	28,991	76616	-	-
TOTAL		18603071		6010773		4595777

5.4. Elucidação estrutural do composto isolado

A substância codificada como PM18 isolada da fração acetato de etila foi obtida como um sólido amarelo pálido e a mesma foi analisada por CLAE, onde se observou no cromatograma gerado após análise, a sua pureza e o espectro de ultravioleta característico de flavonoide, conforme mostrado acima na **Figura 18**.

A proposta da fórmula estrutural da substância isolada foi possível a partir dos dados de RMN de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) obtidos em DMSO-*d*₆, utilizando as metodologias bidimensionais HSQC, HMBC e COSY, bem como, na comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 25**) de PM18 apresentou três sinais na região aromática do anel B com um dubleto em 7,41 ppm referente ao H-6' e um singleto em 7,39 ppm (*J*= 2,3 Hz) referente ao H-2', além de um dubleto em 6,87 ppm (*J*= 8,2 Hz) referente ao hidrogênio em H-5', evidenciando que o anel B do núcleo flavonoídico é 3',4'-di-hidroxilado. Em relação ao anel C, evidenciou-se um único singleto em 6,64 ppm que caracteriza uma flavona referente ao hidrogênio

olefínico H-3. Na caracterização do anel A, verifica-se um único singlete em 6,47 ppm referente ao hidrogênio H-8. Por fim, em 4,57 ppm ($J= 9,8$ Hz) observa-se um dubleto pertencente ao H-1", referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar em ligação C-C com a flavona, afinal, sinais entre 5,0 e 3,0 ppm indicam a presença de uma unidade de açúcar na molécula (BIANCO & SANTOS, 2003). Na região de 13,55 ppm observa-se um singlete referente ao hidrogênio do grupo –OH na posição 5 da aglicona, quelado à carbonila em 4.

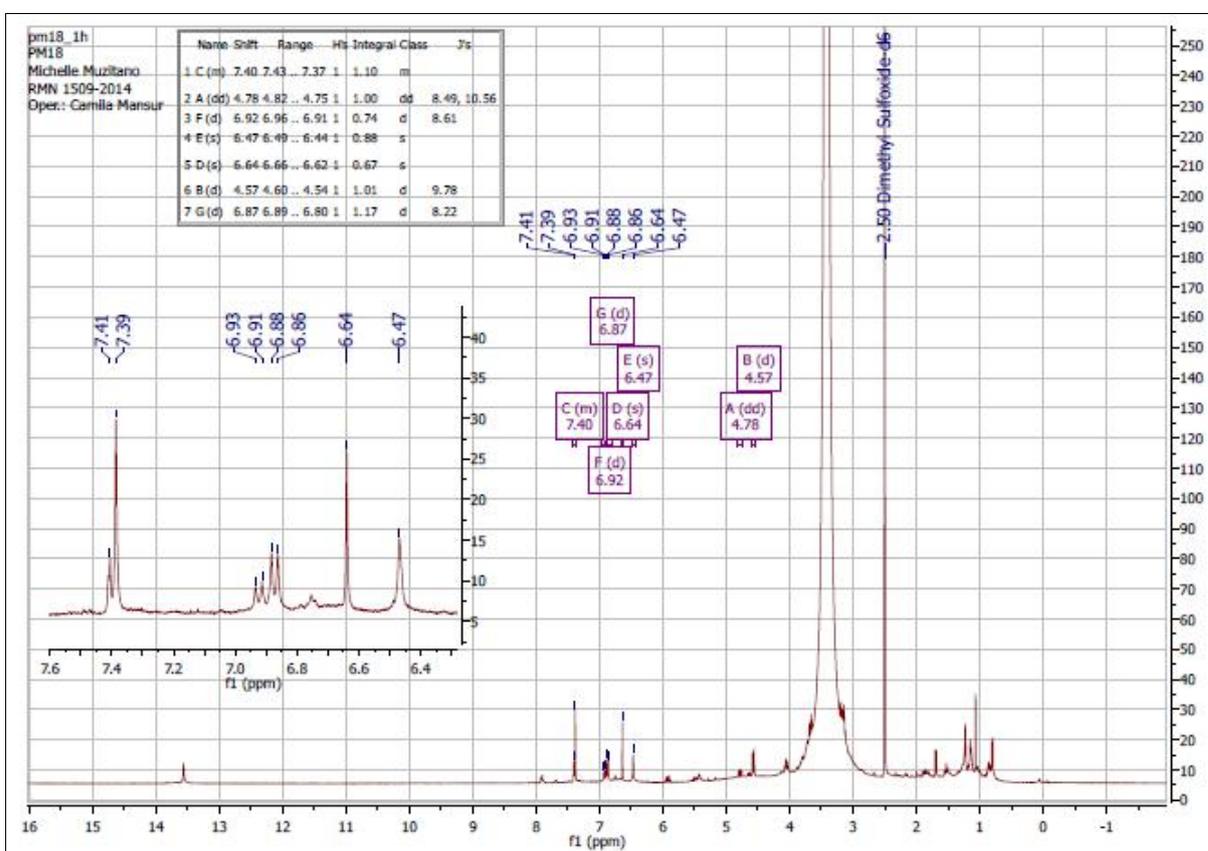


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz da amostra PM18 diluída em $\text{DMSO}-d_6$.

Nos resultados de RMN de ^{13}C obteve-se 20 sinais, onde quinze sinais foram atribuídos aos carbonos da aglicona e os cinco sinais restantes aos carbonos da unidade de açúcar apresentaram deslocamentos químicos entre 61,0 ppm e 80,0 ppm. Observou-se para o anel C da aglicona um sinal mais desprotegido, em 180,0 ppm o que confirma a presença de uma carbonila cetônica α - β insaturada em C-4. O sinal em 103,0 ppm refere-se ao C-3, enquanto que os sinais em 109,0 ppm (C-6) e

94,8 ppm (C-8) mostram que a unidade β -glicosídica deve estar ligada à posição 6 do anel A (FERNANDES, 2011).

A partir dos dados obtidos nos espectros de HSQC e HMBC foi possível estabelecer a correlação entre os hidrogênios e carbonos. Afinal, o espectro HSQC correlaciona um espectro de RMN ^{13}C com um espectro de RMN ^1H que se encontram dispostos no eixo vertical e da horizontal, respectivamente. A partir dos deslocamentos químicos observados nesse espectro é possível estabelecer uma correlação entre os átomos de hidrogênio e de carbono que se encontram diretamente ligados (PONTES, 2013). Enquanto que a técnica HMBC estabelece à correlação a longa distância entre carbonos e hidrogênios da molécula, a duas ou mais ligações de distância (DOS SANTOS, 2009).

Através da análise do espectro de HSQC foi possível detectar a correlação entre o hidrogênio anomérico (H-1'') com deslocamento químico em 4,57 ppm e o carbono (C-1'') diretamente ligado a esse H-1'' com sinal em 73,0 ppm, sinal este que não foi observado nos dados obtidos na análise de RMN de ^{13}C . Além disso, foi possível confirmar também a correlação entre H-8 e C-8, H-3 e C-3, H-5' e C-5', H-2' e C-2', H-6' e C-6', H-6'' e C-6'' através da convergência entre os seus deslocamentos químicos dispostos no eixo horizontal (RMN de ^1H) e vertical (RMN de ^{13}C), conforme mostra a **Figura 26**.

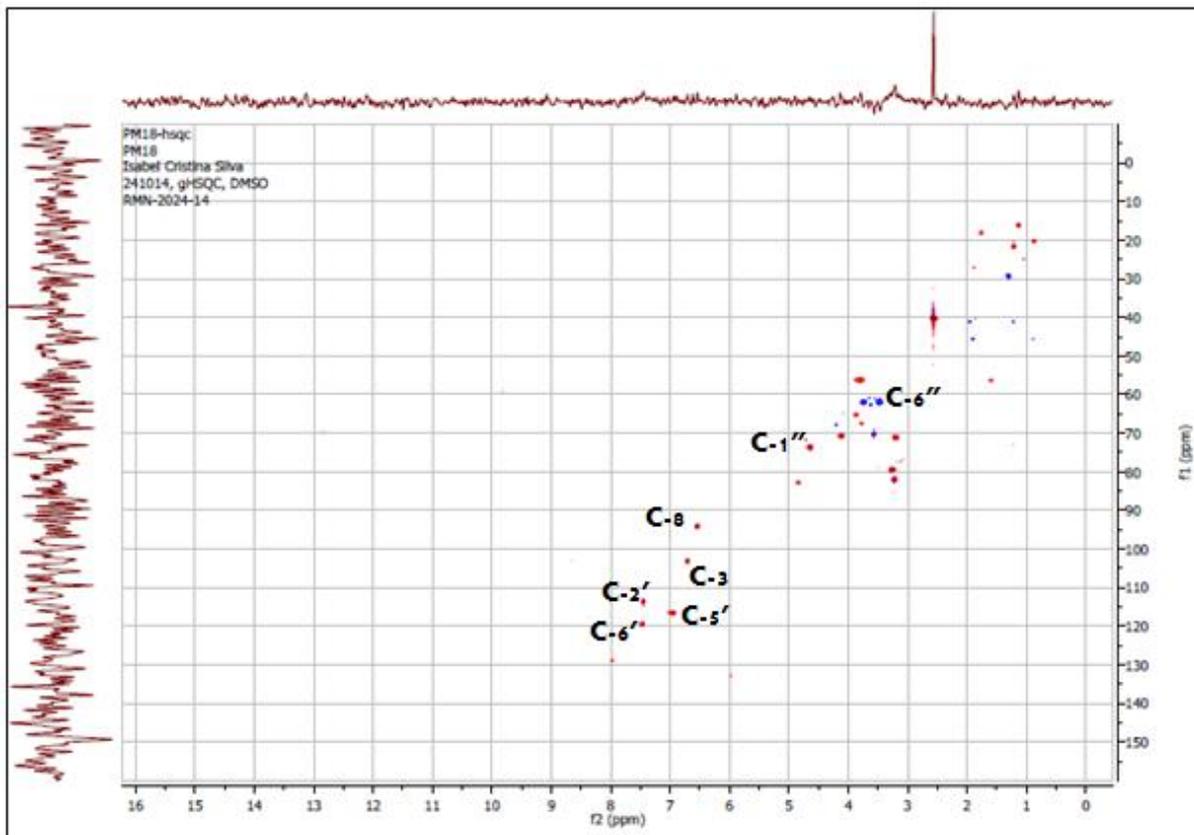


Figura 26: Espectro de RMN 2D-HSQC da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz. Os pontos vermelhos correspondem a grupos CH e CH₃ enquanto que os pontos azuis aos grupos CH₂.

No espectro de HMBC observa-se três sinais com deslocamento químico em 4,57 ppm referente ao hidrogênio anomérico (H-1''). Ao correlacionar esse deslocamento químico (H-1'') com os seus respectivos sinais dispostos no eixo vertical, referentes ao espectro de ¹³C, evidencia-se que o H-1'' acopla com os carbonos C-2'' (70,0 ppm), C-6 (109,0 ppm) e C-5 (161,0 ppm), confirmando que a molécula de glucose está ligada ao carbono C-6 da flavona. Além disso, observou-se também sinais entre 6,0-8,0 ppm (¹H) e 100-170 ppm (¹³C) referentes aos hidrogênios e carbonos da aglicona. No espectro de HMBC também foi detectado a correlação entre o hidrogênio da hidroxila (OH-5) em 13,55 ppm e os carbonos C-6 (109,0 ppm) e C-10 (102,0 ppm), conforme mostra a **Figura 27**.

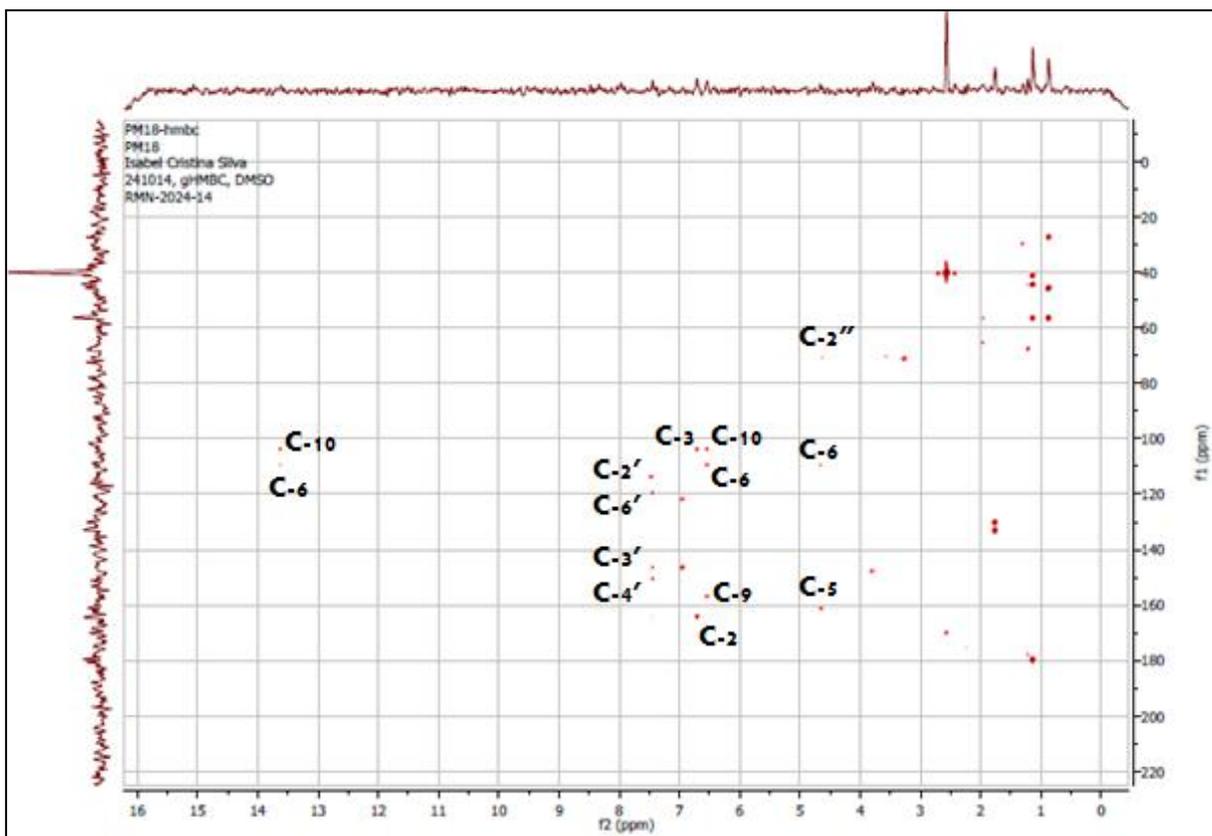


Figura 27: Espectro de RMN 2D- HMBC da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz.

A técnica espectroscópica COSY permite correlacionar e identificar deslocamentos químicos de hidrogênios da molécula através de seus acoplamentos sequenciados (COSTA, 2014).

A partir da análise do espectro de COSY foi possível identificar o deslocamento de alguns hidrogênios da unidade de açúcar (**Figura 28**).

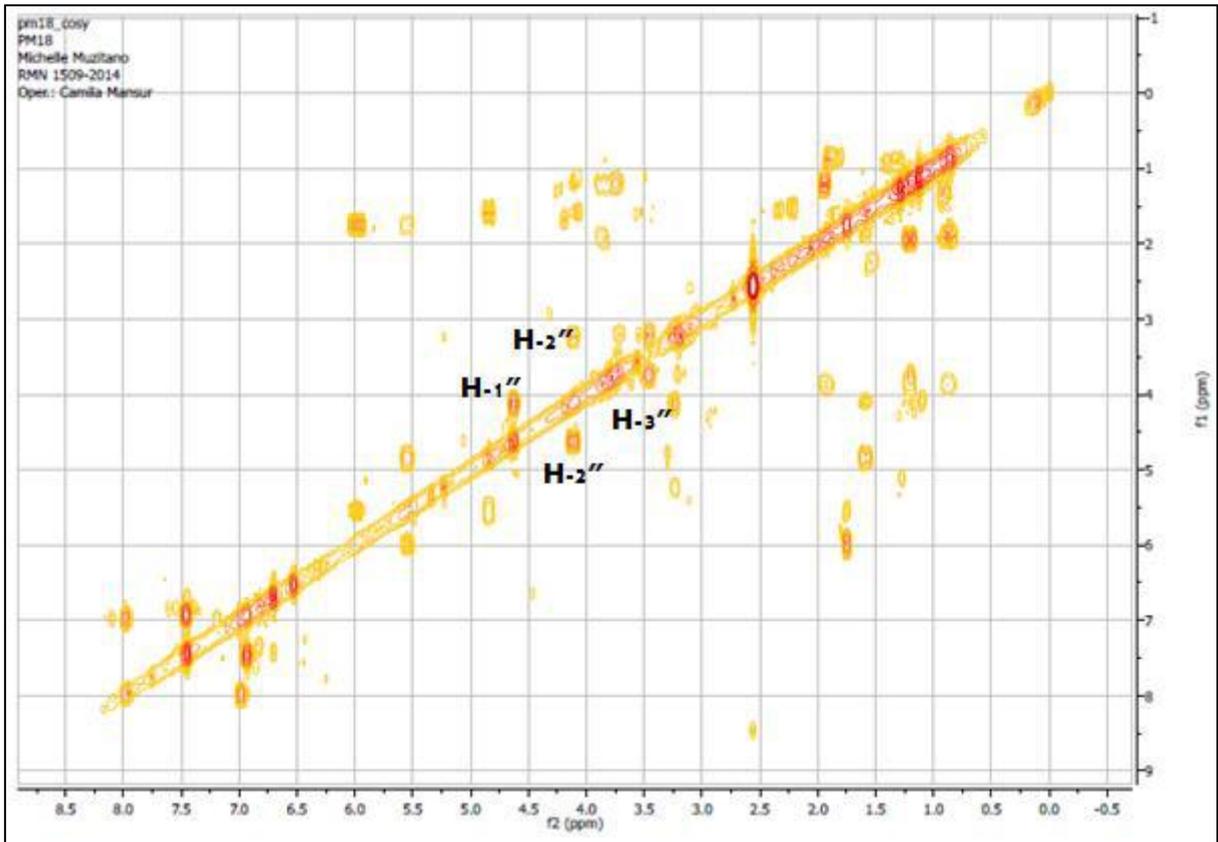


Figura 28: Espectro de RMN 2D- COSY da amostra PM18, em DMSO- d_6 , a 400 MHz.

A **Figura 29** representada abaixo permite identificar os carbonos da porção aglicona e glicona e correlacionar os resultados obtidos com os dados da literatura apresentados nas **Tabelas 14 e 15**.

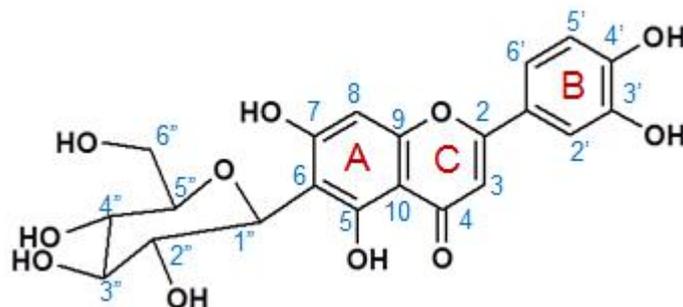


Figura 29: Representação estrutural da flavona isoorientina.

Tabela 15: Dados de RMN ^1H (400 MHz) do composto isolado PM18 e dados da isoorientina obtidos da literatura (PENG *et al.*, 2005; WEN *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2011).

Isolado PM18 (ppm)	Isoorientina PENG <i>et al.</i>, 2005	Isoorientina WEN <i>et al.</i>, 2007	Isoorientina COSTA <i>et al.</i>, 2011
4,57 H-1''	4,58 H-1''	4,58 H-1''	4,56 H-1''
7,39 H-2'	7,38 H-2'	7,42 H-2'	7,37 H-2'
6,87 H-5'	6,90 H-5'	6,89 H-5'	6,86 H-5'
7,41 H-6'	7,44 H-6'	7,38 H-6'	7,40 H-6'
6,64 H-3	6,64 H-3	6,49 H-3	6,64 H-3
13,55 OH-5	13,55 OH-5	-	13,55 OH-5
6,47 H-8	-	6,67 H-8	6,44 H-8

Tabela 16: Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) do composto isolado PM18 e dados da isoorientina obtidos da literatura (PENG *et al.*, 2005; WEN *et al.*, 2007).

Carbono (Posição)	Isolado PM18 (ppm)	Isoorientina PENG <i>et al.</i>, 2005	Isoorientina WEN <i>et al.</i>, 2007
2	164,0	163,4	163,2
3	103,0	102,4	102,8
4	180,0	181,5	181,8
5	161,0	160,6	156,2
6	109,0	108,9	108,8
7	165,0	163,4	163,6
8	94,8	93,7	93,5
9	156,0	156,3	160,7
10	102,0	102,8	103,4
1'	122,0	121,6	121,4
2'	114,0	112,9	113,3
3'	145,0	145,9	145,7
4'	150,0	150,4	149,7
5'	116,0	116,0	116,0
6'	120,0	118,8	118,9
1''	73,0*	73,2	73,0
2''	70,0	70,5	70,6
3''	75,0	78,9	79,0

4''	70,0	70,2	70,2
5''	80,0	81,4	81,5
6''	61,0	61,3	61,7

(*) O deslocamento químico (ppm) observado para o carbono C-1'' foi obtido através da técnica HSQC.

Portanto, após comparação dos resultados com os dados da literatura foi possível propor que a substância isolada é a luteolina-6-C- β -D-glicopiranosídeo, também conhecida como isoorientina (**Figura 30**).

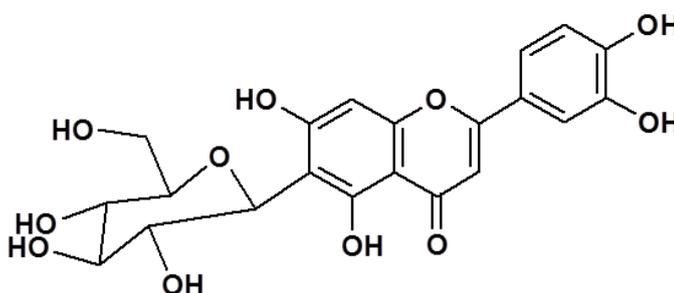


Figura 30: Estrutura química do composto PM18 (isoorientina) isolado de *P. mucronata*.

Os flavonoides C-glicosilados, derivados da apigenina e luteolina (vitexina, Isovitexina, orientina, isoorientina) têm sido implicados como os maiores constituintes bioativos presentes em *Passiflora sp.*, sendo observados como bons marcadores de qualidade para o gênero. Além disso, os mesmos possuem atividade biológica e são de interesse quimiotaxonômico, frequentemente utilizados como marcadores químicos na análise de medicamentos fitoterápicos (BELTRAMIN *et al.*, 2009). Com relação à isoorientina, estudos têm revelado atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, ação hepatoprotetora e atividade hipoglicemiante (FOLADOR, 2009).

5.5. Rendimento do creme

As massas de cada excipientes pesadas foram para o preparo de um creme de massa final à 10 g. Após o preparo de cada creme, os mesmos foram transferidos para um recipiente e quantificados. Ao substituir os valores de cada massa na **Equação 1** foi possível calcular o rendimento de cada creme preparado (**Tabela 17**). Observa-se que os cremes não apresentaram um rendimento de 100%,

apresentando perda de aproximadamente 11 a 18%. Isso pode estar relacionado a etapa de transferência da massa para outro recipiente.

Tabela 17: Relação entre as massas obtidas (g) e rendimento (%) dos cremes não iônicos à base de *Passiflora mucronata* e o creme não iônico branco.

Cremes não iônicos	Massa (g)	Rendimento (% p/p)
Branco	8,456	84,56
0,12%	8,218	82,18
0,25%	8,823	88,23
0,50%	8,809	88,09

5.6. Análise qualitativa I do experimento por CLAE-DAD

Esta técnica foi utilizada para obter o perfil cromatográfico do extrato bruto e das formulações de creme não iônico.

Após a análise obteve-se os cromatogramas do extrato bruto de *P. mucronata* (**Figuras 31, 32 e 33**) e dos cremes não iônicos preparados em três concentrações diferentes e identificados como creme 0,12% p/p, 0,25% p/p e 0,50% p/p (**Figuras 35,36 e 37**).

Ao analisar o perfil cromatográfico do extrato bruto de *P. mucronata* também preparado em três concentrações diferentes (0,0012 g/mL, 0,0025 g/mL e 0,0050 g/mL), notaram-se dois picos majoritários com tempos de retenção de 18,38 e 18,85 min nas três amostras do extrato analisadas e ambos os picos apresentam espectro de UV característico de compostos flavonoídicos. Além disso, os picos com tempos de retenção em 18,38 minutos referente a cada amostra de extrato analisada apresentaram áreas menores (Áreas: 10151; 36626; 49352, respectivamente) quando comparados aos picos com tempos de retenção em 18,85 minutos (Áreas: 15342; 466558; 68990).

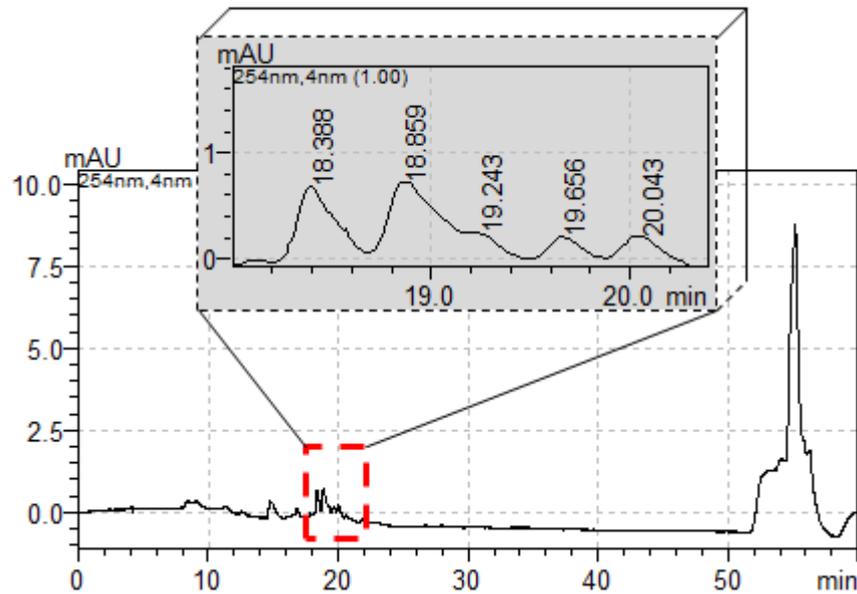


Figura 31: Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma do extrato bruto de *P. mucronata* na concentração de 0,0012 g/mL com zoom entre os t_R entre 18,0 e 20,0 min.

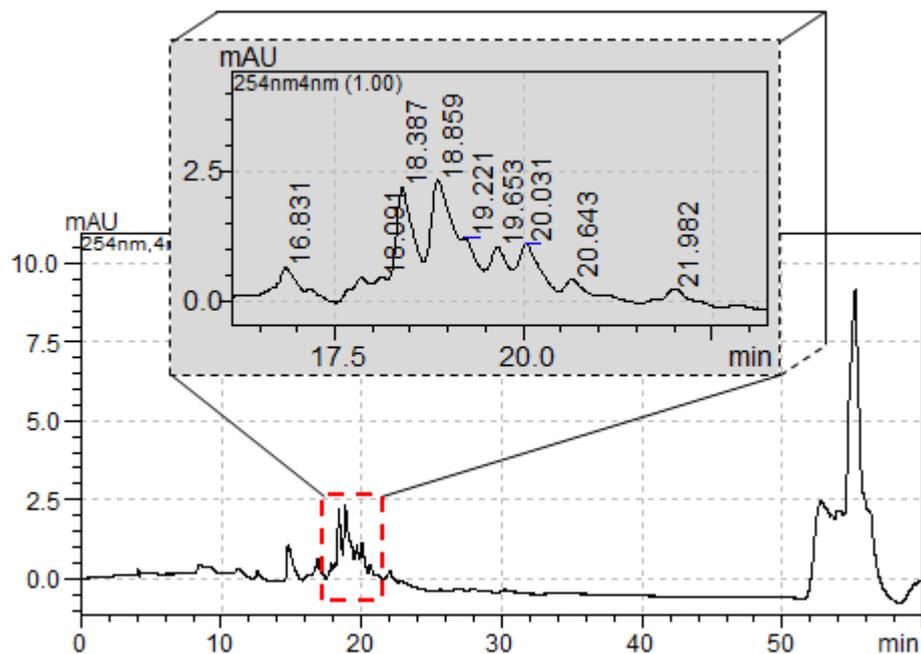


Figura 32: Cromatograma do extrato bruto de *P. mucronata* na concentração de 0,0025 g/mL com zoom entre os t_R 16,0 e 22,0 min.

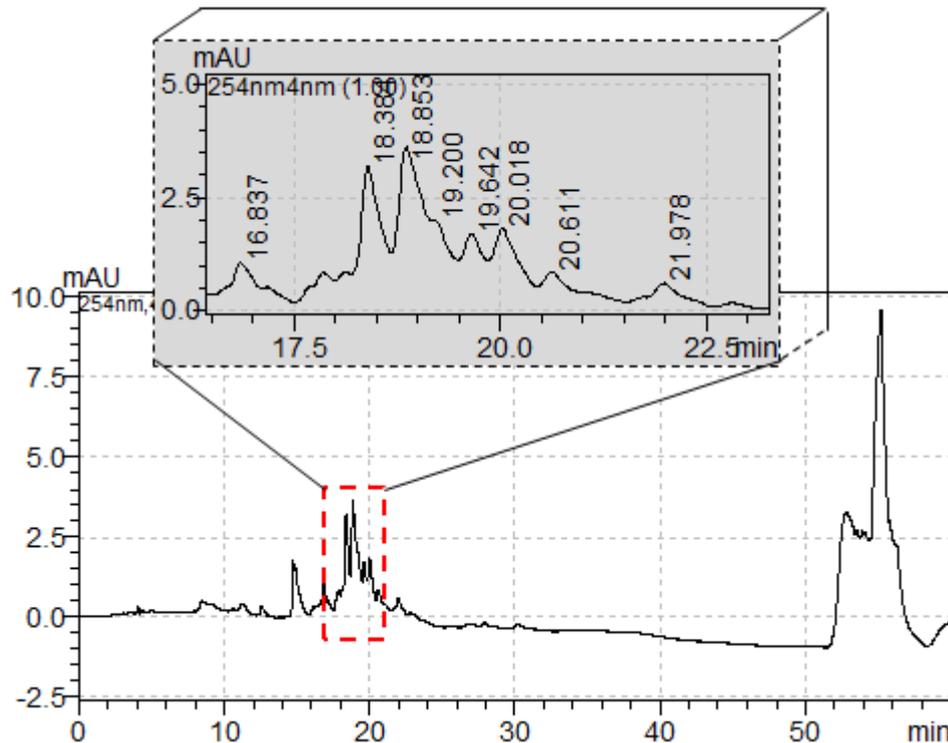


Figura 33: Cromatograma do extrato bruto de *P. mucronata* na concentração 0,0050 g/mL com zoom entre os t_R 16,0 e 22,5 min.

Os flavonoides com esqueleto flavona e flavonol são normalmente detectados em comprimentos de onda entre 240-400 nm (CHAGAS *et. al.*, 2014). Na **Figura 34** está representado o espectro de UV dos picos majoritários com t_R entre 18,37 e 18,87 minutos observados na amostra de extrato bruto preparado na concentração de 0,0012 g/mL. Dessa forma, a presença de flavonoide no extrato bruto de *Passiflora mucronata* pode ser justificada pelo espectro de UV, onde é possível observar as duas bandas características de flavonoide, sendo a primeira mais estreita e a segunda mais larga, com picos de absorção na faixa de 268-344 nm e 270-333 nm.

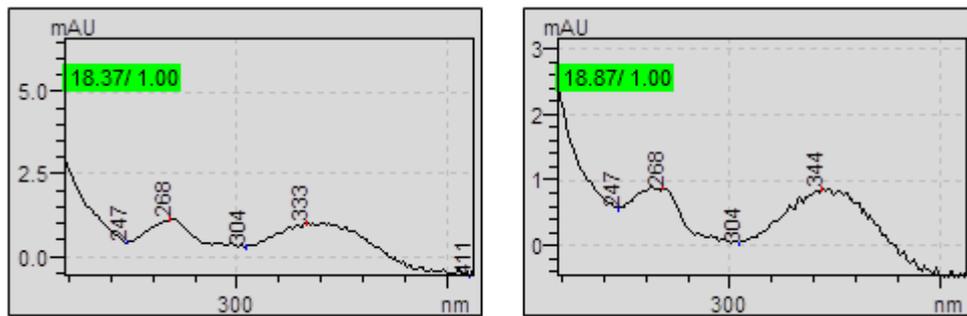


Figura 34: Espectro de UV dos picos majoritários nos tempos de retenção 18,41 e 18,87 minutos do extrato bruto de *P. mucronata* na menor concentração (0,0012 g/mL).

Ao avaliar os cromatogramas obtidos do creme não iônico sem o extrato (**Figura 35A**) e os cremes não iônicos contendo o extrato bruto de *P. mucronata* nas concentrações de 0,12% p/p (**Figura 35B**), 0,25% p/p (**Figura 36**) e 0,50% p/p (**Figura 37**), observou-se que a amostra de creme 0,12% p/p não apresentou os picos referentes aos flavonoides majoritários evidenciados nos cromatogramas do extrato bruto. Com isso, o seu cromatograma assemelhou-se ao do creme não iônico sem o extrato bruto de *P. mucronata*. Nas amostras de creme 0,25% p/p e 0,50% p/p foram observados ambos os picos nos t_R 18,37 e 18,85 minutos e estes tempos de retenção são correspondentes aos picos do extrato bruto que apresentaram espectro característico de flavonoides (**Figura 38**).

O motivo pelo qual não foram observados os picos referentes a esses flavonoides na amostra de creme 0,12% p/p pode ser explicado pelo fato da amostra ter ficado muito diluída ao ter empregado o método de filtração e ao adicionar mais solvente para compensar a perda de volume no filtro Millipore.

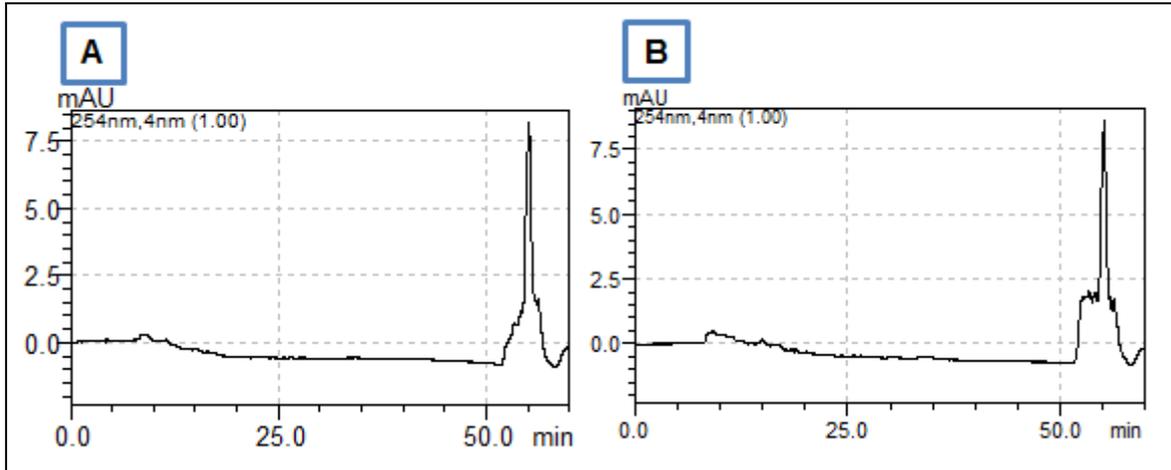


Figura 35: Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatogramas do creme não iônico branco (A) e do creme 0,12% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* (B).

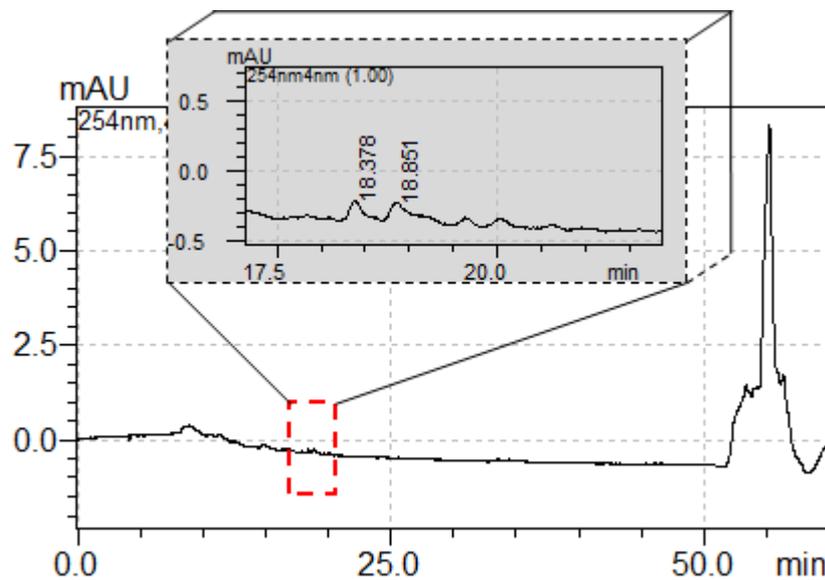


Figura 36: Cromatograma do creme não iônico 0,25% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 17,5 e 20,0 minutos.

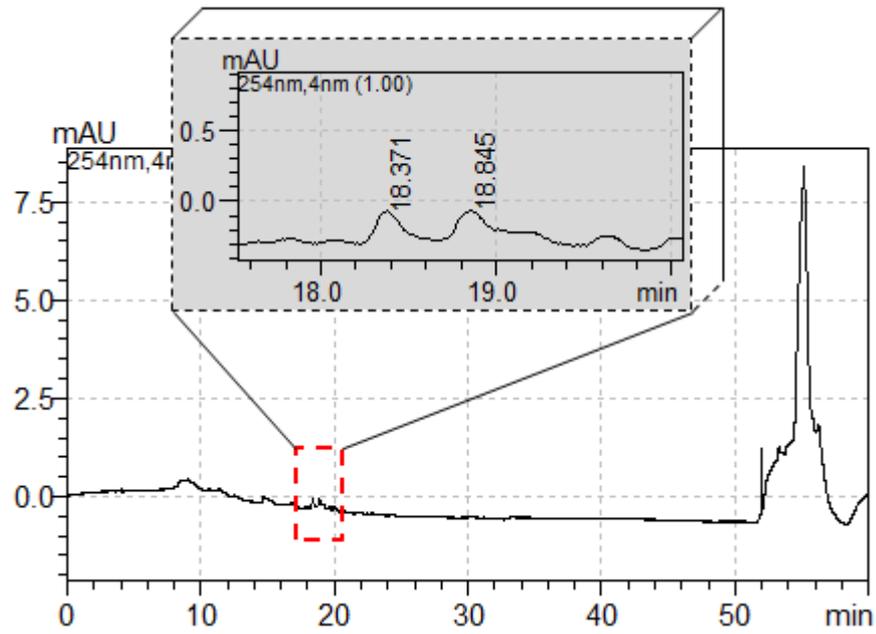


Figura 37: Cromatograma do creme não iônico 0,50% p/p contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 18,0 e 20 minutos.

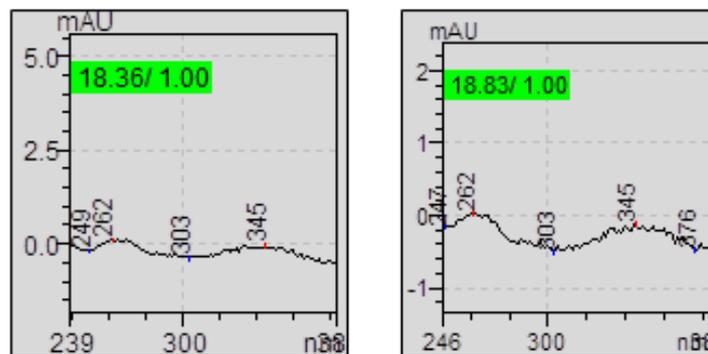


Figura 38: Espectro de UV dos picos detectados no creme 0,50% p/p nos tempos de retenção 18,36 e 18,83 minutos, correspondentes aos picos majoritários observados no extrato bruto.

Considerando as medidas tomadas para tentar contornar a questão do creme apresentar substâncias graxas em sua composição e a possibilidade de danificar a coluna de CLAE, a utilização do creme não iônico no presente estudo foi descartada, sendo a forma farmacêutica semissólida em gel a escolhida para dar continuidade a pesquisa, afinal, essa forma farmacêutica é preparada à frio e necessita de pouquíssimos excipientes e materiais. Embora, a forma farmacêutica creme tenha sido descartada, os resultados obtidos nas análises do creme permitiram traçar a escolha da concentração do gel à base de *P. mucronata*. Como visto anteriormente, não foi possível detectar a presença de picos majoritários correspondentes ao extrato bruto na amostra de creme 0,12% p/p, sendo assim, optou-se por preparar a amostra de gel não iônico contendo o extrato bruto de *P. mucronata* na concentração de 0,3% p/p. Vale ressaltar que tanto os cremes quanto os géis não foram preparados com conservantes visando evitar interferências nas análises e no ensaio biológico. Afinal, os conservantes parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e benzilparabeno) comumente empregados no preparo de formulações farmacêuticas e cosméticas também podem ser facilmente detectados e gerar pico de absorção em 254 nm (OLIVEIRA & LIMA, 2008), comprimento de onda este que foi estabelecido para a obtenção dos cromatogramas e detecção dos flavonoides nas amostras.

5.6. Análise qualitativa II e quantitativa do experimento por CLAE-DAD

Após análise qualitativa do cromatograma e espectros de UV do gel 001, verificou-se a reprodutibilidade de apenas duas injeções e notou-se nessas duas análises picos com espectro de UV característicos de flavonoides entre os tempos de retenção de 20,0 e 24 minutos (**Figura 39**) e vale destacar que os dois picos majoritários observados nas amostras do extrato bruto e dos cremes foram observados nessa formulação também, entretanto, em tempos de retenção um pouco diferentes. Isso porque os eluentes utilizados para diluir os cremes e o extrato bruto foram diferentes das demais amostras analisadas.

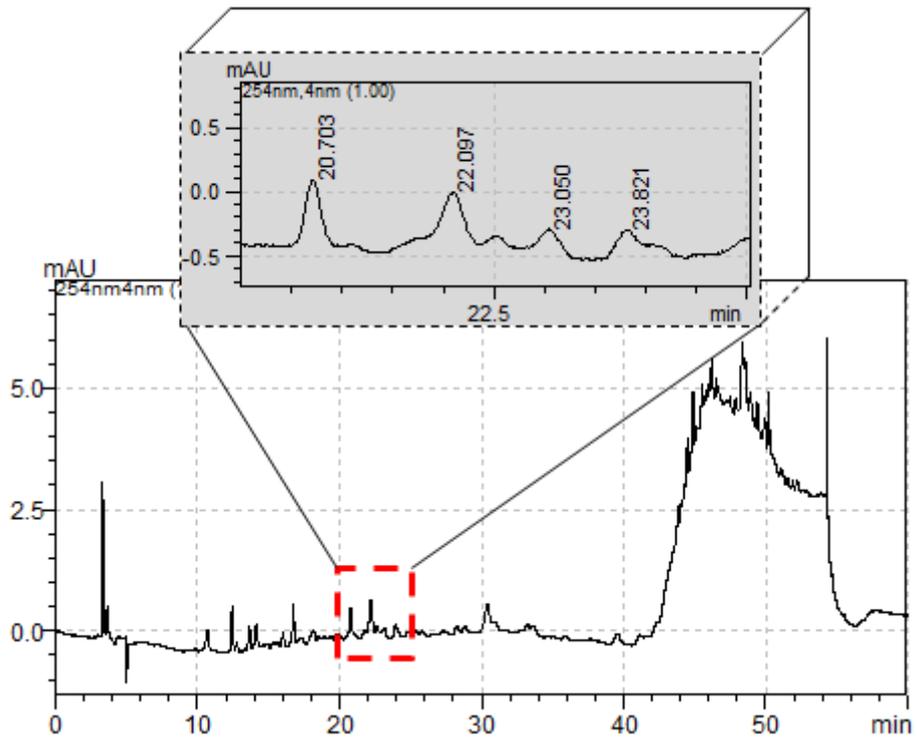


Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE em coluna analítica de sílica C18 de fase reversa (4.6 x 250 mm, 5 μ m; Nucleosil e Nucleodur[®]), sistema eluente em gradiente de MeOH/H₂O (pH 3,2 H₂PO₄) 2%→18% (10 min), 18%→20% (20 min), 20%→22% (5 min) e 22%→100% (10 min), com fluxo de 1mL/min e detecção no UV à 254 nm. Cromatograma da amostra de gel 001 contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os t_R 20,0 e 24,0 minutos.

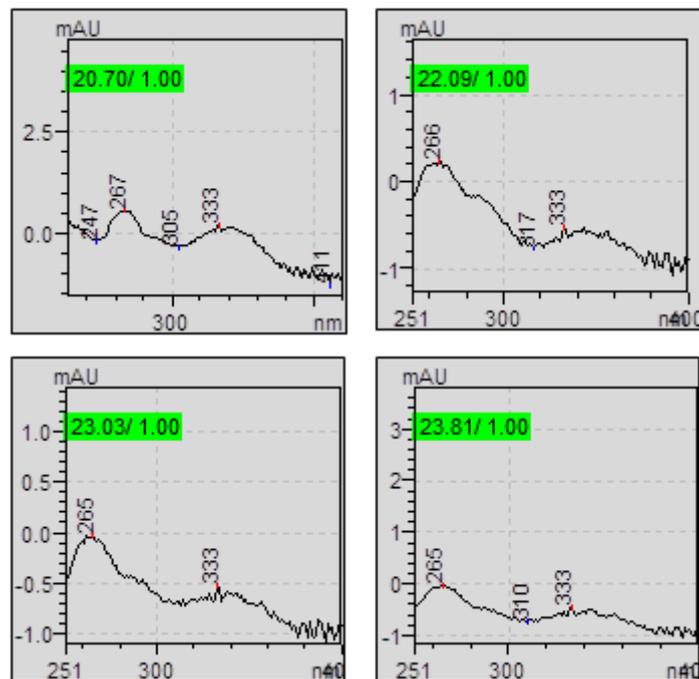


Figura 40: Espectro de UV dos quatro picos com faixa de absorção entre 265 e 333 nm.

Embora, as substâncias flavonoídicas identificadas não estejam muito concentradas foi possível fazer a quantificação dos flavonoides totais na amostra de gel 001 contendo o extrato bruto de *P. mucronata* através da equação da curva de calibração da rutina contendo cinco concentrações diferentes da substância, 0,15 µg/mL; 0,3 µg/mL; 0,6 µg/mL; 1,2 µg/mL e 2,4 µg/mL. O gráfico e a equação da curva de calibração da rutina foram obtidos através da relação entre a média das áreas de cada concentração de rutina padrão analisada (eixo y) e a quantidade de rutina (µg) injetada em 20 µL (eixo x), conforme mostra a **Tabela 18** e **Figura 41**.

Tabela 17: Resultado da quantidade de rutina injeta em 20 µL, média das áreas (n=3), desvio padrão (n=3) e coeficiente de variação de cada amostra de rutina padrão analisada.

Concentração (µg/mL)	Rutina injetada (µg)	Média das áreas (n=3)	Desvio Padrão (n=3)	CV %
0,15	0,003	5375,47	170,63	3,17
0,3	0,006	11387,87	200,16	1,76
0,6	0,012	22968,53	303,80	1,32
1,2	0,024	46120,20	376,63	0,82
2,4	0,048	93815,93	947,48	1,01

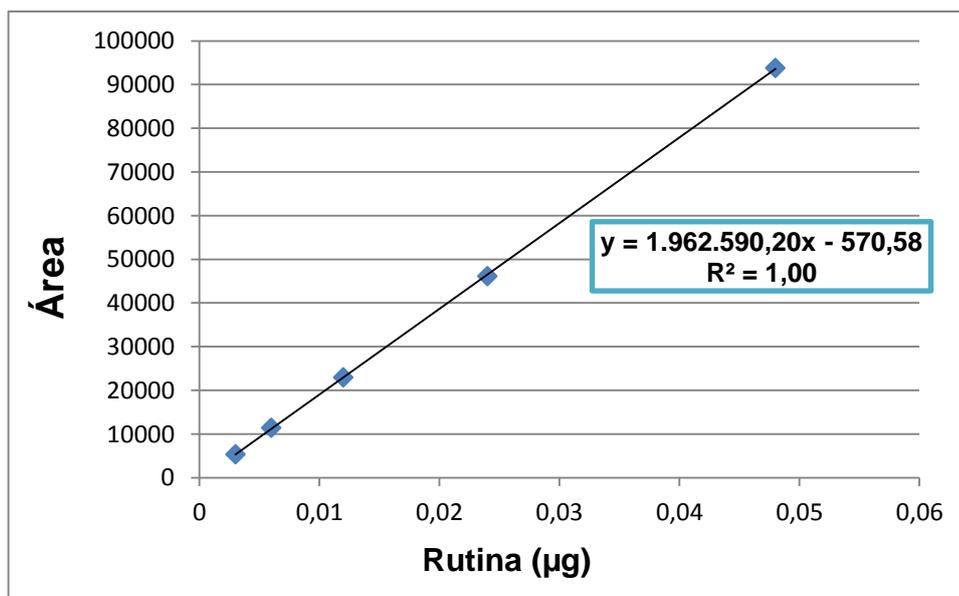


Figura 41: Curva de calibração da rutina. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

A área relativa referente a duas injeções da amostra gel 001 com picos de absorção entre 240 e 400 nm característicos de flavonoides foi somada (**Tabela 19**) e plotada na equação da reta $y = 1962590,20x - 570,58$, e através da substituição de y pela soma da área relativa com $n=2$, obteve-se o valor de x que refere-se a quantidade de flavonoides, expresso em μg de rutina. A partir dessa massa calculou-se o teor (% p/p) através de uma regra de três (massa $\times 100/12$) e posteriormente, calculou-se a média e o desvio padrão do % p/p (**Tabela 20**).

Tabela 19: Soma das áreas referentes aos picos com faixa de absorção no UV típicos de flavonoides, observados em duas injeções do gel 001.

Tempo de Retenção (min)	Área 1	Tempo de Retenção (min)	Área 2
20,778	6572	20,703	5451
22,203	9601	22,097	5215
22,623	1296	23,050	1906
23,946	5349	23,821	2052
Total	22818	Total	14624

Tabela 20: Massa de flavonoides totais presente na amostra de gel 001 analisada, obtida através da equação da reta da curva de calibração de rutina e teor (% p/p) de flavonoides totais com resultados expressos como média \pm padrão ($n=2$).

Amostra gel 001		
Massa 1 (μg)	Massa 2 (μg)	Média da quantidade de flavonoides totais (μg de rutina)
0,01192	0,00774	
Teor 1 (% p/p)	Teor 2 (% p/p)	
0,09931	0,06452	0,08191 \pm 0,02460

Após comparação dos cromatogramas das subfrações com o gel 001, tendo em mente que as mesmas foram analisadas juntas e sob as mesmas condições metodológicas, observou-se que o tempo de retenção ($t_R = 22,08$ min) obtido para a subfração PM18 (isoorientina) também foi observado nas análises do gel 001 ($t_R = 22,20$ min; $t_R = 22,09$ min). Apesar de não ter sido possível fazer a co-injeção do gel 001 com o composto isolado devido a pouca massa do isolado, através da soma das

áreas dos principais picos observados nos tempos de retenção de 22,0; 28,0 e 29,8 minutos nas subfrações PM18, PM23, PM28 e PM33 foi possível evidenciar que a substância detectada no t_R de 22,0 apresentou a maior soma, o que permite inferir que essa substância corresponde ao pico majoritário observado no extrato bruto de *P. mucronata* e no gel 001 contendo o extrato. Diante dessa evidência podemos considerar a isoorientina, composto isolado, como marcador químico na formulação. Essa flavona está compreendida entre a classe dos flavonoides C-glicosilados mais citados e entre as escolhidas como marcador químico nas espécies do gênero *Passiflora*, conforme descrito por Gomes (2013) e Beltramin e colaboradores (2009). Isso porque esses constituintes químicos possuem grande prevalência e ampla distribuição no gênero e estabilidade química (GOMES, 2013).

5.7. Análise qualitativa III do experimento por CLAE-DAD

Após análise qualitativa dos cromatogramas obtidos nas análises do extrato bruto concentrado, extrato bruto diluído, do gel base e do gel 002 (contendo o extrato bruto de *P. mucronata*), verificou-se que as três injeções feitas tanto das amostras de extrato bruto concentrado quanto de extrato diluído foram bem reproduzidas, visto que possível identificar as substâncias de interesse através do método de eluição empregado. Enquanto que a amostra de gel 002, apenas uma injeção pôde ser reproduzida, o que impossibilitou a quantificação de flavonoides totais nessa formulação.

Vale ressaltar que essas análises foram realizadas visando detectar a presença de compostos flavonoídicos bem como, do composto isolado no gel 002 para fazer a correlação entre os constituintes químicos presentes no extrato bruto de *P. mucronata* incorporado ao gel e o efeito terapêutico. Afinal, esta formulação gel 002 também foi avaliada quanto a sua atividade cicatrizante em ratos *Wistar*.

Ao analisar os cromatogramas obtidos do extrato bruto concentrado de *P. mucronata* com detecção em 254 nm (**Figura 42**), notou-se seis picos com comprimentos de onda característicos de flavonoides entre 271 e 347 nm e em tempos de retenção entre 22,00 e 31,00 min (**Figura 43**). No entanto, apenas dois picos desses seis são majoritários, com t_R em 26,46 e 28,54 minutos com áreas médias ($n=3$) de 257515,0 e 455103,3, respectivamente. Nos cromatogramas da

amostra de extrato diluído também foi possível observar apenas esses picos majoritários com tempos de retenção correspondentes (**Figura 44**).

Após análise e comparação dos cromatogramas do gel base com gel 002, observou-se que o gel 002 apresentou picos com tempos de retenção correspondentes ao gel base, entre 5,0-8,0 e em 24 minutos. Além disso, os picos detectados nos tempos de retenção 22,87; 23,68; 28,14; 29,79 e 30,40 minutos, embora alguns tempos correspondam aos observados nos cromatogramas do extrato bruto concentrado, os mesmos não apresentaram espectro de UV típicos de flavonoides, exceto a substância detectada em 36,12 minutos que apresentou picos de absorção no UV em 273 e 332 nm. Entretanto, não há nenhuma substância com espectro de UV característico de flavonoide no tempo de retenção 36,00 min nas amostras do extrato concentrado e diluído. Levando em consideração que essas amostras apresentadas nesse item foram analisadas juntas sob as mesmas condições analíticas, pode-se sugerir que o gel não iônico (matriz) esteja interferindo na detecção das substâncias levando ao retardo da detecção das mesmas, afinal, o mesmo tem caráter hidrofílico, outro fator que poderia contribuir para isso é a grande demanda de usuários analisando suas amostras com mesma coluna utilizada no presente trabalho que podem levar ao acúmulo de substâncias e com isso, favorecer um ambiente para interações entre as substâncias e retardar a detecção.

Todavia, ao analisar os valores das áreas referentes aos picos majoritários do extrato nota-se que o pico em 26 minutos é menor do que o pico de 28 minutos, sendo este um fator comum em relação às outras análises apresentadas nos itens 5.5, onde o primeiro pico majoritário possui uma área menor do que o segundo pico majoritário. Levando em conta que o pico em 28,5 minutos possui uma área maior e que a matriz pode está interferindo, pode-se sugerir que o pico em 36,12 minutos detectado no gel 002 seja o composto isolado, que também possui a maior área quando comparado aos outros flavonoides detectados nas subfrações.

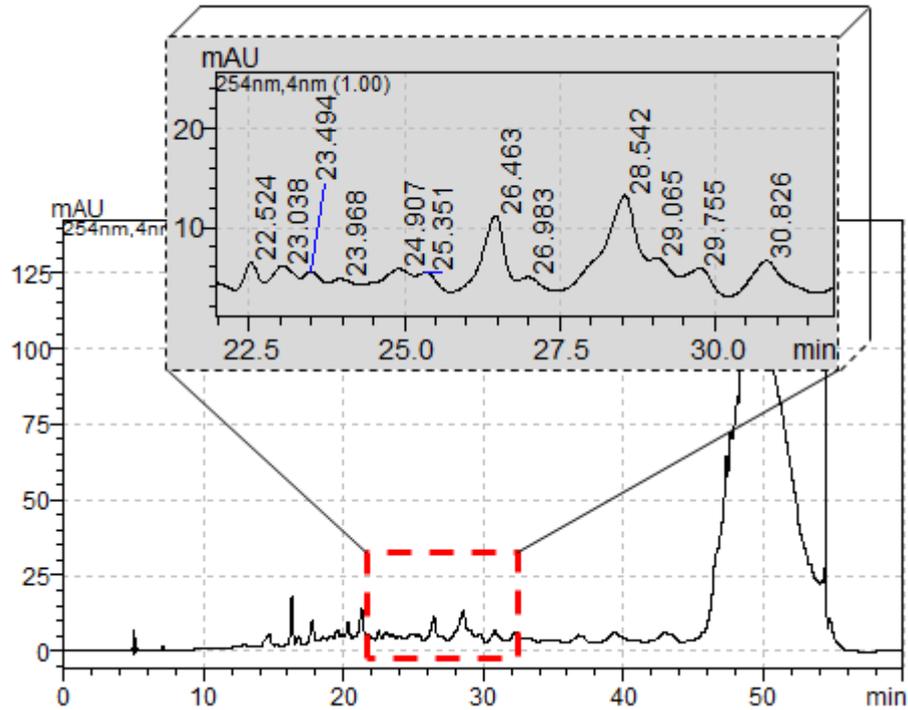


Figura 42: Cromatograma do extrato bruto de *Passiflora mucronata* na concentração de 14,8 mg/mL com zoom entre os t_R 22,0 e 31,0 minutos.

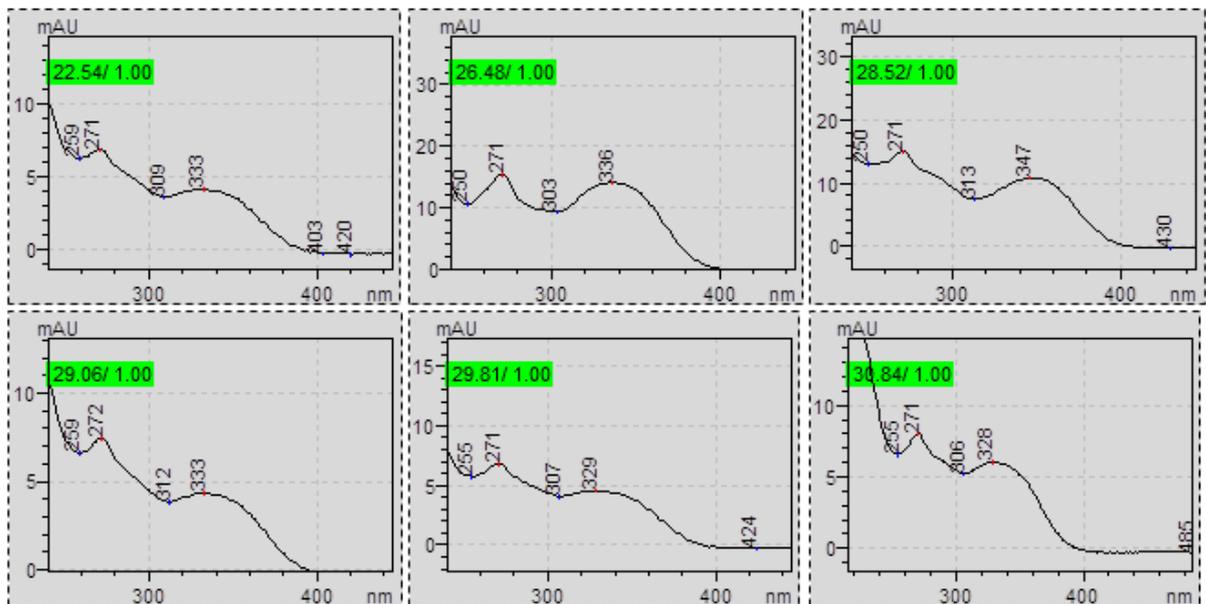


Figura 43: Espectro de UV do extrato bruto de *P. mucronata* no comprimento de onda de 254 nm de seis picos com faixa de absorção no UV típicos de flavonoides.

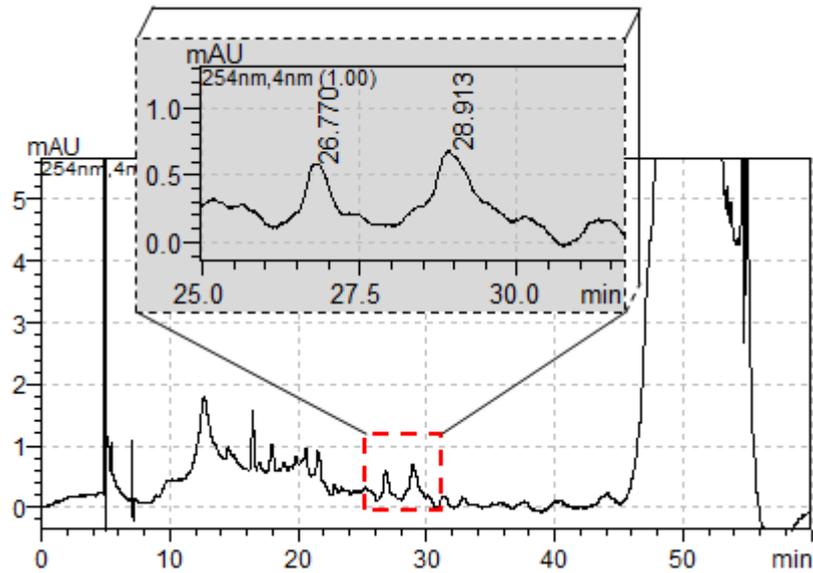


Figura 44: Cromatograma do extrato bruto diluído (0,74 mg/mL) com zoom entre os tempos de retenção 25,0 e 30,0 minutos.

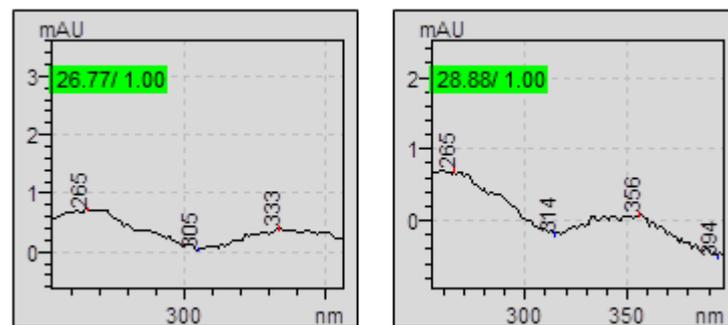


Figura 45: Espectro de UV dos picos majoritários observados na amostra do extrato bruto diluído nos comprimentos de onda de 265- 333 nm e 265-356 nm e nos tempos de retenção 26,77 e 28,88 minutos, respectivamente.

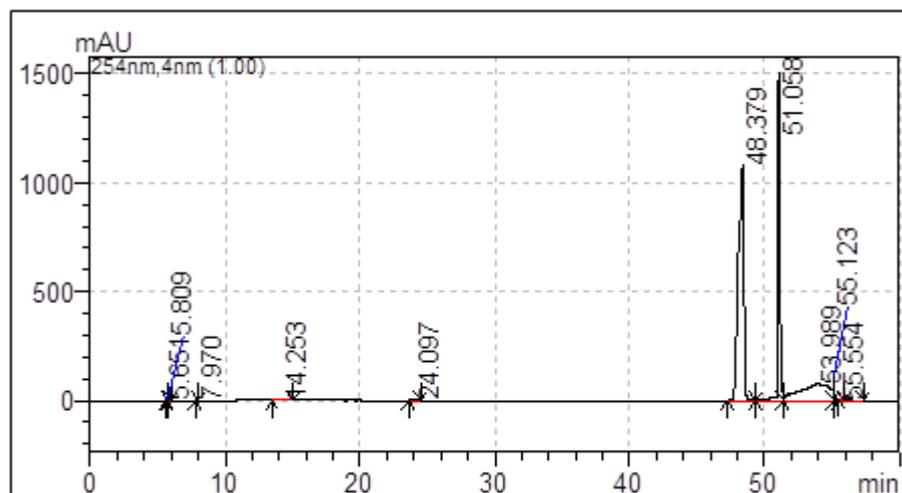


Figura 46: Cromatograma do gel não iônico sem o extrato bruto de *P. mucronata*.

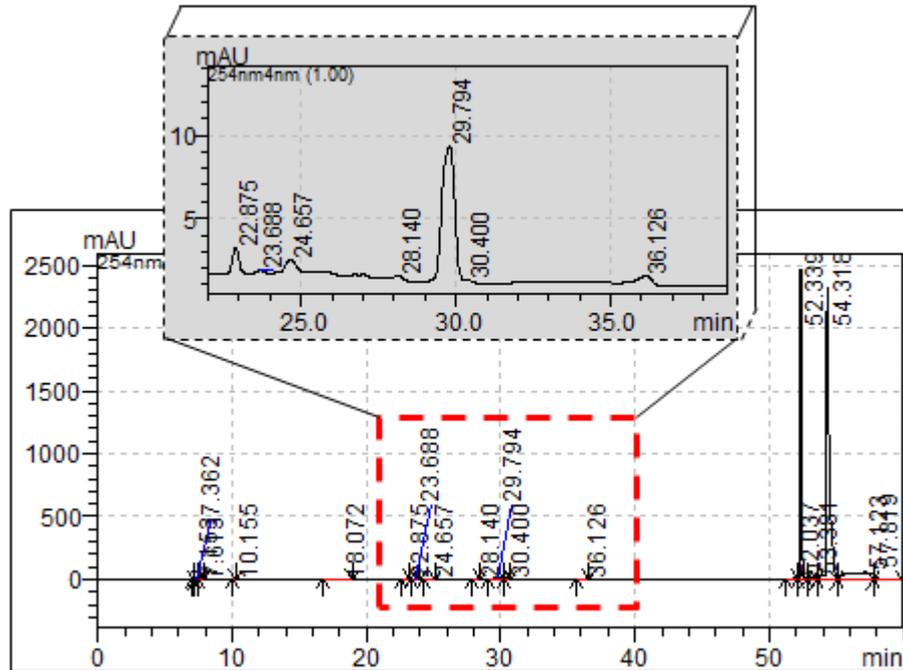


Figura 47: Cromatograma do gel 002 contendo extrato bruto de *P. mucronata* com zoom entre os tempos de retenção 22,0 e 37,0 minutos.

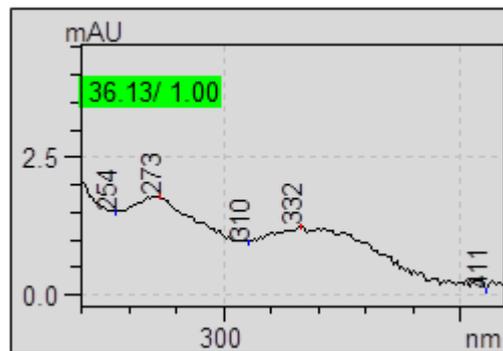


Figura 48: Espectro de UV da substância detectada no tempo de retenção 36,13 minutos, a qual apresentou picos de absorção característicos de flavonoides.

5.8. Ensaio biológico

5.8.1. Avaliação da atividade cicatrizante da formulação à base de *P. mucronata* em feridas cutâneas de ratos

Cicatrização é um termo utilizado para definir o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado (DE ALMEIDA, 2014). Esse processo biológico complexo é dividido em fases que se sobrepõem: homeostasia e inflamação controlada, formação de tecido novo e remodelamento. A primeira fase envolve interações entre diferentes tipos celulares e matriz extracelular com liberação de mediadores inflamatórios. A segunda fase inclui reepitelização, formação de tecido de granulação e matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares), além de angiogênese. E finalmente, na terceira fase, ocorre substituição do colágeno, apoptose e formação da cicatriz (LEITE *et al.*, 2015).

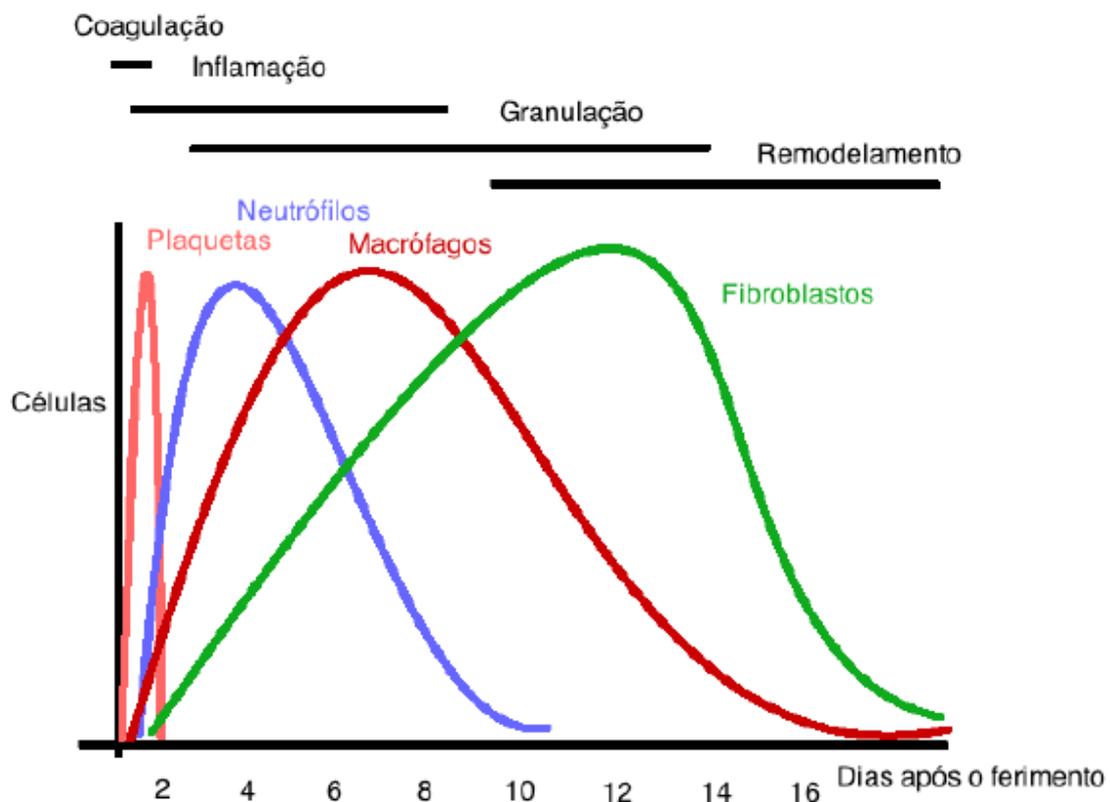


Figura 49: Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (Fonte: DE ALMEIDA, 2014).

Após fazer a análise estatística dos grupos não tratado, tratado com gel à base de *P. mucronata* e tratado com gel sem extrato a partir das fotos tiradas no 1, 3, 7, 10 e 14 dias, verificou-se que no dia 3º a área da ferida dos três grupos analisados não apresentaram diferenças significativas. Contudo, no dia 7º notou-se que a área da ferida do grupo tratado com gel à base de *P. mucronata* ($39,97 \pm 13,93\%$) apresentou uma redução significativa quando comparada ao grupo não tratado ($69,88 \pm 7,53\%$). No dia 10º, essa redução promovida por esse grupo tratado com *Passiflora* continuou evidente quando comparado ao grupo não tratado, já no 14º dia essa redução da área não foi significativa, conforme se observa na **Figura 50** e **Tabela 21**.

Ao fazer a comparação entre os grupos tratados com gel sem extrato e o gel contendo extrato bruto de *P. mucronata* a redução da área não apresentou diferenças significativas, visto que os intervalos mínimos e máximos da média desses dois grupos se sobrepõem (**Tabela 21**). Embora, visualmente, o gráfico representado na **Figura 50** indique o contrário, ao fazer a análise estatística não foi possível observar um $p < 0,05$.

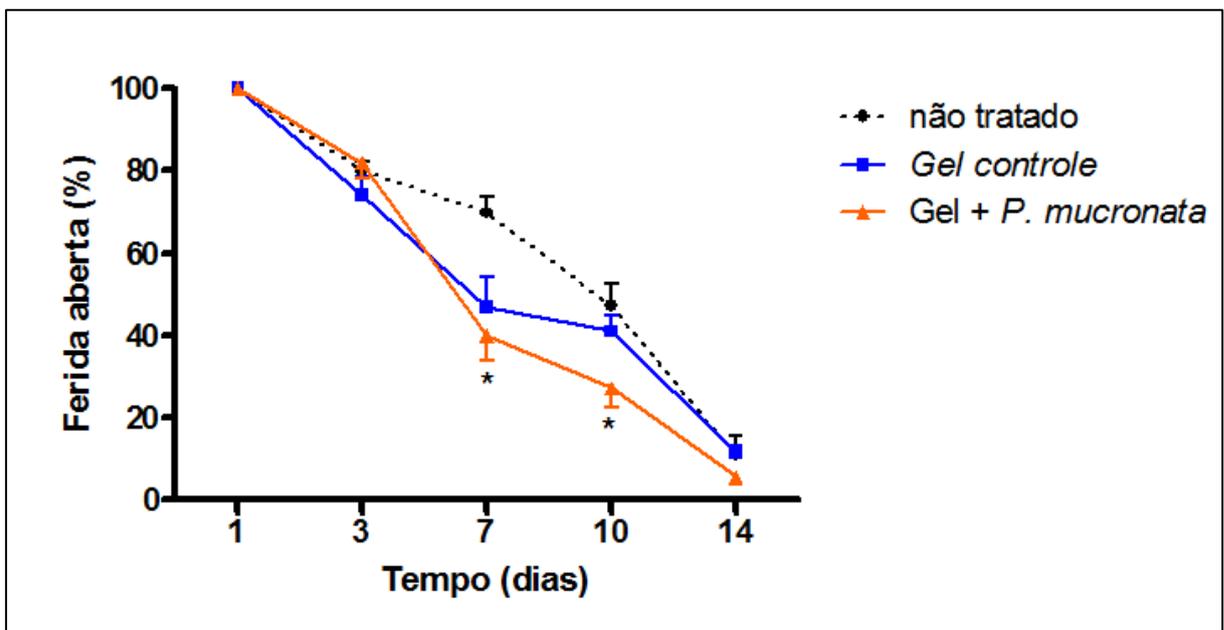


Figura 50: Avaliação da atividade cicatrizante da formulação gel contendo extrato bruto de *P. mucronata* (gel 002). Dados apresentados como média \pm EPM, grupos com $n > 4$, * $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado.

Tabela 21: Resultados da média e desvio padrão da área da ferida aberta obtidos nos dias 1, 3, 7, 10 e 14 de pós-operatório referente aos grupos não tratados, tratados com gel branco e tratados com gel contendo o extrato bruto de *P. mucronata*, n>4, *p<0,05 comparado com o grupo não tratado.

Dias	Grupo não tratado		Grupo gel branco		Grupo gel à base de <i>P. mucronata</i>	
	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)	Média (%)	DP (%)
1	100,000	0,000	100,000	0,000	100,000	0,000
3	80,060	4,960	74,230	10,910	81,950	9,260
7	69,880	7,530	47,000	16,480	39,970*	13,930
10	47,260	11,570	41,090	8,430	27,170*	10,530
14	11,060	10,190	11,350	4,460	5,750	4,150

Segundo De Oliveira (2008) entre o 7^o e 14^o dia correspondem ao período de fibroplasia da cicatrização, com presença dos fibroblastos e miofibroblastos. Considerando os resultados obtidos, nota-se que a formulação gel à base de *P. mucronata* beneficiou especialmente a fase de fibroplasia. Segundo De Almeida (2014) essa fase é marcada pelo aumento do número de fibroblastos.

Garros e colaboradores (2006) observaram em seu estudo que a aplicação tópica (1mL) do extrato hidro-etanólico (70%) de *Passiflora edulis* em feridas cutâneas de ratos apresentou efeito benéfico no processo cicatricial, sendo evidenciado pelo aumento da proliferação fibroblástica e melhor reepitelização no 7^o dia de pós-operatório, e a reação inflamatória leucocitária e colagenização mais intensa no 14^o dia. Além dessa pesquisa outros autores observaram que administração do extrato hidro-etanólico (70%) de *P. edulis* (250 mg/kg) na cavidade peritoneal de ratos influenciou favoravelmente a cicatrização de gastrorrafias (DA SILVA *et al.*, 2006), laparotomias medianas (GOMES *et al.*, 2006) e anastomoses colônicas (BEZERRA *et al.*, 2006).

Os flavonoides possuem uma variedade de propriedades biológicas já relatadas na literatura tais como, a capacidade antioxidante, anti-inflamatório, hipoglicemiantes, antitumoral, antiviral e antibacteriana, assim como efeito citoprotetor direto sobre o sistema vascular, pâncreas e fígado (FOLADOR, 2009). Considerando todos os resultados apresentados nos itens anteriores, pode-se inferir

que a atividade cicatrizante observada no grupo tratado *P. mucronata* está relacionada à presença desses constituintes químicos no extrato bruto de *P. mucronata* incorporado ao gel não iônico (gel 002) e provavelmente a isoorientina, composto majoritário isolado, é um dos principais flavonoides responsáveis por beneficiar o processo cicatricial.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados explicitados, pode-se concluir que foi possível isolar a luteolina 6-C- β -D-glicopiranosídeo, também conhecida como isoorientina, do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas *Passiflora mucronata*. Esse flavonoide considerado majoritário, visto que apresentou um resultado final da soma das áreas maior, pôde ser utilizado como marcador químico.

Após a análise dos cremes não iônicos contendo o extrato bruto de *P. mucronata* foi possível identificar os dois flavonoides majoritários apenas nas amostras de creme 0,25% p/p e 0,50% p/p; devido à composição rica em substâncias graxas e possibilidade de danificar a coluna analítica esta formulação semissólida foi descartada. Entretanto, algumas informações obtidas nessas análises permitiu estabelecer a concentração da formulação gel contendo extrato de *P. mucronata*.

Na formulação gel 001 foi possível quantificar o teor de flavonoides totais através a curva da rutina padrão, o qual apresentou teor equivalente a $0,08191 \pm 0,02460\%$ p/p, expressos em μg de rutina. Além disso, foi feita a identificação do composto isolado (isoorientina) na formulação através da comparação entre os tempos de retenção e área dos picos.

Na análise qualitativa do gel 002 verificou-se apenas um pico característico de flavonoide no tempo de retenção 36,12 minutos, tempo este que não foi correspondente aos tempos de retenção dos picos característicos de flavonoides observados nas amostras diluída e concentrada de extrato bruto, sugerindo, portanto que a matriz (gel base) esteja interferindo na detecção dessas substâncias flavonoídicas. Considerando o fato de o composto isolado ser o majoritário e que foi observado apenas o pico com t_R em 36,12 minutos, pode-se inferir que esse pico seja a isoorientina.

No ensaio biológico de cicatrização foi possível observar uma promissora atividade cicatrizante promovida pela formulação gel 002 contendo extrato bruto de *P. mucronata* na concentração de 0,3% p/p. Afinal, a mesma promoveu um efeito benéfico no processo cicatricial, em especial, na fase de fibroplasia que corresponde ao período de proliferação fibroblástica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, J. Desenvolvimento de forma farmacêutica tópica gel contendo o extrato seco de *Ipomoema pes-caprae*. [Dissertação de mestrado], Universidade do Vale do Itajaí, p. 1-40, 2009.

ALEXANDRE, R. S. *et al.*; Enraizamento adventício de estacas do maracujazeiro silvestre *Passiflora mucronata* Lam.: forma de veiculação e concentrações do ácido indol-3-butírico. Ver. Cers. Viçosa, v.61, nº4, p.567-571, julho/agosto, 2014.

ALMEIDA, J. R. G. da S.; LIMA, J. T. de; NUNES, X. P.; CERQUEIRA, G. S.; FIGUEIREDO, C. S.; Flavonoides da dieta e sua importância para a saúde humana. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. 2013.

ATHAYDE, N. R.; “Perfil químico e atividade biológicas de *Croton echinocarpus* Baill. e *Croton vulnerarius* Müll. Arg”. [Dissertação de Mestrado], Universidade de São Paulo, p. 19-20, 2013.

BARBOSA, P. R.; Estudo da ação psicofarmacológica de extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims. [Dissertação de mestrado], Universidade do Extremo Sul Catarinense, p. 13-18, 2006.

BELTRAMIN, F.F.; BELTRAMIN, F.F.; DA ROSA, T.T.; LUCENA, A.; TAKEMURA, O.S.; Avaliação da qualidade de amostras de cápsulas e comprimidos de *Passiflora* spp. Comercializadas na cidade de Umuarama – PR. Universidade Paranaense – Unipar/Departamento de Ciências Biológicas e Botânica – Umuarama – PR, 2009.

BENSUSAN, N. Biodiversidade. In: CAMARGO, A.; CAPOBIANCO, J. P. R.; OLIVEIRA, J. A. P. Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92. São Paulo: Estação Liberdade: Instituto Socioambiental: Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas. p. 229-244. 2002.

BERALDO, J.; KATO, E.T. M.; Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae; Revista Brasileira de Farmacognosia. 20(2): 233-239, Abril/Maio, 2010.

BEZERRA, J.A. *et al.*; Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. Acta Cirúrgica Brasileira, 21(3):16-25, 2006.

BIANCO, E.M.; SANTOS, C.A.M.; Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 13, n. 2, p. 93-99, 2003.

BORELLA, J.C.; RIBEIRO, N.S.; TEIXEIRA, J.C.L.; CARVALHO, D.M.A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extrato de *Calendula officinalis* L.(Asteraceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 31(2):193-197 ISSN 1808-4532. 2010.

BOSCOLO, O.H.; MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE, L.; Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, p.8-12, 2007.

BOSCOLO, O. H. & VALLE, L. de S.; Planta de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. Iheringia. Série Botânica, 63:263-277, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Consulta Pública nº 61, de 12 de agosto de 2002. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[2618-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[2618-1-0].PDF)>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA.1ª ed. 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 7, 23 de julho de 1996.

BRASIL. Contextualização da Unidade de Conservação. Ministério do Meio Ambiente. 2007.

BRASIL. Decreto de 29 de abril de 1998. Cria o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Estado do Rio de Janeiro, e dá outras providências. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução de Diretoria Colegiada-RDC nº 14, de 31 de Março de 2010.

BRASIL. Resolução nº444, de 30 de dezembro de 2011. Aprova a lista de espécies indicadoras dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o Estado de Alagoas, de acordo com a Resolução nº417, de 23 de novembro de 2009. Publicada no DOU nº 2, do dia 03 de janeiro de 2012.

BRASIL. Resolução RDC 48/2004 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. 18 de março de 2004.

BRUCE, N.C.; Alkaloids. Cambridge, UK. 328p.1999. Disponível em: <http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v08a_alk.pdf>

CALIXTO, J. B.; Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciênc. Cult. Vol. 55, nº 3. São Paulo. ISSN 2317-6660. 2003.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. Química Nova, 21(1), 1998.

CERVI, A. C.; Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950-2005) na América do Sul e principais publicações brasileira. Estud. Biol., v. 27, n.61, p. 19-24, 2005.

CHAGAS, F. N. J.; FILHO-VIANA, M. D. M.; PESSÔA, L. M.; COSTA, S. S.; Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia* Loefl. (Urticaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 6, nº 2, 2014.

COPPENS D'EECKENDRUGGE, G.; Exploração da diversidade genética das Passifloras. VI Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro. Campos dos Goytacazes; UENF/UFRRJ, p. 25, 2003.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZISNETO, G., DE FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Boletim do CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

COSTA, G.M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P. & REGINATTO, F.H.; An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 22, nº 6, 1096-1102, 2011.

COSTA, I. F. de J. B.; Estudo bioquímico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Ocotea notata* (Ness) Mez (Lauraceae). [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2014.

DA SILVA, J.R.S. *et al.*; Efeito do extrato da *Passiflora edulis* na cicatrização de gastrorrafias em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(2):50-58, 2006.

DA SILVA, M.R.; Análise da distribuição de alcaloides piridínicos em diferentes fases fenológicas de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. [Dissertação de Doutorado]. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. p. 18-20, 2011.

DA SILVA, R.A.C. *et al.*; Alcaloides das cascas do caule de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2014.

DE ALMEIDA, A.R.; Caracterização morfoanatômica e química de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos. [Dissertação de Mestrado], Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2014.

DE ARRUDA, H.A.S.; Desenvolvimento de coalhada sabor maracujá com características simbióticas. Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Recife. 2013.

DE CASTRO, P.C.; HOSHINO, A.; Da SILVA, J.C.; MENDES, F.R.; Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. Pubmed. Phytother Res. May, 21(5):481-4. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295387>>

DE OLIVEIRA, V.B.; Alcaloides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae), [Dissertação de Doutorado], Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. V. 1, p.26-31, 2008.

DE OLIVEIRA, P.F.; MUZITANO, M.F.; LEAL, L. de A.; KONNO, T.U.P.; LEAL, I.C.R.; GUIMARÃES, D.O.; Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Passiflora mucronata* por CLAE-UV. Espaçosigma.ufrj-foco, 2012. Disponível em: <http://www.sigmafoco.scire.coppe.ufrj.br/UFRJ/SIGMA/jornadalC/publicacao_foco/trabalhos/consulta/relatorio.stm?app=JIC_PUBLICACAO_TRABALHO&ano=2012&codigo=2627&buscas_cruzadas=ON>

DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2ª Edition, p. John Wiley & Sons, New York, p. 291-350, 2002.

DOS SANTOS, E. de O. L.; Mecanismo de ação de flavonoides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc gama e CR. [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, p.16-17, 2010.

FARIAS, M. C. V. *et al.*; Florística das restingas de Sergipe. Universidade Federal de Sergipe, 64º CONGRESSO Nacional de Botânica. Belo Horizonte, 10-15 de novembro de 2013.

FELIÚ-HEMMELMANN, K.; MONSALVE, F.; RIVERA, C.; *Melissa officinalis* and *Passiflora caerulea* infusion as physiological stress decreaser. Pubmed. Int. J. Clin. Exp. Med. Jun 26; 6(6):444-51. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23844268>>

FERNANDES, R. dos S.; Avaliação da atividade antiofídica do extrato de *Serjania erecta* Randlk *in natura* e *in vitro*: isolamento e caracterização estrutural de compostos bioativos.[Dissertação de doutorado], Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

FEUILLADE, J. Les toxines des cyanobactéries: revue de synthèse. Cyanobacterial toxins: a review. Revue des Sciences de L'eau, 5(4), 1992.

FEUILLET, C. & MACDOUGAL, J. M.; Passifloraceae. In: KUBITZI, K. (Ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. v. IX. Berlin: Springer, p. 270-281. 2007.

FOLADOR, P.; Estudo do potencial hipoglicemiante da *Wilbrandia ebracteata* em ratos normais e diabéticos. [Dissertação de Mestrado], Universidade Federal de Santa Catarina, p. 23, 2009.

GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; DEVI RAJESWARI, V.; Pharmacological activities of *Catharanthus roseus*: a perspective review. Int. J. Pharm. Bio. Scien. April; 4(2): (P) 431-439 ISSN 0975-6299. 2013.

GARROS, I.D. *et al.*; Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cirúrgica Brasileira, 21(3): 55-65, 2006.

GORDEIRO, J. R. G. *et al.*; Avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de *Triticum vulgare* em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovariossalpingohisterectomia. *Acta. Veterinária Bras.*, v. 4, nº 2, p. 78-85, 2010.

GOMES, C.S. *et al.*; Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(2): 7-14, 2006.

GOMES, S. V. F.; Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. [Dissertação de doutorado], Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

GOSMANN, G. *et. al.*; Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Revista brasileira de Biociência*, v. 9, s.1, p. 88-99, 2011.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, JR.; BERNACCI, L.C.; Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V. & Braga, M.F. (Eds) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, Embrapa Cerrados. p.1-106, 2005.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.; Fitoterápicos: um Mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(3):241-248, ISSN 1808-4532, 2009.

KARAM, T.K.; DALPOSSO, L.M.; CASA, D.M.; DE FREITAS, G.B.L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Ver. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.15, nº 2, p.280-286, 2013.

LAGE, G. A.; Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. [Dissertação de Mestrado], Universidade Federal de Minas Gerais, p.37-41, 2011.

LESSA, A. O.; Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial para processamento da polpa de frutos de maracujá das espécies silvestres (*Passiflora setacea* DC, *Passiflora cincinnata* Mast.). [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, p.15, 2011.

LEITE, N.S. *et al.*; Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). Revista Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p. 164-170, 2015.

LOLLI, L.F.; SATO, C.M.; ROMANINI, C.V.; VILLAS-BOAS, L. de B.; SANTOS, C.A.; de OLIVEIRA, R.M.; Possible involvement of GABA A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. Pubmed. J. Ethnopharmacol., May 4;111(2):308-14, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196350>>

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T.; Flavonoides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MADOGLIO, F. A.; Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis. [Dissertação de Mestrado], Universidade Federal de Santa Catarina, p. 198, 2011.

MARQUES, O. C. P.; Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. [Dissertação Mestrado], Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra, p. 68-70, 2008.

MARTINS, C. de M.; Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriácea* Mart. &

Zucc (Pau-santo) do Cerrado. [Dissertação de Mestrado], Universidade Federal de Uberlândia, p. 28-29, 2012.

MORAIS, L. M. F. A.; Expansão urbana e qualidade ambiental no litoral de João Pessoa-PB. [Dissertação Mestrado], Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009.

MOURA, A.C. da S.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. Química Nova, v. 34, nº 7, p. 1136-1140, 2011.

MÜLLER, S.D.; “Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá-doce”. [Dissertação de Mestrado], Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JÚNIOR, M.A.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y.;TAVARES, A.P.L.; Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. Infarma, v.19, nº 1-2, 2007.

NISHIMURA, C. S. S.; Dietilamida do ácido lisérgico (LSD). Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. [Monografia]. p.18, 2007.

NUNES, T.S. & QUEIROZ, L.P.; Flora da Bahia: Passifloraceae. Sitientibus, v. 6, n. 3, p. 194-226, 2006.

OLIVEIRA, M.A.; LIMA, E.M.; Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE para determinação de metilparabeno e propilparabeno em cápsulas gelatinosas duras e transparentes. 48º Congresso Brasileiro de Química (CBQ), Rio de Janeiro, 2008.

PASSOS, V. M.; Delimitação específica de *Passiflora galbana* Mast. e *Passiflora mucronata* Lam. através de marcadores moleculares, dados morfométricos e

citogenéticos. [Dissertação de Mestrado], Universidade Estadual de Feira de Santana, p.18, 2007.

PENG, J.; FAN, G.; HONG, Z.; CHAI, Y.; WU, Y.; Preparative separation of isovitexin and isoorientina. *Journal of Chromatography A* 1074, p. 111-115, 2005.

PEREIRA, C. A. M. & VILEGAS, J. H. Y.; Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora alata* Dryander, *P. edulis* Simns e *P. incarnata* L. *Ver. Bras. Plan. Med., Botucatu*, v.3, n.1, 2000.

PEREIRA, C.A.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; TITS, M. & ANGENOT, L.; A HPLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemical Analysis*, 15(4): 241-248. 2004.

PONTES, J. G. de M.; Exploração da Organocatálise na síntese de intermediários de compostos com potencial biológico. [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, p. 46, 2013.

PROVENSI, G.; Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). [Dissertação de mestrado], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ROCHA, M. S.; Compostos bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do Cerrado Piauiense. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Piauí, p.65, 2011.

SAKALEM, M.E.; NEGRI, G.; TABACH, R.; Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. Universidade Federal de São Paulo. *Rev. bras. Farmacogn.*, vol. 22, nº6, Curitiba Nov/Dec, 2012.

SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. da S.; ARAUJO, D. S. D. de; Análise florística das pteridófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Acta bot. Bras.* 18(2):271-280, 2004.

SIEBRA, A. L. de A.; Avaliação do perfil químico, toxicológico e farmacológico *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora cincinnata* Mast. (maracujá-do-Mato). [Dissertação de mestrado], Universidade Regional do Cariri-URCA. Crato-CE. 2013.

SILVA, S. M.; Diagnóstico das Restingas no Brasil. Depto. de Botânica- Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1999.

STRASSER, M. Triagem Fitoquímica e Farmacológica e Formulação de nanopartículas de produtos derivados de *Passiflora serratodigitata* L. [Dissertação de mestrado], Universidade de São Paulo, p. 27-29, 2011.

VAINER, A.G.; Conflitos ambientais em evidência na criação de manejo de um Parque Nacional: O caso do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Trabalho publicado nos Anais do XIX Encontro Nacional do CONPEDI realizado em Fortaleza-CE nos dias 09,10,11 e 12 de Junho, 2010.

VANDERPLANK, J. Passion flowers, 3^a ed., Cambridge: The MIP Press, 224p. 2000.

VENTURA, J.C; NEZES, T.B.S.; RAIMUNDO, J.M.; LEAL, I.C.R.; MUZITANO, M.F.; BONAVITA, A. G.; Avaliação do extrato bruto de *Passiflora mucronata* no processo de cicatrização cutânea em ratos. In: 4^a Jornada de Pesquisa e Extensão da UFRJ, 2012, Macaé. Livro de resumos, 2012.

VELURI, R.; OKA, I.; WAGNER-DOBLER, I.; LAASTSCH, H.; New indole alkaloids from the North Sea bacterium *Vibrio parahaemolyticus* Bio249. Pubmed. Journal Natural Products. Nov. 66 (11):1520-3. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640534>>

VETORE-NETO, A; STRASSER, M.; WASICKY, A.; BACCHI, E.M.; Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Passiflora mucronata* Lam. Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.

WEN, P.; HAN, H.; WANG, R., WANG, N.; YAO, X. C-glycosylflavones and aromatic glycosides from *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 2(4), 2007.

WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L; BOVERIS, A. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**, YUNES, R. A. (Ed.), Argos, Chapecó. p. 317-334. 2001.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS- BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, p.113-122, 2004.