

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA EXTRATO DE *Passiflora incarnata* Linneaus.**

ANDREIA CRISTINA WILDNER CAMPOS LOPES

PORTO ALEGRE, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA EXTRATO DE *Passiflora incarnata* Linneaus.**

Dissertação apresentada por **Andréia
Cristina Wildner Campos Lopes** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Dr^a. Ana Maria Bergold

Co-Orientadora: Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto

PORTO ALEGRE, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr.: George Gonzalez Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof^a. Dr^a. : Margareth Linde Athayde

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof^a. Dr^a.: Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Wildner Campos, Andreia Cristina
Desenvolvimento e validação de metodologia
analítica para extrato de *Passiflora incarnata* /
Andreia Cristina Wildner Campos. -- 2013.
183 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.
Coorientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Passiflora incarnata*. 2. Flavonoide. 3. C-
glicosídeo. 4. Método analítico. 5. Controle de
qualidade. I. Bergold, Ana Maria, orient. II.
Baggio Gnoatto, Simone Cristina, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Preparação de Padrões Secundários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao qual eu expresse meus sinceros agradecimentos.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

JOHN RUSKIN

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bergold, pela orientação, acolhimento, amizade, dedicação, iniciativa e exemplo de figura humana e postura profissional.

À Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto, pela ajuda fundamental, pelo incentivo, amizade, por ensinar a ver o lado bom das coisas e exemplo de pessoa e conduta profissional.

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröhlich pelos conselhos, disposição e apoio ao longo deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial: Grace Gosmann, Elfrides Eva Scherman Schapoval e Teresa C. T. Dalla Costa.

Aos colegas e funcionários da Faculdade de Farmácia pelo apoio, convívio e amizade: Leonardo Zanchetti Meneghini, Felipe D'avilla, Marcella Oliveira, Mariana Brandalise, Cristiane F. Codevilla, Fernanda R. Salazar, Graciela Carlos, Francine Kiyono J. Yatzu, Cesar A. Junqueira, Carolina Lupi Dias, Rochele C. Rossi, Liége C. Schwingel, Ana Paula C. Silva, Maiara Cássio Pigatto, Bruna Torres, Haline T. Hexsel, Ester Schwarz, Luana Kammler, Joyce, Carol, Daniela, Viviane, Maristela e, por último, mas não menos importante Marco A. Taborda.

Aos amigos Sirlei Maria Zanin, Tamara dos Santos Castilhos, Samuel Kaiser, Fernando C. Torres, Fernanda Cortez Lopez, Mariana Botton, Suzeli Raymund, Vitor Todeschini, Alini Lange e Letícia L. Sfair.

A minha família pelo apoio, compreensão e amor incondicional, em especial nas figuras; esposo, filhos, mãe e pai: João Carlos, Thiago, Camila, Lisa e Pedro.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudos.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA EXTRATO DE *Passiflora incarnata* Linneaus

Um método confiável e eficiente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido para o controle de qualidade de extratos de *P. incarnata*. O método desenvolvido inclui uma estratégia original para identificação preliminar da espécie e operação simples baseada no modo de eluição isocrático. Este método foi validado para os flavonoides C-glicosilados vitexina e isovitexina, considerados marcadores da espécie e, aplicado na análise qualitativa e quantitativa de quatorze formulações comerciais com insumo vegetal composto exclusivamente de *P. incarnata*. As análises foram realizadas com uma coluna C18 e à temperatura ambiente. Os comprimentos de onda de detecção foram 330 (vitexina e isovitexina) e 254 nm (rutina, marcador de contaminação). O método analítico foi linear para vitexina no intervalo de 5 – 40 µg/mL e para isovitexina no intervalo 5 – 60 µg/mL. Das quatorze amostras analisadas, oito eram em forma farmacêutica líquida (FFL) e seis em forma farmacêutica sólida (FFS). Seis amostras comerciais em FFL e seis amostras em FFS apresentaram perfil compatível com *P. incarnata*. As concentrações obtidas para as FFL foram vitexina 17,87 – 29,13 µg/mL e isovitexina 27,47 – 65,07 µg/mL, respectivamente. As FFS apresentaram concentração de vitexina entre 10,0 – 32,26 µg/mL e isovitexina 36,16 – 100,83 µg/mL. O método demonstrou ser confiável e eficiente para análise qualitativa e quantitativa de vitexina e isovitexina nos extratos; por esta razão foi considerado viável para a prática diária do controle de qualidade. A análise por cromatografia de líquida de alta eficiência acoplada com detector de espectroscopia de massas (CLAE-EM) foi realizada para investigar os principais fitoconstituintes, sete picos do extrato puderam ser resolvidos; e, forneceram fortes evidências sobre a composição química do extrato de *P. incarnata*.

Palavras-chave: *Passiflora incarnata*, flavonoide, CLAE, vitexina, isovitexina e controle de qualidade.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD TO *Passiflora incarnata* Linneaus EXTRACT

A reliable and efficient method of high-performance liquid chromatography was developed for the quality control of *Passiflora incarnata* extracts. The quality control includes an original preliminary identification of this species and simple operation process based on isocratic elution. This method was validated for vitexin and isovitexin, C-glycoside flavonoids, considered markers of this species and applied to qualitative and quantitative analysis of fourteen commercial herbal medicines of *P. incarnata* extracts. Analysis was achieved on reversed-phase C₁₈ column at ambient temperature. The wavelengths used for detection were 330 nm (vitexin and isovitexin) and 254 nm (rutin, a marker of contamination). Method was linear over vitexin concentration range of 5–40 µg/mL and isovitexin 5–60 µg/mL. Among of fourteen samples, eight were in liquid dosage form (LDF) and six in solid dosage form (SDF). Six commercial samples in LDF and six samples in SDF showed profile compatible with *P. incarnata*. Concentrations were determined for LDF vitexin 17.87 – 29.13 µg/mL and isovitexin 27.47 – 65.07 µg/mL. While SDF samples showed vitexin concentration range 10.00 – 32.26 µg/mL and isovitexin 36.16 – 100.83 µg/mL. The method demonstrated to be reliable and efficient for assay and qualitative analysis of vitexin and isovitexin in *P. incarnata* extracts; for that reason for practical application on quality control. Analysis were performed through high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer detector (LC/MS) to investigate the main phytoconstituents, seven peaks from *P. incarnata* extract could be resolved; and provided strong evidences about the chemical composition of extracts.

KEYWORDS: *Passiflora incarnata*, flavonoid, HPLC, vitexin, isovitexin, quality control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Flor, fruto e folha da espécie <i>Passiflora incarnata</i> Linneaus.....	40
Figura 2 – Principais flavonoides C-glicosilados presentes na espécie.....	43
<i>P. incarnata</i>	43
Figura 3 – Rutina flavonoide não encontrado na espécie <i>P. incarnata</i>	44
Figura 4 - Placa cromatográfica obtida por CCD para a SQR vitexina, extrato de <i>P. incarnata</i> , SQR isovitexina e SQR rutina.....	82
Figura 5 - Cromatograma típico obtido para o extrato de <i>P. incarnata</i> através do método proposto.....	88
Figura 6 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para as SQR vitexina e rutina a 254 por CLAE-DAD.....	89
Figura 7 - Representação gráfica da curva analítica média da SQR vitexina por CLAE.....	95
Figura 8 - Representação gráfica da curva analítica média da SQR isovitexina por CLAE.....	95
Figura 9 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a amostra comercial F2.....	105
Figura 10 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 330 nm para a SQR vitexina.....	106
Figura 11 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD a 255 nm para a SQR rutina.....	108

Figura 12 - Cromatograma obtido o extrato de <i>P. incarnata</i> por CLAE-DAD.....	109
Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para as amostras comerciais em FFL.....	110
Figura 14 - Concentração de vitexina obtida para as amostras comerciais de FFL.....	112
Figura 15 - Concentração de isovitexina obtida para as amostras comerciais em FFL.....	114
Figura 16 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das amostras comerciais em FFS.....	115
Figura 17 - Concentração de vitexina nas formulações comerciais em FFS.....	115
Figura 18 - Concentração de isovitexina nas formulações comerciais em FFS.....	117
Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para as formulações comerciais de FFL.....	118
Figura 20 - Concentração do flavonoide C-glicosilado vitexina nas formulações comerciais FFL.....	118
Figura 21 - Concentração do flavonoide C-glicosilado isovitexina nas formulações comerciais em FFL.....	118
Figura 22. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e espectro de massas obtido por CLAE-EM do extrato de <i>P. incarnata</i>	126
Figura 23. Espectro de massas obtido por CLAE-EM para a SQR vitexina.....	127
Figura 24. Espectro de massas obtido por CLAE-EM para a SQR isovitexina...	128

Figura 25. Espectro de massas e UV do pico (1).....	130
Figura 26. Espectro de massas e UV do pico (4).....	131
Figura 28 - Espectro de massas e UV do pico (2).....	133
Figura 30 - Espectro de massas e UV do pico (3).....	134
Figura 31 - Espectro de massas e UV do pico (5).....	135
Figura 33 - Espectro de massas e UV do pico (6).....	137
Figura 34 - Espectro de massas e UV do pico (7)	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos utilizados para doseamento de flavonoides C-glicosilados por CLAE-DAD.....	55
Tabela 2. Especificações das SRQ utilizadas.....	61
Tabela 3. Resumo das especificações das formulações comerciais.....	63
Tabela 4. Especificações dos reagentes.....	64
Tabela 5. Condições para análise por CCD do extrato de <i>P. incarnata</i>	66
Tabela 6. Condições do Sistema Isocrático por CLAE.....	70
Tabela 7. Construção da curva analítica.....	74
Tabela 8. Esquema de preparo das soluções para o teste de recuperação.....	83
Tabela 9. Resultados obtidos da análise por CCD.....	91
Tabela 10. Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	94
Tabela 11. Áreas das SQR vitexina e isovitexina.....	96
Tabela 12. Resumo dos resultados do estudo da Linearidade.....	97
Tabela 13. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção das curvas analíticas.....	97
Tabela 14. Limites de Detecção e Limites de Quantificação.....	97
Tabela 15. Resultados da precisão intra e interdias para o extrato de <i>P. incarnata</i>	98

Tabela 17. Resumo dos resultados do ensaio de robustez.....	101
Tabela 18. Estudo de estabilidade.....	119
Tabela 19. Concentração dos flavonoides vitexina e isovitexina nas formulações comerciais em FFL.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

ANOVA: Análise de Variância

AcEt: Acetato de etila

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CIM: Concentração Inibitória Mínima

HCOOH: Ácido fórmico

CH₃COOH: Ácido acético

CF₃COOH: Ácido trifluoroacético

EEG: Eletroencefalograma

EM: Espectroscopia de Massas

FB 5: Farmacopeia Brasileira 5^a. Edição (2010)

FF 10: Farmacopeia Francesa 10^a. Edição (2007)

ICH: International Conference on Harmonization

isoPrOH: Álcool isopropílico

***k'*:** Fator de capacidade

MeOH: Metanol

MEC: Metiletilcetona

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

***R_f*:** Fator de retenção

***R_x*:** Quociente entre os *R_f*_{SQR}

TDAH: Distúrbio de déficit de atenção e hiperatividade

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

THF: Tetraidrofurano

***T_r*:** Tempo de retenção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	29
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.	REVISÃO.....	37
3.1.	DESCRIÇÃO DA PLANTA.....	39
3.2.	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA.....	40
3.2.1.	FLAVONOIDES C-GLICOSILADOS.....	42
3.3.	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA.....	44
3.3.1.	ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	45
3.3.2.	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS.....	45
3.3.3.	ESTUDOS CLÍNICOS.....	47
3.4.	OUTRAS ATIVIDADES TERAPÊUTICAS.....	49
3.4.1.	ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	49
3.4.2.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
3.4.3.	TOXICIDADE, EFEITOS ADVERSOS, DOSE E SUPERDOSAGEM.....	50
3.5.	MÉTODOS DE ANÁLISE DE FLAVONOIDES C- GLICOSILADOS.....	51

4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1.	SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR).....	59
4.2.	MATÉRIA-PRIMA.....	61
4.3.	FORMULAÇÕES COMERCIAIS À BASE DE <i>P. incarnata</i>	63
4.4.	REAGENTES.....	63
4.5.	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	65
4.6.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).67	
4.7.	FASE MÓVEL E SOLUÇÃO DILUENTE.....	67
4.8.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E DAS SQR.....	67
4.8.1.	SOLUÇÃO DO EXTRATO.....	67
4.8.2.	SOLUÇÃO DA SQR.....	67
4.9.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD.....	68
4.9.2.	ADEQUABILIDADE DO SISTEMA COMATOGRÁFICO.....	68
4.9.3.	SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO.....	69
4.9.4.	LINEARIDADE.....	69
4.9.5.	LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	71
4.9.6.	PRECISÃO.....	72
4.9.7.	EXATIDÃO.....	72

4.9.7.1.	TESTE DE RECUPERAÇÃO.....	73
4.9.7.2.	PREPARO DAS SOLUÇÕES DA AMOSTRA E DAS SQR PARA O TESTE DE RECUPERAÇÃO.....	72
4.9.9.	ROBUSTEZ.....	75
4.10.	APLICAÇÃO DO MÉTODO ÀS FORMULAÇÕES COMERCIAIS.....	75
4.10.2.	PREPARO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS EM FORMA FARMACÊUTICA LÍQUIDA (FFL).....	76
4.10.3.	PREPARO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS EM FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA (FFS)	
4.11.	ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	77
4.12.	ANÁLISE POR CLAE-DAD E CLAE-DAD-EM.....	77
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.7.	ANÁLISE POR CCD DO EXTRATO DE <i>P. incarnata</i>	81
5.8.	MÉTODO POR CLAE-DAD.....	83
5.2.1	MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO.....	83
5.8.2.	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	84
5.9.	ADEQUABILIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	90
5.10.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-DAD.....	92
5.10.1.	SELETIVIDADE.....	92
5.10.2.	LINEARIDADE.....	93

5.10.3.	LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO.....	97
5.10.4.	PRECISÃO.....	98
5.10.5.	EXATIDÃO.....	98
5.10.6.	ROBUSTEZ.....	100
5.11.	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE ÀS FORMULAÇÕES COMERCIAIS.....	102
5.11.1.	APLICAÇÃO DO MÉTODO ÀS FFL.....	103
5.11.1.1.	ANÁLISE QUALITATIVA DAS FFL.....	103
5.11.1.2.	ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FFL.....	111
5.11.2.	APLICAÇÃO DO MÉTODO ÀS FFS.....	113
5.11.2.1.	ANÁLISE QUALITATIVA DAS FFS.....	113
5.11.2.2.	ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FFS.....	114
5.12.	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FFL.....	116
5.13.	ANÁLISE POR CLAE-DAD E CLAE-EM.....	123
5.13.1.	ANÁLISE POR CLAE-DAD.....	123
5.13.2.	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR CLAE- EM.....	123
5.13.3.	ANÁLISE POR CLAE-EM.....	125
5.13.4.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR CLAE-EM E CLAE-DAD.....	128
6.	CONCLUSÕES.....	141

7.	REFERÊNCIAS	147
8.	ANEXO: ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA PHYTOCHEMICAL ANALYSIS	159

1. INTRODUÇÃO

Segundo a RDC ANVISA Nº. 17, de 16 de abril de 2010, “fitoterápico” é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Essa classe de medicamentos é caracterizada, ainda no mesmo documento, pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A eficácia e segurança dos fitoterápicos são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, da utilização de documentos tecnocientíficos, ou através de evidências clínicas (BRASIL, 2010).

Os fitoterápicos à base de *Passiflora* têm importante papel na medicina tradicional como ansiolítico, sedativo e indutores do sono (DHAWAN *et al.*, 2004). As espécies do gênero *Passiflora* para as quais existe amparo em estudos científicos quanto ao uso popular são *P. incarnata*, *P. actínia*, *P. alata*, *P. edulis* e *P. quadrangularis*. (PROVENSI, 2006). Destas, somente as *P. alata* e *P. edulis* são inscritas na Farmacopeia Brasileira 5ª. Edição (FB 5).

P. incarnata foi a primeira espécie a ser citada na literatura e permanece como a mais extensivamente investigada, devido a sua composição química e atividade terapêutica. Os fitoconstituintes encontrados nas partes aéreas incluem ácidos fenólicos, heterosídeos cianogênicos, alcalóides indólicos, flavonas, além de flavonoides (*C*-glicosilados), em especial vitexina e isovitexina, os quais protagonizam a maioria dos estudos sobre avaliação do potencial terapêutico destes extratos. (REHWALD *et al.*, 1994, PIETTA *et al.* 1998; DHAWAN *et al.* 2001^b; DHAWAN *et al.* 2004; ELSAS *et al.*, 2010). Muitos estudos, voltados à caracterização fitoquímica da espécie, reportam não haver identificado a presença do flavonoide *O*-glicosilado rutina, na espécie *P. incarnata*. Alguns trabalhos sugerem esta característica como propriedade para caracterização da espécie. Desta forma, neste trabalho, a rutina foi empregada como marcador de contaminação da espécie (PEREIRA e VILEGAS, 2000; ABOURASHED *et al.* 2002; MÜLLER, 2006; ANDERSEN e MARKHAN, 2006).

As propriedades terapêuticas mais comumente citadas na literatura para os extratos produzidos a partir das partes aéreas de *P. incarnata* são: atividade sedativa, ansiolítica e anticonvulsivante. Contudo, o mecanismo de ação, pelo qual o extrato produz efeito terapêutico, permanece não esclarecido; suspeitas relacionadas ao elevado conteúdo de flavonoides conduzem as pesquisas no sentido de estabelecer uma relação entre estes constituintes e o efeito observado (SOULIMANI *et al.* 1997; DHAWAN *et al.*, 2001^b; DHAWAN *et al.* 2004; BRASIL, 2008; MOVAFEGH *et al.* 2008).

Considerada como planta medicinal por diversos povos da América do Norte, Europa e Austrália, *P. incarnata* é a espécie do gênero *Passiflora* mais citada em códigos farmacêuticos oficiais, como: *British Herbal Pharmacopoeia* (1996), *Pharmacopoeia Helvetica* (1987), *European Pharmacopoeia* (2001), *Pharmacopée Française* (2007), *Europeia Scientific Cooperative Phytotherapy (ESCOP) monographs* (1997), *European Medicine Agency (EMEA)* (2008), *World Health Organization (WHO) - monographs* (2007), entre outros (McGUIRE, 1999; PARAFITT, 1999; DHAWAN *et al.* 2004).

A Farmacopeia Brasileira (FB 5), por sua vez, contém monografias para doseamento de extratos de maracujá das espécies *P. alata* e *P. edulis*, duas espécies nativas do Brasil; mas não faz referência à espécie *P. incarnata*. Ao mesmo tempo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige, para fins de registro dos medicamentos à base de *Passiflora*, a padronização dos extratos conforme a monografia da espécie *P. incarnata* descrita na *Pharmacopée Française* (2007), onde o teor é determinado em termos do conteúdo total de derivados flavonoídicos, expressos como vitexina.

Ao considerar o exposto, neste trabalho nos propusemos a desenvolver uma metodologia analítica por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD) capaz de identificar e quantificar de forma eficaz, reprodutiva, simples e prática o teor de vitexina e isovitexina presente nos extratos de *P. incarnata*, L. O desenvolvimento desta metodologia tem como premissa o emprego

mínimo de recursos tecnológicos, haja vista o propósito de disponibilizar uma ferramenta prática e simples para aplicação diária no controle de qualidade em laboratórios de diferentes escalas. E que atenda às exigências da legislação brasileira e aos padrões internacionais de qualidade, de modo a contribuir para assegurar a qualidade e segurança dos medicamentos fitoterápicos à base de *P. incarnata* dispensados à população.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para identificação e doseamento dos flavonoides vitexina e isovitexina em extratos de *P. incarnata*

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aplicar o método proposto na identificação e doseamento de formas farmacêuticas líquidas e sólidas disponíveis no comércio da Região Metropolitana de Porto Alegre/RS.

Avaliar a estabilidade das formulações comerciais quanto ao tempo de prateleira.

Avaliar através da comparação dos resultados obtidos por CLAE-UV e CL-EM a composição química do extrato de *P. incarnata* utilizado no desenvolvimento do método.

3. REVISÃO

3.1. DESCRIÇÃO DA PLANTA

Passiflora incarnata Linneaus (**Figura 1**) é uma vinha escaladora pertencente à família pantropical *Passifloraceae* originária da América do Norte, onde é conhecida como “*maracock*”, “*maypop*”, “*wild passionflower*”. Seu habitat natural inclui regiões de clima subtropical e temperado, com solo seco e pobre. Por esta razão, seu cultivo é bem sucedido na América do Norte, Europa e Austrália (SOULIMANI *et al.* 1997; DHAWAN *et al.* 2004; YOCKTENG *et al.* 2011).

As folhas são simples, verdes, glabras, trilobadas, palmadas imparipenadas de bordas serrilhadas e medem de 6 a 15 cm de comprimento ao longo da nervura central. A flor apresenta estrutura grande ornada com inúmeros apêndices filamentosos de cor violeta entre a corola de pétalas arroxeadas e os estames, formando uma espécie de coroa. Os frutos são ovalados, de cor verde claro, polpa branca e sabor amargo (McGUIRE, 1997; DHAWAN *et al.* 2001^c; KURTZ *et al.* 2003).

A morfologia da flor é característica do gênero *Passiflora*, cujo nome deriva da expressão “flor da paixão” atribuída simbolicamente à “Paixão de Cristo” devido à presença de estigmas tripartidos (porção feminina) associados à Santíssima Trindade; cinco estames (porção masculina) simbolizando as Chagas de Cristo e à corola que representaria a coroa de espinhos. As folhas e florescências (partes aéreas) são empregadas na produção de chás e extratos (McGUIRE, 1991; DHAWAN *et al.* 2001^c, YOCKTENG *et al.*, 2011).

Figura 1 – Flor, fruto e folha da espécie *Passiflora incarnata* Linneaus.



Fonte: foto (1) - MAYER, 2009; foto (2) – MILLER & MULLER, 2005; foto (3) - BUCKALLEW, 2013.

3.2. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

Os fitoconstituintes mais frequentemente encontrados nos extratos obtidos a partir das partes aéreas de *P. incarnata* são em sua maioria flavonoides, em especial os flavonoides C-glicosilados, derivados de luteonina e apigenina, como: vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, schaftosídeo e isoshaftosídeo (HARBONE, 1993; ABOURACHED *et al.*, 2002; REIMBERG, 2006). **Figura 2.**

Outros flavonoides são encontrados em menor abundância, como: quercetina, canferol, luteonilina-7-*O*-glicosídeo, 6- β -D-alopiranosil-8-xilopiranosil-apigenina, isotexina-2''-*O*-glicopiranosídeo, isorientina-2''-*O*-glicopiranosídeo, 2-glicosilapigenina, isoscoparina-2''-*O*-glicosídeo, 2''-*O*-glicosil-6-*C*-glicosilapigenina, 6- β -glicopiranosil-8- β -D-ribopiranosil apigenina, swertisina, isoswertisina, espinosina, vitexina-4'-*O*-ramnosídeo, isovitexina-2'-*O*- β -glicosídeo, isoscoparin-2''-*O*-glicosídeo e isorientina-2''-*O*- β -glicosídeo (DHAWAN *et al.* 2004; ELSAS *et al.* 2010; ZERAIK *et al.* 2010; ZUCOLOTTI *et al.* 2011).

Os estudos a cerca da composição fitoquímica da espécie *P. incarnata* coincidem quanto à presença constante de vitexina nos extratos. Enquanto, apesar

de extensa pesquisa, a presença do flavonoide *O*-glicosilado rutina (**Figura 3**), comum nas espécies brasileiras de *Passiflora* (*P. alata* e *P. edulis*) não foi identificado em *P. incarnata*. Alguns estudos sugerem ainda, o emprego desta característica química como uma propriedade a ser explorada na identificação da espécie (OGA *et al.* 1984; FREITAS, 1985; MORAES *et al.* 1997; PEREIRA e VILEGAS, 2000; MULLER, 2006; ZERAIK, 2011; ZUCOLOTTO, 2005; ANDERSEN e MARKHAN, 2006).

O teor de flavonoides apresentados na literatura para a espécie varia conforme a origem da planta e a forma de obtenção dos extratos. Alguns autores reportam teor total de flavonoides para espécie na faixa de 1,1 – 2% (QIMIN *et al.* 1991; BILIA *et al.* 2002). A ANVISA adota para fins de registro de medicamentos à base de *Passiflora* a monografia da espécie *P. incarnata* descrita na Farmacopeia Francesa, cujo teor preconizado para o extrato seco é especificado entre 2,2 – 2,5% de flavonoides totais expressos como vitexina, através da técnica de Espectrofotometria no UV; enquanto para extrato fluido o teor é definido em 0,6% para flavonoides totais, expressos como vitexina. Nesse documento, a técnica de Espectroscopia no UV é empregada na análise qualitativa e quantitativa de extratos de *P. incarnata* (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 10^a. ed., 2007; BRASIL, 2010).

O extrato das partes aéreas apresenta, em média, conteúdo de 0,06 – 0,89% vitexina; 0,11–1,06% de isovitexina; 0,01% de orientina; 0,06–0,21% de isoorientina e 0,05–0,47% de shaftosídeo/isoshaftosídeo (REHWALD *et al.* 1994; BILIA *et al.* 2001; PEREIRA *et al.* 2004; MULLER, 2006).

Outras substâncias reportadas para espécie incluem alcaloides indólicos, como: harmana, harmol e harmina, além, de carboidratos (sacarose, D-glicose e D-frutose), óleos essenciais (álcool benzílico, linalol, hexanol, eugenol), aminoácidos (GABA) e um glicosídeo cianogênico (ginocardina) (ABOURACHED *et al.* 2002; DHAWAN *et al.* 2004).

3.2.1. FLAVONOIDES C-GLICOSILADOS

A estrutura dos C-flavonoides vitexina e isovitexina é caracterizada pela presença de uma molécula de glicose diretamente ligada ao núcleo aromático do sistema benzoil (anel A) através de uma ligação carbono-carbono. **Figura 2.** Estes açúcares ligados diretamente a carbonos são encontrados apenas nas posições 6 e 8. O padrão de hidroxilação das flavonas é caracterizado pela presença de uma hidroxila ligada à posição 4' do sistema cinamoil (anel B) (MABRY *et al.* 1970).

As características estruturais destas moléculas, posição da glicose e o padrão de hidroxilação dos anéis A e B são utilizados como estratégia para aplicação de técnicas como ES-UV, CLAE-DAD e CLAE-EM em estudos de identificação de substâncias, determinação quantitativa e avaliação da atividade biológica.

Figura 2 – Principais flavonoides C-glicosilados presentes na espécie *P. incarnata*.

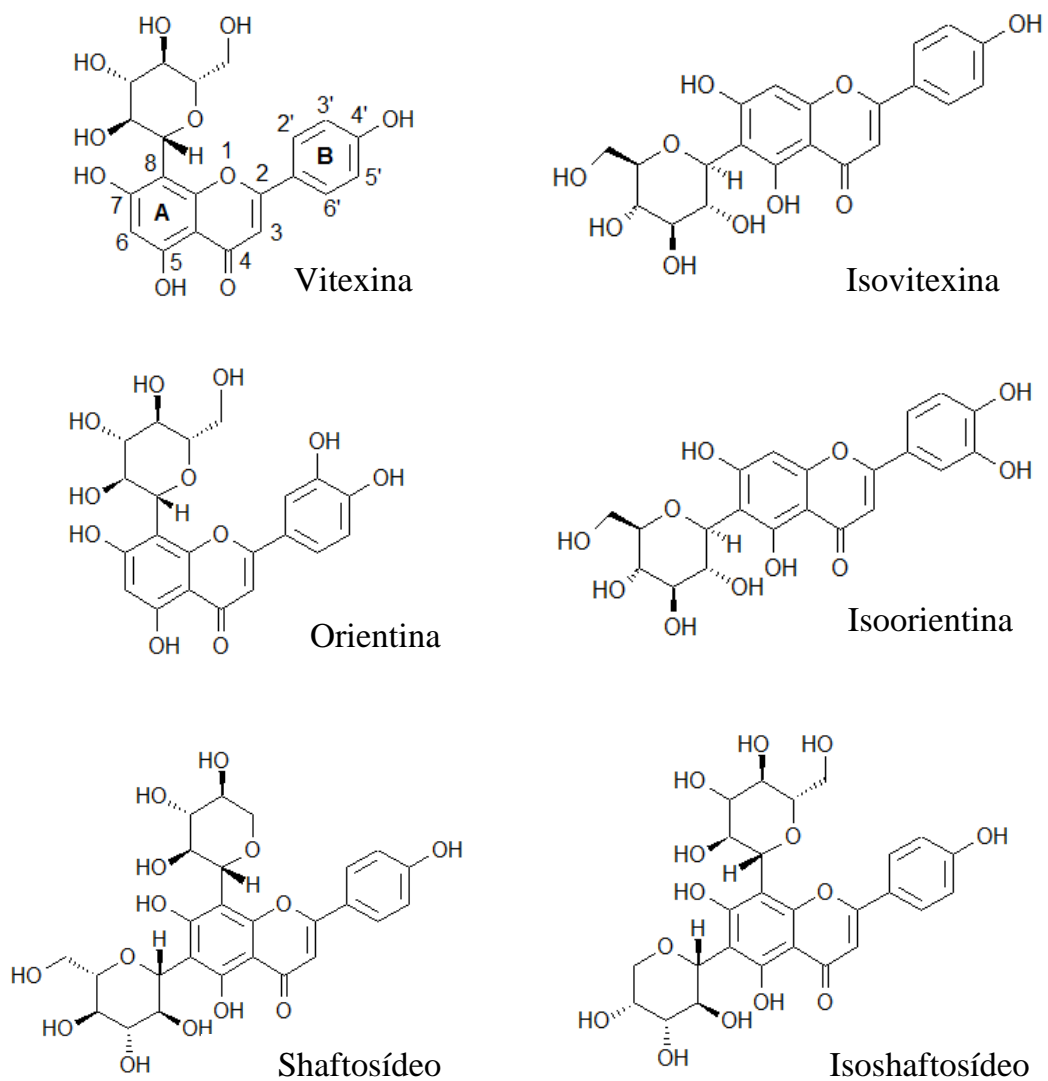
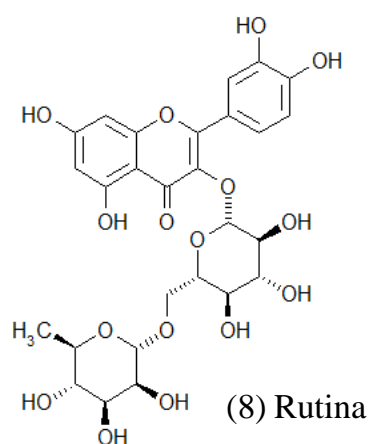


Figura 3 – Rutina flavonoide não encontrado na espécie *P. incarnata*.



3.3. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

As aplicações clínicas mais amplamente reportadas para a espécie *P. incarnata* envolvem a atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), em especial, relacionadas ao caráter ansiolítico e sedativo dos extratos (DHAWAN *et al.* 2001a; KRENN, 2002).

Embora os efeitos ansiolítico e sedativo sejam reportados concomitantemente nos trabalhos, é importante diferenciá-los conceitualmente, para compreender como eles se processam e distinguir possíveis interferências destes efeitos entre si.

Segundo AKHONZADEH (2007) ansiedade é definida como uma reação comum a um estresse significante da vida. É caracterizado pelo medo e apreensão que pode ou não estar associado a um estímulo claramente identificável. De outra forma, o efeito sedativo é definido, segundo GIROND e WAREKEMPER (2006), como sinônimo de calmante e consiste na indução da redução do nível de consciência com ou sem percepção da dor, mantendo a respiração espontânea e a capacidade de resposta a comandos de voz. Em menor intensidade o efeito

calmante se manifesta na indução do sono por diminuição da atividade elétrica do cérebro.

3.3.1. ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

A avaliação das propriedades dos extratos de *P. incarnata* de reduzir a ansiedade e a insônia tem repetidamente servido de objeto de pesquisas envolvendo tanto estudos pré-clínicos, como estudos clínicos. Contudo, um número limitado de trabalhos tem sido direcionado à compreensão do mecanismo de ação pelos quais os extratos promovem estes efeitos (CAPASSO e SORRENTINO, 2005; APPEL *et al.*, 2011).

3.3.2. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Um trabalho apresentado por DHAWAN e colaboradores (2001b), relata atividade ansiolítica de frações obtidas a partir do extrato metanólico das folhas de *P. incarnata*. Neste estudo, a dose de 125 mg/kg administrada, por via oral a camundongos, apresentou efeito equivalente ao diazepam na dose de 2 mg/kg.

O efeito ansiolítico de extratos obtidos das partes aéreas de *P. incarnata* e *P. edulis* foi comparado por DHAWAN e colaboradores (2001a). Os extratos metanólicos de *P. incarnata* na dose de 125 mg/kg exibiram efeito ansiolítico equivalente ao diazepam, para dose de 2 mg/kg, enquanto para *P. edulis* nenhum efeito ansiolítico foi observado, nas mesmas condições de ensaio. Ainda neste estudo, os autores constataram a ocorrência de efeito ansiolítico dose-dependente para os extratos de *P. incarnata*. O efeito máximo foi obtido com a dose de 125 mg/kg, enquanto, surpreendentemente, na dose de 300 mg/kg não foi observada atividade ansiolítica. Segundo os autores, o efeito ansiolítico pode ter sido mascarado pelo efeito sedativo, quando doses elevadas foram administradas.

Outro estudo desenvolvido por CAPASSO e SORRENTINO (2005) reporta o efeito redutor da hipermotilidade, induzida por anfetamina, em camundongos tratados com extrato hidroetanólico (70%) de *P. incarnata*, na dose de 250 mg/kg.

Neste estudo, os autores observaram ainda, para a mesma dose do extrato o prolongamento do tempo de sono induzido por pentobarbital.

A atividade ansiolítica em camundongos foi avaliada após administração oral de um extrato comercial de *P. incarnata*, cujos constituintes majoritários foram identificados como isovitexina, vitexina, orientina e homoorientina. A dose de 375 mg/kg do extrato apresentou efeito ansiolítico comparável ao diazepam na dose de 1,5mg/kg. Os autores observaram ainda, que o efeito ansiolítico do extrato de *P. incarnata* foi inibido quando flumazenil, antagonista do receptor GABA_A, foi previamente administrado. Por outro lado, a administração prévia de WAY-100 635, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5HT1A não antagonizou o efeito do extrato (GRUNDMANN *et al.*2008).

Outro trabalho apresentado por ELSAS e colaboradores (2010) ao investigar o mecanismo de ação do extrato de *P. incarnata* relata a ocorrência de correntes diretas via canal GABA_A em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. Segundo os autores, este efeito é dependente da presença do neurotransmissor GABA no extrato.

Recentemente, SAMPATH e colaboradores (2011) investigaram comparativamente o efeito ansiolítico em camundongos a partir da administração oral: de frações butanólica, éter de petróleo, clorofórmica e etanólica de extratos de *P. incarnata*. Os maiores efeitos foram observados para a fração clorofórmica nas concentrações de 0,17 mg/kg e 0,34 mg/kg as quais correspondem às doses totais de 150 mg/kg e 300 mg/kg do extrato; a fração butanólica apresentou maior efeito nas concentrações de 2,1 mg/kg e 4,2 mg/kg, equivalendo a uma dose total de 150 mg/kg e 300 mg/kg do extrato, enquanto para a fração de éter de petróleo nenhum efeito ansiolítico foi observado. Nenhum efeito sedativo ou estimulatório foi observado para as diferentes frações nas concentrações testadas.

APPEL e colaboradores (2011) investigaram através de estudo *in vitro* (células do hipocampo de ratos) a atividade ansiolítica sobre o sistema GABA do PASCOFLAIR®, formulação comercial, cujo único ingrediente ativo é o extrato

seco extrato de *P. incarnata*. Neste estudo os valores de IC₅₀ (944 e 1122 µg/mL) para a ligação competitiva pelo sítio benzodiazepínico (GABA_A) entre o PASCOFLAIR® e o GABA foram semelhantes e muito elevados. Estes achados contradizem o trabalho de ELSAS e colaboradores (2010), quanto à importância da presença de GABA na ligação do PASCOFLAIR® ao sítio benzodiazepínico, além de sugerir a improvável ligação do extrato a este sítio. Os autores sugerem que os extratos inibiram a ligação do [³H]-CGP 54626, um potente e seletivo antagonista do receptor GABA_B. Estes achados foram confirmados através do baixo valor de IC₅₀ (34 µg/mL) dos extratos, quando comparados aos valores de IC₅₀ do bacofleno IC₅₀ (61 µg/mL), agonista do receptor do receptor GABA_B, por esta razão os extratos de *P. incarnata* devem ser considerados como antagonistas deste receptor.

3.3.3. ESTUDOS CLÍNICOS

AKHONDZADEH e colaboradores (2001) reportaram a eficácia ansiolítica de um extrato obtido das partes aéreas de *P. incarnata* (45 gotas/dia) em estudo envolvendo, ensaio duplo cego randomizado, com dependentes químicos de ópio e submetidos à desintoxicação. Todos os pacientes envolvidos no estudo foram identificados como dependentes químicos de ópio conforme o protocolo descrito em Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 4th edition (DSM-IV). A intensidade dos sintomas de abstinência foram avaliados segundo “*The Short Opiate Withdrawal Scale*” (SOWS). Neste trabalho, os autores destacam o efeito positivo da combinação de clonidina (0,8 mg/dia) e *P. incarnata* (60 gotas/ dia) no desenvolvimento de resposta mais rápida na redução dos sintomas agudos de retirada do ópio, quando comparados a ação da clonidina sem adição de extrato. Em ambos os estudos foi utilizado o extrato comercial PASSIPAY® TM (Iran Darouk), sem descrição da preparação e padronização do extrato.

Um estudo randomizado comparou a eficácia da co-administração de PASSIPAY® TM (0,04 mg/kg/dia) e de metilfenidato (1 mg/kg/dia), durante 8 semanas, em 34 crianças com diagnóstico de distúrbio déficit de atenção/hiperatividade (TDAH). Ambos os tratamentos apresentados foram eficazes e o grupo que recebeu o extrato de *P. incarnata* apresentou menor incidência de efeitos adversos como ansiedade, irritabilidade e perda de apetite do que o grupo metilfenidato (AKHONDZADEH *et al.* 2005).

MOVAFEGH e colaboradores (2008) revelaram que o extrato de *P. incarnata* é capaz de reduzir a ansiedade pré-operatória, quando administrado cerca de 90 minutos antes da cirurgia, sem contudo, causar indução de sedação ou alteração nas funções psicomotoras.

ASLANARGUN e colaboradores (2012) destacam a segurança e eficácia da aplicação clínica dos extratos de *P. incarnata*, na redução da ansiedade em pacientes antes da anestesia espinal. O estudo envolveu ensaio duplo cego randomizado com sessenta voluntários. Todos os pacientes foram submetidos à avaliação pelo protocolo “*Stait-Trait Anxiety Inventory (STAI) Questionary*”, da Sociedade Americana de Psiquiatria, o qual fornece uma medida básica da ansiedade do indivíduo. Este método é dividido em duas partes “*Trait Anxiety Inventory (STAI-T)*” e o “*State Anxiety Inventory (STAI-S) scores*”. Estes testes foram realizados antes da administração do extrato de *P. incarnata* e repetidos 30 minutos após a administração. Os parâmetros hemodinâmicos (batimentos cardíacos, pressão sistólica, diastólica e pressão arterial) foram avaliados antes e após a administração do extrato. Trinta pacientes receberam a dose de 700 mg de extrato de *P. incarnata* por via oral: enquanto outros 30 pacientes receberam placebo. Após 30 minutos da administração os autores não observaram diferenças nos parâmetros hemodinâmicos entre os 60 pacientes envolvidos no estudo. Contudo, os 30 pacientes tratados com extrato de *P. incarnata* demonstraram significativa redução nos níveis de ansiedade segundo o protocolo STAI, quando comparados aos pacientes que receberam o placebo. Os autores concluem que 700 mg de extrato aquoso de *P. incarnata* foi capaz de suprimir o aumento dos níveis

de ansiedade em pacientes, sem causar sedação, alteração nas funções psicomotoras ou hemodinâmicas.

A técnica de Eletroencefalograma (EEG) foi empregada por DIMPFEL *et al.* 2012., para avaliar a duração do efeito ansiolítico e calmante do PASCOFLAIR® 425 mg, formulação comercial de extrato de *P. incarnata* após a administração de dose única, bem como avaliar o efeito da formulação no desempenho cognitivo de 16 voluntários. Para todos os pacientes e testes realizados frente ao placebo, PASCOFLAIR® apresentou efeito de modulação da atividade elétrica do cérebro. A dissipação do efeito PASCOFLAIR® foi observada após 4 h da administração. E nenhuma influência sobre a atividade mental foi observada para os testes de desempenho psicométrico. Ao contrário, durante os testes de memória o aumento da atividade detectada nos eletrodos frontais sugere uma melhor aptidão cerebral durante o efeito de PASCOFLAIR®.

3.4. OUTRAS ATIVIDADES TERAPÊUTICAS

3.4.1. ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO

O extrato metanólico das folhas de *P. incarnata* exibiu atividade antitussígena no modelo de tosse induzidas por dióxido de enxofre, em camundongos, para doses entre 100–200 mg/kg, administrados por via oral (DAHWAN e SHARMA, 2002).

Outro artigo, destaca a atividade espasmolítica dos extratos de *P. incarnata* administrados por via oral, na dose de 100 mg/kg a cobaias com dispneia induzida por cloridrato de acetilcolina (DAHWAN *et al.* 2003).

Estes achados corroboram as alegações etnofarmacológicas da eficácia da espécie no manejo das crises de tosse.

3.4.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O extrato metanólico de *P. incarnata* exibiu Concentração Inibitória Mínima (CIM) igual a 50 µg/mL frente à bactéria *Helicobacter pylori*, relacionada ao desenvolvimento de gastrite e úlcera péptica (MAHADY *et al.* 2005).

A atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi reportada para frações de *P. incarnata* obtidas de frações de acetato de etila e metanólica, com valores de CIM de 0,12 e 0,24, e 0,0037 e 0,009 µg/mL, respectivamente. Os extratos aquosos não apresentaram atividade contra estas cepas (PATIL, 2005).

3.4.3. TOXICIDADE, EFEITOS ADVERSOS, DOSE E SUPERDOSAGEM

P. incarnata é considerada como “erva sedativa de uso seguro” pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Contudo, a monografia da WHO (2001) faz referencia a toxicidade dos extratos aquosos para camundongos quando a dose de 900 mg/kg foi administrada por via intraperitoneal. Segundo o mesmo documento, a dose letal média para camundongos corresponde a 37 mL/kg do peso corporal, do extrato etanólico a 30% das partes aéreas de *P. incarnata*. Não há registros de toxicidade para extratos aquosos administrados por via oral na dose entre 500 – 900 mg/kg do peso corporal em camundongos.

Apesar da limitada literatura a respeito da toxicidade da espécie, a presença de algumas substâncias de reconhecido potencial toxicológico, presentes nos extratos são responsáveis pela ocorrência de manifestações indesejáveis. Em especial, os glicosídeos cianogênicos, cuja toxicidade não pode ser descartada e os alcaloides indólicos como *passiflorina*, um indutor de contrações uterinas, torna o uso de *P. incarnata* contraindicado para gestantes (DHAWAN *et al.* 2004; MOVAFEGH *et al.* 2008).

Alguns poucos casos isolados são relatados sobre a ocorrência de efeitos adversos associados a *P. incarnata*. Esses efeitos foram relacionados à hipersensibilidade e intolerância do indivíduo por algum dos fitoconstituintes ou, ainda com a utilização de doses acima do recomendado. Os efeitos mais frequentemente encontrados são náusea, vômito, taquicardia, urticária e vasculite (SMITH *et al.* 1993, FISHER *et al.* 2000).

A posologia diária recomendada para adultos para efeito sedativo varia de 0,5–2,0 g das partes aéreas até 4 vezes ao dia; 2,5 g como infusão, 4 vezes ao dia; de 1,0–4,0 mL como tintura na proporção (1:8), 3 vezes ao dia (WHO, 2001).

Efeitos decorrentes da superdosagem foram observados em modelos animais e incluem espasmos e paralisia nos membros, para casos agudos, após administração intraperitoneal. Em doses medicinais administradas, por via oral, não foram observadas manifestações adversas (DHAWAN *et al.* 2002).

3.5. MÉTODOS DE ANÁLISE DE FLAVONOIDES C-GLICOSILADOS

Os flavonoides C-glicosilados são considerados como marcadores da espécie *P. incarnata* devido a sua grande prevalência, diversidade estrutural e disponibilidade de métodos qualitativos e quantitativos de análise. Estas substâncias são empregadas como marcadores químicos adequados para autenticação de amostras, propiciar a diferenciação entre espécies taxonomicamente semelhantes e detectar adulterações. Contudo, o doseamento destas espécies envolve esforço criterioso devido à escassa estabilidade e à baixa concentração destes compostos nos extratos (STOBIECKI *et al.* 2000; ABOURACHED *et al.* 2002; NORIEGA *et al.* 2011, GOSMANN *et al.* 2011).

Do ponto de vista químico, flavonoides C-glicosilados são ácidos fracos de natureza polar, ou moderadamente polar e, portanto, são solúveis em solventes como etanol, metanol, butanol e combinações destes solventes com água. São mais estáveis do que os flavonoides O-glicosilados, mas podem sofrer degradação em

meio alcalino na presença de oxigênio e apresentam baixa sensibilidade à luz, temperatura e umidade (MABRY *et al.* 1970; ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

A FB 5, Farmacopeia Francesa (Pharmacopée Française, 2007), Farmacopeia Helvetica (Pharmacopeia Helvetica, 1987) e Farmacopeia Alemã (Deutsches Arzneibuch, 1996), determinam o doseamento dos extratos de *P. incarnata* através da técnica de Espectroscopia-UV. Esta técnica, entretanto, oferece baixa seletividade e permite somente o doseamento em termos de flavonoides totais. Além disso, requer longo tempo de tratamento da amostra antes das análises. (CHABARIBERI *et al.* 2008; MÜLLER, 2006).

A CLAE se destaca como uma ferramenta eficiente para análise quantitativa de *Passiflora*; os méritos desta técnica decorrem da alta seletividade, de dispensarem as etapas de derivatização das amostras e possibilitarem a resolução de formas isoméricas, como vitexina e isovitexina (PEREIRA *et al.* 2004).

As cromatografias líquidas de Fase Reversa (FR) constituem invariavelmente o método de escolha para separação de espécies C-flavonoídicas. Usualmente colunas C8 e C18 são empregadas em associação com solventes como, metanol, isopropanol, tetraidrofurano e acetonitrila, os quais atuam como modificadores de fase orgânica. (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997).

Na **Tabela 1** se encontra um resumo dos métodos por CLAE para determinação de flavonoides C-glicosilados.

Outra técnica utilizada mais recentemente para o estudo de flavonoides complexos é a Cromatografia Líquida acoplada a detector de Espectroscopia de Massas (LC-MS). A CLAE-EM é uma ferramenta sensível e eficiente para determinação de espécies químicas com baixo Limite de Detecção (LD) e oferece como vantagem de isolar a substância de interesse. (VALLEJO *et al.* 2004; YUJIE *et al.* 2008).

Segundo COLOMBO e colaboradores (2009), é possível obter dados suficientes para identificação e distinção de flavonoides *C*-glicosilados por CLAE–EM, à medida que possa ser caracterizado o pico intenso do íon molecular das agliconas e associá-lo ao padrão de fragmentação dos substituintes dos anéis A e B. Os autores acrescentam ainda, a vantagem do modo negativo de ionização para identificação de flavonoides complexos, em detrimento do modo positivo; a maior sensibilidade do modo negativo favorece não só a determinação da massa da substância como a identificação (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997; ZUCOLOTTO *et al.* 2011).

Um estudo apresentado por BILLIA e colaboradores (2002) reporta a identificação dos flavonoides *C*-glicosilados através do cruzamento das informações obtidas por CLAE–UV e CLAE–EM de extratos de *P. incarnata*. Neste estudo a associação dos tempos de retenção (*Tr*) e das massas moleculares (MM) permitiu caracterizar as substâncias: vitexina, isovitexina, schaftosídeo e isoshaftosídeo. As condições cromatográficas foram as mesmas para as duas técnicas e incluíram uma coluna MERCK® LiChrosorb FR C18 (250 x 4,6 mm), fase móvel composta por H₂O/ACN/H₃PO₄ (pH 3,0) (88:12 v/v) de 0 – 10 minutos, modo de eluição gradiente e leitura nos comprimentos de onda de 254, 280, 330 e 350 nm. A análise por Espectroscopia de Massas (EM) envolveu o modo de Ionização por Eletro Spray (ESI), temperatura do quadrupolo de 350 °C, nebulizador a 30 psi, voltagem do capilar de 3,5 kV, modo positivo de ionização e intervalo de rastreamento de massa entre 100 e 800 m/z.

Outro estudo reporta o desenvolvimento de uma estratégia de identificação de compostos fenólicos através do emprego da CLAE–UV acoplada com detector (ES). Segundo os autores, o padrão de fragmentação das substâncias descrito na literatura científica, associado ao tempo de retenção (*Tr*) e a MM fornece subsídios necessários à caracterização de 72 compostos fenólicos comumente encontrados nas frutas, entre eles, vitexina e isovitexina. As condições analíticas da CLAE para os polifenóis consistiram numa coluna Phenomenex® FR C18 (150 x 4,6 mm)

temperatura do forno 30 ° C, fase móvel composta por H₂O/MeOH/CH₃COOH (pH 3,0) (99,5:0:0,5 v/v/v) de 0 – 2 minutos, modo de eluição gradiente. Devido ao caráter ácido-base das antocianidinas a fase móvel foi modificada para um pH mais ácido, composta por H₂O/ACN/CF₃COOH (87,5:12:0,5 v/v/v) de 0 – 15 minutos, modo de eluição gradiente. Os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda 200 a 600 nm. Neste estudo dois sistemas de detecção por ES foram adotados; primeiro para determinação das MM e o segundo para obtenção dos espectros. Para o primeiro sistema foi usado o modo de ionização por ESI, temperatura de 300° C, voltagem do capilar 3,2 kV (modo positivo) e 2,7 kV (modo negativo). O segundo sistema utilizou um cone de voltagem em modo positivo (15, 30 e 45 kV e para antocianidinas 60 kV) em modo negativo (30 kV). O intervalo de rastreamento de massa incluiu de 50 a 1000 m/z (ABAD-GARCÍA *et al.* 2009).

Tabela 1. Resumo dos métodos utilizados para doseamento de flavonoides C-glicosilados por CLAE-DAD.

<i>Composto</i>	<i>Coluna</i>	<i>Modo de Eluição</i>	<i>Fase Móvel</i>	<i>Detecção Ultravioleta</i>	<i>Autor</i>
Vitexina Isovitexina Shaftosideo Isoshaftosideo	Knauer® (100 x 4 mm) Hypersil ODS 5 µm	Gradiente	(A) THF/isoPrOH/ACN (10:2:3 v/v/v) (B)(H ₂ O/Ác. Ortofosfórico (95,5: 0,5)	Ultravioleta Em 347, 336, 260 nm	REHWALD <i>et al.</i> 1994.
Vitexina Isovitexina	Merck® LiChrosorb FR C18 (250 x 4,6 mm)	Gradiente	(A)H ₂ O/H ₃ PO ₄ (pH 3,0) (B) ACN (88:12 v/v)	Ultravioleta Em 335 nm, 336 nm	BILLIA <i>et al.</i> 2001
Vitexina Isovitexina Orientina Isoorientina	Phenomenex® Hypersil RP C18 (150 x 4,6 mm)	Gradiente	(A)H ₂ O/H ₃ PO ₄ (B) ACN/THF/ isoPrOH (80:80:20 v/v/v) (pH 3,1) Forno: 40 °C	Ultravioleta Em 280 nm	ABOURACHED <i>et al.</i> 2002
Vitexina Isovitexina	Phenomenex® RP C18 (250 x 4,6 mm)	Gradiente	(A) (H ₂ O/HCOOH) (95:5) (B) (H ₂ O/ACN/MeOH/HCOOH) (50:22,5:22,5:5 v/v/v/v)	Ultravioleta Em 330 nm	GALLORI, <i>et al.</i> 2004.
Vitexina	Waters® Spherisorb ODS (250 x 4.6 mm)	Isocrático	H ₂ O/THF/ isoPrOH (80:15:5 v/v/v)	Ultravioleta Em 340 nm	PONGPAN <i>et al.</i> 2007
Vitexina Isovitexina	Symmetry®C18 (250 x 4.6 mm)	Gradiente	(A) H ₂ O/CH ₂ COOH (B) ACN, 40 °C	Ultravioleta Em 330 nm	ZERAIK, <i>et al.</i> 2011.
Vitexina Isovitexina Orientina Isoorientina Vicenina-2	Luna C18 (150 x 4,6 mm)	Isocrático	(A)H ₂ O/H ₃ PO ₄ (B)THF/ isoPrOH /ACN (10:2:3 v/v/v) (12% B em A)	Ultravioleta Em 340 nm	ZUCOLOTTO <i>et al.</i> 2011

4. CONCLUSÕES

- O método adaptado para análise por CCD da FB 3 permitiu a caracterização dos flavonoides C-glicosilados vitexina e isovitexina, além do flavonoide O-glicosilado rutina.
- A pesquisa por CCD revelou a presença dos flavonoides vitexina e isovitexina, além da ausência do flavonoide rutina no extrato de *P. incarnata*. A confirmação da presença de vitexina associada à concomitante ausência de rutina permite qualificar o extrato como compatível com a espécie *P. incarnata* e, portanto, adequado aos propósitos dos estudos subsequentes.
- Um método por CLAE para o controle de qualidade de extrato seco de *P. incarnata* foi desenvolvido em acordo com a premissa de empregar o mínimo de recursos tecnológicos. Este método é caracterizado pelo emprego de modo de eluição isocrático, fase móvel binária (alta proporção de água) e injeção manual.
- O método desenvolvido por CLAE permite a separação e identificação dos flavonoides vitexina, isovitexina nos extratos de *P. incarnata*. Bem como, a separação e identificação do flavonoide rutina em extratos de *Passiflora*.
- A identificação inequívoca dos picos dos flavonoides vitexina e isovitexina nos extratos foi realizada frente à comparação com as respectivas SQR.
- O método analítico desenvolvido foi validado e demonstrou ser seletivo, preciso, exato e robusto para quantificação dos flavonoides vitexina e isovitexina nos extratos de *P. incarnata*.
- A estratégia inovadora proposta neste trabalho para caracterização preliminar da espécie *P. incarnata* demonstrou ser eficiente para identificação de contaminação grosseira nas amostras comerciais de FFL, FFS e extratos vegetais de *Passiflora*.

- Aplicação da estratégia de caracterização preliminar da espécie *P. incarnata* identificou duas formulações comerciais em FFL com insumo vegetal incompatível para a espécie em estudo.
- Todas as formulações comerciais em FFS apresentaram perfil compatível com a espécie *P. incarnata*.
- O estudo de estabilidade realizado durante cinco meses, para avaliação do efeito de prateleira nas formulações comerciais em FFL demonstrou redução significativa na concentração de vitexina, enquanto que, para o flavonoide isovitexina a redução de concentração foi moderada.
- O método analítico desenvolvido para CLAE-DAD demonstrou ser eficiente para análise do extrato de *P. incarnata* por CLAE-EM.
- A análise do extrato de *P. incarnata* por CLAE-EM e CLAE-DAD permitiu estabelecer correspondência entre as duas técnicas para sete picos cromatográficos. As massas moleculares e os comprimentos de onda máximos de absorção de cada um dos sete picos correspondentes nas duas técnicas (CLAE-EM e CLAE-DAD) puderam ser identificados.
- A identificação inequívoca dos picos dos flavonoides vitexina e isovitexina nos extratos foi realizada frente à comparação com as respectivas SQR.
- Um dos sete picos não pode ser identificado e hipóteses de moléculas candidatas não foram sugeridas. Para as MM e comprimentos de onda de absorção obtidos experimentalmente, nenhuma correspondência pode ser estabelecida com o repertório de fitoconstituintes da espécie *P. incarnata*.
- Para quatro picos foram encontradas no elenco das espécies químicas comumente reportadas para a espécie *P. incarnata* correspondências entre os dados

experimentais e teóricos, com relação às MM e os comprimentos de onda máximos de absorção.

- As análises por CLAE-EM para investigar sete picos cromatográficos não foram conclusivas, mas forneceram fortes evidências sobre a composição química do extrato de *P. incarnata*.

5. REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. High-speed Extraction and HPLC Fingerprint of Medicinal Plants – I. Application to *Passiflora* Flavonoids. *Pharm. Biol.*, v. 40, n. 2, p. 81-91.2002.
- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; GARMÓN-LOBATO, S.; GALLO, B.; VICENTE, F.A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, v. 1216, p. 5398–5415, 2009.
- AKHONDZADEH, S.; NAGAVI, H. R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. *Passiflora* in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *J. Clin. Pharm. Ther.*, v. 26, p. 363—367, 2001.
- AKHONDZADEH, S.; MOHAMMADI, M. R.; MOMENI, F. *Passiflora incarnata* in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. *Therapie*, v. 2, n. 4, p. 609-614, 2005.
- AKHONDZADEH, S. Herbal Medicines in the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. Low-cost approaches to promote physical and mental health, Part 2; New York, Springer, 2007, chapter 6,119—138.
- ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAN, K. R. Flavonoids—Chemistry, Biochemistry and Applications. New York, C. R. C. Taylor & Francis Group, 2006, 1256 p.
- APPEL, K.; ROSE, T.; FIEBICH, B.; KAMMLER, T. HOFFMANN, C.; WEISS, G. Modulation of the g-Aminobutyric Acid (GABA) System by *Passiflora incarnata* *Phytother. Res.*, v. 25, p. 838–843, 2011.
- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, B.; ASLAN, E.; MUSTAFA, U. Y. *Passiflora incarnata* Linneaus as an anxiolytic before spinal anesthesia. *J. Anesth.*, v. 26, p. 39—44, 2012.
- BILIA, A. R.; SALVINI, D.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F.; Characterization of *Calendula Flower*, *Milk-Thistle* Fruit, and *Passion Flower* Tinctures by HPLC-DAD and HPCLAE-EM. *Chromatographia*, v. 53, n. 3, p. 210-214, 2001.
- BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; GALLORI, S.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Stability of the constituents of *Calendula*, *Milk-thistle* and *Passiflora* tinctures by LC-DAD and CLAE-EM. *J. Pharmaceut. Biomed.*, v. 30, p. 613–624, 2002.
- BOTT, R. F.; LABUZA, T. P. OLIVEIRA, W. P. Stability Testing of Spray- and Spouted Bed–Dried Extracts of *Passiflora alata*. *Dry. Technol.*, v. 28, p. 1255–1265, 2010.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003. “GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº. 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da “LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO”. Diário Oficial da União, Brasília, 12 de dezembro de 2008.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de abril de 2010.

BRASIL Ministério da Saúde. Portal da Saúde c. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=19108 (consultado em 08/02/2013).

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA (BHP). British Herbal Medicine Association, Bournemouth, U.K., p. 212, 1996.

BUCKALLEW. R. R. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. (USDA-NRCS PLANTS Database). Disponível em: http://plants.usda.gov/java/usageGuidelines?imageID=pain6_014_ahp.jpg (Acessado em 06/04/2013). Foto do fruto da espécie *P. incarnata*

CAPASSO, A.; SORRENTINO, L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava-kava* and *Passiflora* extracts combination. *Phytomedicine*, v. 12, p. 39–45, 2005.

CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus Celastraceae* e de *Passiflora* (*Passifloraceae*) e comparação com método CLAE-UV. *Rev. Bras. Farmacog.*, v. 19, n. 4, p. 860–864, 2009.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line Identification of Minor Flavones from Sugarcane Juice by LC/UV/MS and Post-Column Derivatization. *J. Bras. Soc. Quím.*, v. 20, n. 9, p. 1574-1579, 2009.

CONGORA, C.; PROLIAC, A.; RAYNAUD, J. Isolement et identification de deuxglucosyl-lutéolines mono-*C*-substituées et de la diglucosyl-6,8-lutéoline di-*C*-substituédanslestigesfeuillées de *Passiflora incarnata* Helvetica Chimica Acta, v. 69, n. 5, p. 251–253, 1986.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1996.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 698–702, 2001^a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *J. Ethnopharmacol.*, v. 78, p. 165–170, 2001^b.

DHAWAN, k.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Correct Identification of *Passiflora incarnata* Linn., a Promising Herbal Anxiolytic and Sedative. *J. of Medicinal Food.*, v. 4, n. 3, p. 137–144, 2001^c.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Comparative Anxiolytic Activity Profile of Various Preparations of *Passiflora incarnata* Linneaus: A Comment on Medicinal Plants' Standardization. *J. Altern. Complement.*, v. 8, n. 3, p. 283–291, 2002.

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. *Phytother.*, v.73, p. 397–399, 2002.

DHAWAN, K.; KUMAR, K.; SHARMA, A. Antiasthmatic Activity of the Methanol Extract of Leaves of *Passiflora incarnata*. *Phytother. Res.*, v. 17, p. 821–822, 2003.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, v.94, p. 1-23. 2004.

DIMPFEL, W.; KOCH, K.; WEISS, G. Single dose effects of Pascoflair® on current source density (CSD) of human EEG. *Neuroscience & Medicine.*, v. 3, p. 130–140, 2012.

ELSAS, S. M.; ROSSI, D.J.; RABER, J.G.; WHITE, S.C.A.; GREGORY, W.L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* (*Passionflower*) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. *Phytomedicine*, v. 17, n.12, p. 940–949, 2010.

ESCOPE MONOGRAPHS. *Passiflorae herba*. Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs. Exeter, U.K.: European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 1997.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Strasburg, Council of Europe, 2000. Supplement 3th, edition 2001.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY (EMA). Evaluation of Medicines for Human Use. Assesment Report on *Passiflora incarnata*, Herba. London, UK. 2008.

- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 3^a. ed. Organização Andrei Editora S.A. São Paulo. 1977.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5^a. ed. Atheneu Editora. São Paulo. 2010.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, v. 1161, p. 214–223, 2007.
- FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LECOUTEUR, D.G. Toxicity of *Passiflora incarnata* J. *Toxicol. Clin. Toxicol.*, v. 38, p. 63–66, 2000.
- FREITAS, P. C. D. Estudo Farmacognóstico Comparativo de Espécies Brasileiras do gênero *Passiflora L.* 1985. 133 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 1985.
- YUJIE, F.; YUANGANG, Z.; WEI, L.; LIN, Z.; MEIHONG, T.; EFFERTH, T.; YU, K.; CHUNLIAN, H.; LIYAN, C. Determination of vitexin and isovitexin in pigeonpea using ultrasonic extraction followed by CLAE-EM. *J. Sep. Sci.*, v. 31, p. 268 – 275, 2008.
- GALLORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Ac,ai palm). *Chromatographia*, v. 59, n. 11/12, p. 739-743, 2004.
- GIRON, J. B. R.; WATERKEMPER, R. Sedação, eutanásia e o processo de morrer do paciente com câncer em cuidados paliativos: compreendendo conceitos e inter-relações. *Cogitare Enferm.*, v. 11, n. 3, p. 258-263, 2006.
- GLAJCH, J. L.; GLUCKMAN, J. C.; CHARIKOFFSKY, J. G.; MINOR, J. M.; KIRKLAND, J. J. Simultaneous selectivity optimization of mobile and stationary phases in reversed-phase liquid chromatography for isocratic separations of phenylthiohydanto in amino acids derivatives. *J. Chromatogr.*, v. 318, p. 23–39, 1984.
- GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora L.* (*Passifloraceae*). *R. bras. Bioci.*, v. 9, s.1, p. 88-99, 2011.
- GRUNDMANN, O., WANG, J., MCGREGOR, G.P., BUTTERWECK, V. 2008. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Med.*, v. 74, n. 15, p. 1769–1773, 2008.
- HARBONE, J. B. *Advances in flavonoid research since 1992*. University of Reading, UK. Chapman & Hall, 1993. 676 p.

HARRIS, R. Cromatografia líquida de alta eficiência. Análise química quantitativa, 7ª. Edição. Livros técnicos e científicos editora LTDA. Rio de Janeiro, Brasil, 2008. p. 613 — 646.

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

ICH — International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). 2005.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTO, R. Gradient separations. HPLC for pharmaceutical scientists, 1st edition; Willey, J.; Publisher: New Jersey., p. 381 — 382, 2007.

KRENN, L. *Passion Flower (Passiflora incarnata)* a reliable herbal sedative. *Wien Med Wochenschr.*, v. 152, n. 6, p. 404–406, 2002.

KURTZ, S. M. T. F.; SANTOS, C. A. M.; DUARTE, M. R.; SATO, M. E. O. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actínia* Hooker, *Passifloraceae*. *Acta Farm. Bonaerense*, v. 22, n. 2, p. 105-112, 2003.

LOTTSPEICH, F. Microscale Isocratic Separation of Phenylthiohydantoin Amino Acid Derivatives. *J. Chromatogr.* v. 326, p. 321 — 327, 1985.

LOCKS, F. *Passiflora incarnata* (Maracujá): Aspectos históricos, taxonômicos, cultivo e utilização na medicina popular e científica. 2006, 57 f. Monografia do Curso de Especialização em Gestão de Recursos Naturais, Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma-SC. 2005.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. New York. Springer–Verlag, 1970. 354 p.

MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; STOIA, A.; HAMILL, F. A.; ABRICANT, D.; DIETZ, B. M.; CHADWICK, L. R. *In Vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Botanical Extracts used Traditionally for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Phytother. Res.*, v.19, p.988–991, 2005.

MAYER, N. Chemische Untersuchungen eines Passionsblumenkrautextraktes, 2009, 63 f. Dissertação de Mestrado em Farmácia, Universidade de Viena, Áustria. 2009.

McGUIRE, C. *Passiflora incarnata (Passifloraceae)*: A new fruit crop. *Econ.Bot.*, v. 53, n. 2, pp. 161-176, 1997.

- MANDALL, S.; MANDAL, M.; GHOSH, A. K.; DEY, S. Rapid determination of vitamin B₂ and B₁₂ in human urine by isocratic liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.*, v. 640, p. 110—113, 2009.
- MARKHAN, K. R. *Techniques of flavonoid identification*. London, New York, Academic Press, 1982. 113 p.
- MORAES, M. L. L.; VILLEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. *Phytochemical Analysis*, v. 8, n. 5, p. 257–260, 1997.
- MOVAFEGH, A.; ALIZADEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora Incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-Blind, placebo-controlled study. *Anesth. Analg.*, v. 106, p. 1728—1732, 2008.
- MÜLLER, S. D. Determinação de Alcaloides e Flavonóides de através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata*, Curtis, *Passifloraceae* – Maracujá Doce. 2006, 91 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Univ. Vale do Itajaí. 2006.
- MULLER, J. H.; MULLER, K. V. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. (USDA-NRCS PLANTS Database). Disponível em: http://plants.usda.gov/java/usageGuidelines?imageID=pain6_009_avp.tif (Acessado em 06/04/2013). Foto da folha da espécie *P. incarnata*
- NEGRI, G.; SANTI, D.; TOBACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *SisoPrOhruna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 22, n. 5, p. 1024-1034, 2012.
- NÓBREGA I. M. F.; GRANGEIRO JÚNIOR S.; SILVA R. M. F.; ROLIM NETO P. J.; ALBUQUERQUE M. M. Estudo de estabilidade de comprimidos de Captopril 25 mg acondicionados em blister frente a diferentes tipos de filmes moldáveis. *Rev. Bras. Farm.*, v. 84, n. 4, p.128 – 131, 2006.
- NORIEGA, P.; MAFUD, D. F.; TRASSER, M.; KATO, E. T. M.; BACCHI, E. *M.Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. *B. Latinoam. Caribe Pl.*, v. 100, n. 5, p. 398 – 413, 2011.
- OGA, S.; FREITAS, P.C.; SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med.*, v. 50, n. 4, p. 303–306, 1984.
- PARAFITT , K. *Martindale: The complete drug reference*. London. Pharmaceutical Press, 1999. 2315 p.

- PATIL, A. Exploring *Passiflora incarnata* (L.): A medicinal plants secondary metabolites as antibacterial agent. *J. Med. Plants Res.*, v. 4, n. 14, p. 1496-1501, 2010.
- PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com Ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims., *P. incarnata* Rev. Bras. Plantas Med., v.3, n.1, p. 1-12. 2000.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J-N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and Comparison with HPLC Method. *Phytochem. Anal.*, v. 15, p. 241–248, 2004.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. Y.; CULLAGH, M. Distinction of the C-glycosyl flavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPCLAE-EM exact mass measurement and in-source CID. *Phytochem. Anal.*, v.16, p. 295–301, 2005.
- PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 10^a. ed. Paris: Ministère de la Santé. 2007.
- PHARMACOPOEIA HELVETICA. Berne, Eidgenössische, 7th edition, v.1, 1987.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *J. Agric. Food Chem.* v. 46, p. 4487-4490, 1998.
- PIETROGRANDE, M. C.; DONDIA, F.; CIOGLI, A.; GASPARRINI, F.; PICCINC, A.; SERAFINIC, M. Characterization of new types of stationary phases for fast and ultra-fast liquid chromatography by signal processing based on Auto Covariance Function: A case study of application to *Passiflora incarnata* extract separations. *J.Chromatogr. A.* v. 1217, p. 4355 – 4364, 2010.
- PONGPAN, N.; LUANRATANA, O.; SUNTORNSUK, L. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatography for vitexin analysis and fingerprint of *Passiflora foetida*. *Curr. Sci. India.*, v. 93, n. 3, p. 378-382, 2007.
- PROVENSI, G. Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). 2007, 153 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2007.
- PROVENSI, G.; NOËL, F; LOPES, D.V.S.; FENNER, H.; BETTI, A.H.; COSTA, F.; MORAIS, E.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. ParticisoPrOHtion of GABA-benzodiazepine Receptor Complex in the Anxiolytic Effect of *Passiflora alata* Curtis (*Passifloraceae*). *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 27, n. 6, p. 845-851. 2008.
- PUBCHEM – Compound database. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280441&loc=ec_rcs. (Acessado em 26/02/2013).

- QIMIN, L; VAN DEN HEUVEL, H; DELORENZO, O; CORTHOUT, J; PIETERS, L.A.C; VLIETINCK, A.J; CLAEYS, M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). J. Chromatogr. ,v. 562, p. 435-446, 1991.
- RAFFAELLI, A. ; MONETI, G. ; MERCATI, V. ; TOJA, E. Mass spectrometry characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. J. of Chromatogr. A., v. 777, p. 223 – 231, 1997.
- REHWALD, A.; MEIER, B.; STICHER, O. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* Pharm. Acta. Helv. 69, 153—158. 1994.
- REIMBERG, M. C. H. Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonoides do cultivo de folhas de *Passiflora incarnata* 2006, 91 f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Química Analítica, Instituto de Química São Carlos, USP, 2006.
- ROBARDS, K; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids—A Review. The Analyst, v. 122, p. 11R–34R, 1997.
- SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* in the elevated plus maze in mice. Phytother. Res., v. 25, p. 789—795, 2011.
- SHELLINGER, A. P.; CARR, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. J. Chromatogr. A., v.1109, p. 253—266, 2006.
- SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Cromatografia líquida de alta eficiência. Fundamentos de química analítica. 8ª. Edição. São Paulo. Cengage Learning edições, 2006. 1124 p.
- SMITH, G.W.; CHALMERS, T.M.; NUKI, G. Vasculitis associated with herbal reparation containing *Passiflora* extract. Rheumatology, v. 32, p. 87–88, 1993.
- SOULIMANI, R.; YOUNUS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* and its indole alkaloid and flavonoid derivates and maltol in the mouse. J. Ethnopharmacol., v. 57, p. 11—20, 1997.

STOBIECKI M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, v. 54, p. 237–256, 2000.

VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F. Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1054, p. 181–193, 2004.

USP 34. The United States Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia convention, 2011.

YOCKTENG, R.; EECKENBRUGGE, G.C.; SOUZA-CHIES, T.T. *Passiflora*. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits, first ed., Springer Berlin Heidelberg, New York, p. 129–171, 2011.

WALLACE, J. W.; MABRY, T. J. The conversion of the 8-C-glycosylflavone vitexin to the 6-C-isomer, isovitexin in *Lemna minor*. *Phytochemistry*, v. 9, p. 2133 – 2135, 1970.

WHO. World Health Organization – Monographs on selected medicinal plants. Ottawa, v. 3, p. 257-267. 2001.

WOHLMUTH, H. PENMAN, K. G.; PEARSON, T.; LEHMANN, R. P. Pharmacognosy and Chemotypes of *Passiflora incarnata*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 33, n. 6, p. 1015–1018, 2010.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n. 3, p. 456-471, 2010.

ZERAIK, M. L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J-N.; TITS, M.; YARIWAKE, J. H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chem.*, v. 128, p. 259–265, 2011.

ZUCOLOTTO, S. M. Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *P. edulis* FORMA *flavicarpa* DEGENER. 2005, 144 f. Dissertação de Mestrado em Farmácia, UFSC, Florianópolis, 2005.

ZUCOLOTTO, S. M, FAGUNDES, C., REGINATTO, F. H. , RAMOS, F. A., CASTELLANOS, L., DUQUEB, C., SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPCLAE-EM. *Phytochem. Anal.*, n. 23, p. 232–239, 2011.

