**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE ANÁLISE
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FLAVONÓIDES DO “MARACUJÁ”**

(Passiflora alata e Passiflora edulis)

ALESSANDRA CRISTINA SOARES POZZI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências na área de Química
Analítica**

Orientadora: Prof^a Dr^a Janete Harumi Yariwake

**São Carlos
2007**

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus pais Fátima e Sidinei.

Ao Roberval, meu marido, amigo, amante, companheiro de todas as horas, com todo amor do mundo, pelo apoio, incentivo e paciência. Sem ele seria impossível.

Ao Rafael, que acompanhou bem juntinho de mim as últimas etapas deste trabalho. Veio ao mundo para me mostrar o verdadeiro amor e me ensinar a ser paciente. Iluminou minha vida, me proporcionando a maior aventura, a de “ser mãe”

- ❖ A Profª Drª Janete Harumi Yariwake, pela orientação, paciência e confiança.
- ❖ Ao Prof Dr Luis Alberto Avaca, pela utilização da estrutura do laboratório do grupo GMEME.
- ❖ Ao Prof Dr Emanuel Carrilho pelo apoio e amizade.
- ❖ A pessoas extremamente especiais para mim, que de alguma forma me apoiaram: Adriana, Carolina, Claudete, Daiane, Dalcilene, Daniela, Michela, e Valéria.
- ❖ A Cíntia, pela ajuda, carinho, paciência e pelos ensinamentos, de vida e científicos.
- ❖ Aos colegas de laboratório, que me dedicaram parte de seu tempo: Esmeraldo, Cristina D., Fernanda, Vânia.
- ❖ A Jane, amiga indescritível e inesquecível.
- ❖ As colegas de grupo, Fabiana e Malu, pela amizade e pela ajuda na aquisição e transporte de alguns materiais.
- ❖ A Andrea e Mariha, do GMEME, pela ajuda com os equipamentos.
- ❖ Aos funcionários Benê e Joãozinho pela disponibilidade em ajudar.

- ❖ A Dr^a Ana Maria Soares Pereira da UNAERP (Ribeirão Preto – SP), pelas amostras cedidas de *Passiflora*.
- ❖ A Eliana Cordeiro, bibliotecária, pela ajuda.
- ❖ A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Plantas Medicinais	1
I.2. <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i>	4
I.3. Flavonóides	8
I.4. Técnicas para análise quantitativa de flavonóides	13
I.4.1. Espectroscopia de absorção no UV-visível	13
I.4.1.1. Lei de Lambert-Beer e análise quantitativa	18
I.4.2. Validação do método analítico	20
II. OBJETIVOS	23
III. PARTE EXPERIMENTAL	24
III. 1. Equipamentos, materiais, solventes e reagentes	24
III. 1.1. Equipamentos	24
III. 1.2. Materiais, solventes e reagentes	24
III.1.3. Material vegetal	25
III. 2. Adaptação do método da Farmacopéia Francesa para quantificação de flavonóides totais	25

III. 3. Adaptação do método da Farmacopéia Helvética para quantificação de flavonóides totais	28
III. 4. Adaptação do método da Farmacopéia Européia para quantificação de flavonóides totais	31
III.5. Validação dos métodos	34
IV . RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
IV. 1. Modificações realizadas nos métodos das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia.....	36
IV. 2. Análise quantitativa dos flavonóides totais por espectrofotometria no UV-visível	39
IV. 2. 1. Avaliação dos métodos (Farmacopéia Francesa, Helvética e Européia)	39
IV. 2. 2. Resultados obtidos por espectrofotometria (UV-visível) e comparação com o método cromatográfico (HPLC)	54
V. CONCLUSÕES	60
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química geral de um flavonóide	8
Figura 2 – Estrutura química dos quatro principais flavonóides encontrados em <i>Passiflora</i>	9
Figura 3 – Algumas classes de flavonóides	11
Figura 4 – Sub-estruturas envolvidas na formação de complexos com metais	14
Figura 5 – Esquema representativo da complexação de flavonóides com o íon Al^{3+}	15
Figura 6 – (I) Complexo 5-hidroxiavona com Al^{3+} e (II) Complexação do grupo 3-hidroxi com Al^{3+}	16
Figura 7 – Metodologia adaptada da Farmacopéia Francesa e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	27
Figura 8 – Metodologia adaptada da Farmacopéia Helvética e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	30
Figura 9 – Metodologia adaptada da Farmacopéia Européia e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies <i>P. alata</i> e <i>P. edulis</i>	33
Figura 10 – Estrutura química da rutina	36

Figura 11 – Espectros da rutina obtidos na faixa de 200 a 600 nm, complexada com Al_2Cl_3 obtidos pelas metodologias: (a) Farmacopéia Francesa e (b) Farmacopéia Helvética e complexada com $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (c) Farmacopéia Européia	38
Figura 12 - Curva analítica expressa em mg/L obtida para a rutina pelo método descrito na Farmacopéia Francesa.....	43
Figura 13 – Curva analítica expressa em mg/L obtida para a rutina pelo método descrito na Farmacopéia Helvética	44
Figura 14 – Curva analítica expressa em mg/L obtida para rutina pelo método descrito na Farmacopéia Européia	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Francesa)	43
Tabela 2 - Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Helvética)	44
Tabela 3 – Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Européia)	45
Tabela 4 – Resultados dos ensaios de recuperação, calculado para as espécies de maracujá fortificadas com rutina	46
Tabela 5 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Francesa).....	48
Tabela 6 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Helvética)	49
Tabela 7 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Européia)	50
Tabela 8 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Francesa)	51
Tabela 9 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Helvética)	52

Tabela 10 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i> (Farmacopéia Européia)	53
Tabela 11 – Limites de detecção (LD) para os métodos das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia	55
Tabela 12 – Limites de quantificação (LQ) para as metodologias das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia	56
Tabela 13 - Curva analítica e dados de linearidade e sensibilidade encontrados para o padrão analítico rotina nas metodologias estudadas	57
Tabela 14 – Teor de flavonóides totais expressos em rotina (mg de flavonóide/g de planta seca), obtido por espectrofotometria (UV-visível) e por cromatografia (HPLC-UV/DAD)	58
Tabela 15 – Comparação entre os resultados obtidos pela metodologia da Farmacopéia Francesa utilizando diferentes granulometrias	60
Tabela 16 – Comparação entre o método espectrofotométrico e cromatográfico (granulometria : 0,5 > 1,0 mm)	61
Tabela 17 – Comparação das metodologias de análise espectrofotométrica utilizadas neste trabalho	62

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AlCl_3 – cloreto de alumínio

CE – eletroforese capilar

CV (%) – coeficiente de variação percentual

EtOH – etanol

HAc – ácido acético

H_3BO_3 – ácido bórico

HCOOH – ácido fórmico

$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ – ácido oxálico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-UV/DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPTLC – cromatografia de camada delgada de alta eficiência

ICH – International Conference on Harmonization

LC/MS – cromatografia líquida/espectrometria de massas

MeOH – metanol

NaOAc – acetato de sódio

NaOMe – metóxido de sódio

NBS – N-bromo-succinimida

P. A. – grau analítico

TFT – teor de flavonóides totais

TLC – cromatografia em camada delgada

UV-vis – ultravioleta-visível

λ - comprimento de onda

A x t – absorbância x tempo

ε - absortividade molar

$\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda máximo

RESUMO

“Maracujá” é o nome popular de várias espécies, dentre as quais *Passiflora edulis* e *Passiflora alata* (Passifloraceae). Esta última é uma planta medicinal amplamente utilizada no Brasil devido às suas propriedades ansiolíticas e sedativas, sendo também a espécie oficial da Farmacopéia Brasileira. Porém, freqüentemente ocorre a sua substituição indevida por *Passiflora edulis*, espécie usada para o preparo de sucos. Há também a confusão com a *Passiflora incarnata*, espécie usada na Europa, mas que não se adapta bem ao clima brasileiro.

Neste trabalho foi desenvolvido um método espectrofotométrico por UV-visível para a quantificação dos flavonóides totais contidos nas folhas de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis*, a partir da adaptação das metodologias descritas nas Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia para a espécie *Passiflora incarnata*.

O procedimento proposto envolveu a complexação dos flavonóides com cloreto de alumínio e foi utilizada a rotina como padrão. Confrontou-se os dados obtidos pelo método espectrofotométrico desenvolvido neste trabalho com os obtidos por HPLC. Os melhores resultados foram obtidos com a metodologia adaptada da Farmacopéia Francesa.

ABSTRACT

"Maracujá" is the popular name of some species, among which are *Passiflora edulis* and *Passiflora alata* (Passifloraceae). The latter is a widely used medicinal plant in Brazil due to its ansiolytic and sedative properties, and also the official species of the Brazilian Pharmacopoeia. However, it is quite often improperly substituted for *Passiflora edulis*, which is used for the preparing juices. Another inadequate substitution occurs with *Passiflora incarnata*, which is used in Europe, but does not adjust to the Brazilian climate.

From adapting the methodologies described in the French, Helvetian and European Pharmacopoeia for the *Passiflora incarnata* species, a spectrophotometric method by UV-Visible has been developed to enable quantification of all flavonoids comprised in the leaves of both *Passiflora edulis* and *Passiflora alata*.

The suggested procedure involved the complexation of the flavonoids with aluminum chloride, being rutin used as standard. Data obtained by the spectrophotometric method developed in the present work were compared with those obtained by HPLC. The French Pharmacopoeia methodology provided the most significant data in the study.

I – INTRODUÇÃO

I.1. Plantas Medicinais

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana [Maciel *et al*, 2002].

O ópio, extraído da papoula e empregado como narcótico, era conhecido quatro mil anos antes da descoberta da morfina, também retirada da mesma planta. Os egípcios empregavam zimbros, semente de linho, milho, alho, lírio e rícino (mamona) no tratamento de diversas moléstias; o alho, por exemplo, era usado no caso de dores de cabeça e problemas circulatórios. Cerca de 30 tipos diferentes de plantas eram usadas no ritual de mumificação [Blackwell, 1990].

No Brasil, a utilização de plantas medicinais tem origem na cultura dos diversos grupos indígenas que habitavam o país. Alguns exemplos são o jaborandi (*Pilocarpus* spp.) e o guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.) [Cruz, 1965]. Além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes representam papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque. A medicina popular brasileira talvez possa ser considerada a mais privilegiada, na medida em que a flora brasileira oferece em abundância recursos medicinais em quantidade e qualidade que não se encontrou ainda em nenhuma outra região [Carauta *et al.*, 1976].

No início do século XX, os medicamentos sintéticos tiveram grande desenvolvimento e grande impacto na sociedade. Entre 1920 e 1940 foram descobertos os antibióticos, os hormônios e as vitaminas. Neste período a medicina popular ficou menosprezada, sendo reconhecida novamente nos últimos anos, devido à contribuição de alguns fatores que aumentaram a utilização de tal recurso mesmo em camadas sociais que até então não o empregavam: a crise econômica, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, bem como uma tendência generalizada dos consumidores a utilizar, preferencialmente, produtos de origem natural [Simões *et al.*, 1995].

Milhares de receitas atravessaram os séculos, chegando aos dias atuais após uma seleção resultante de uma constante experimentação que, antes de produzir bons resultados, ocasionou muitos acidentes devido ao fato de que várias plantas possuem princípios tóxicos e que, se aplicadas incorretamente, podem produzir, senão a morte, pelo menos sérios danos à saúde [Carauta *et al.*, 1976].

Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais [Maciel *et al.*, 2002].

É cada vez mais freqüente o uso de plantas medicinais das medicinas tradicionais hindu e chinesa, completamente desconhecidas dos povos ocidentais. Estas plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos.

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de produtos naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população [Veiga Jr., 2005].

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos [Maciel *et al*, 2002].

Porém, o uso indiscriminado das plantas medicinais pode levar à extinção das espécies, provocando o encarecimento destes produtos, e o uso pouco cuidadoso das mesmas, fora de seu contexto original e sem estudos acadêmicos, têm dado origem a problemas como, por exemplo, intoxicações atribuídas aos efeitos já conhecidos das plantas ou ainda ao uso da planta errada, por confusão na identificação das espécies [Simões *et al.*, 1995].

As plantas foram então cogitadas por profissionais da área da saúde e por órgãos governamentais como recurso terapêutico passível de utilização no atendimento de algumas necessidades dos serviços de saúde. Porém esta utilização só é aceitável em formas padronizadas, com substâncias ativas dosadas e submetidas a um controle de qualidade rigoroso, o qual de modo geral, ainda não existe nas indústrias fitoterápicas no Brasil.

Para a utilização segura de qualquer planta medicinal como medicamento, é necessário que ela seja padronizada, isto é, deve-se estabelecer a autenticidade da

droga vegetal e o seu teor de princípios ativos, dentro dos parâmetros utilizados como critérios de qualidade. Além disso, a validação das metodologias analíticas aplicadas ao controle de qualidade de fitoterápicos passou a ser exigência legal para fins de registro, a partir da publicação da Portaria nº 006 – SVS/MS de 31/01/1995, do Ministério da Saúde [Brasil, 1995], posteriormente revisada pela resolução RDC nº 48, de 16/03/2004 [Brasil, 2004].

1.2. *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*

A família *Passifloraceae* foi criada por Jussieu em 1805. Dela consistem aproximadamente 650 espécies e 16 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e semitropicais do globo, principalmente na América e África tropical. O gênero predominante na família é *Passiflora* L., com aproximadamente 400 espécies distribuídas especialmente na região centro-norte do Brasil.

O nome *Passiflora* provém do latim *passio*, *passiones*: paixão e *flos*, *floris*: flores. Já o termo maracujá é de origem tupi guarani (muruku'ia: comida feita em cuia, numa alusão aos frutos edulos do vegetal). As flores de maracujá são tidas como as mais belas da flora mundial. A literatura cita o uso do maracujá contra febres intermitentes, inflamações cutâneas, erisipela e como medicação antigotosa; suas raízes são consideradas anti-helmínticas e antiinflamatórias, e os frutos são utilizados como alimento.

As folhas de maracujá (gênero *Passiflora*) juntaram-se à medicina clássica em 1867, empregadas por sua ação calmante em casos de insônia e irritabilidade [Freitas, 1985].

Partes aéreas de espécies de *Passiflora*, especialmente *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora incarnata* Linneaus têm sido tradicionalmente utilizadas na Europa e América para tratar ansiedade e nervosismo [Ross, 1986], [DeMarderosian, 2002].

No Brasil, existe um grande número de plantas nativas do gênero *Passiflora*, conhecidas com maracujá, mas apenas duas delas possuem interesse comercial: *Passiflora edulis*, utilizada pelo suco e *Passiflora alata*, conhecida como “maracujá doce”. *Passiflora alata* Dryander é também uma planta ornamental. Seus frutos são encontrados em comércios locais e o extrato de suas folhas é incluído em diversos fitoterápicos [Doyama *et al*, 2005].

Embora diversos experimentos *in vivo* tenham sido realizados a fim de precisar a atividade farmacológica de *Passiflora*, ainda não é possível atribuir todos os efeitos a uma única classe de compostos ou espécie e sim à provável ação conjunta de diversos alcalóides e flavonóides. Por outro lado, a ação ansiolítica foi demonstrada por alguns flavonóides isolados sem causar sedação ou relaxamento muscular, como a crisina isolada de *P. caerulea*, o que também foi verificado utilizando-se extratos de *P. incarnata*. Uma benzoflavona isolada de *P. incarnata* também preveniu a síndrome de abstinência induzida por naloxone (antagonista opióide).

Algumas atividades farmacológicas também são atribuídas aos flavonóides vitexina e isovitexina, como: hipotensiva, antiinflamatória, antiespasmódica, antimicrobiana e antioxidante [Müller *et al*, 2005].

P. incarnata é muito consumida na forma de infusão ou extrato, geralmente associada a outras plantas como melissa e valeriana [Marchart *et al*, 2003]. Além do efeito sedativo e ansiolítico, testes clínicos com *P. incarnata* mostraram boa resposta

no tratamento preventivo dos sintomas da síndrome de abstinência de opiáceos [Akhondzadeh, *et al*, 2001]. O extrato metanólico das folhas de *P. incarnata* testado em ratos mostrou propriedades afrodisíacas [Dhawan *et al.*, 2001] além de efeito significativo como antitussígeno comparável à codeína [Dhawan & Sharma, 2002]. O mesmo extrato metanólico testado em porcos mostrou efeito preventivo de crises de asma [Dhawan *et al.*, 2003].

P. alata Dryander (folhas) consta nas três primeiras edições da Farmacopéia Brasileira sem, no entanto, preconizar um método analítico quantitativo, que permita uma correta avaliação da qualidade da droga. Apesar do caráter oficial da mesma, existem poucos estudos sobre seus constituintes químicos e sua ação farmacológica, dificultando sua padronização [Müller *et al*, 2005]. O extrato desta espécie demonstrou ação potenciadora sobre o sono induzido pelo pentobarbital em ratos; reduziu significativamente a atividade motora espontânea e não demonstrou efeito analgésico [Oga *et al.*, 1984; Freitas, 1985]. O extrato seco de *P. alata* causou depressão do SNC em ratos [Oga *et al.*, 1984] da mesma forma que *P. incarnata*, conforme dados de Lutomski & Wrocinski (1960) e Aoyagi *et al.* (1974). A DL₅₀ pela via intraperitoneal para os extratos secos de *P. alata* foi de 456/kg [Oga *et al.*, 1984].

Lutomski *et al.* (1975), estudando sucos obtidos de *P. edulis* Sims, forma *flavicarpa* e de *P. edulis* Sims, concluíram que após administração oral a camundongos, houve diminuição significativa da movimentação espontânea dos animais, bem como diminuição da irritabilidade e aumento no tempo de busca a alimentos. Este efeito sedativo do suco de *P. edulis* foi atribuído à presença de pequenas quantidades de alcalóides do grupo harmana e flavonóides.

Vale & Leite (1983) constataram que o extrato aquoso de folhas de *P. edulis* apresenta baixa toxicidade, evidenciada pela elevada DL₅₀ por via intraperitoneal

(1000 mg/kg). O extrato de *P. edulis* apresentou atividade depressora geral do SNC, uma vez que ocasionou diminuição da movimentação espontânea de camundongos, potenciou a ação hipnótica do pentobarbital e induziu modificações tais como: prolongamento do tempo de sono barbitúrico, redução da temperatura corporal, potenciação da ação de outros depressores como a morfina, bloqueio parcial do efeito estimulante da anfetamina, catatonía e ptose palpebral. A infusão de folhas (chá) também foi eficiente na potencialização da ação hipnótica do pentobarbital, sendo esta atividade idêntica à do extrato aquoso de folhas. Este fato é de grande relevância, uma vez que esta forma de preparo seria semelhante à empregada com fins terapêuticos. Porém, os autores destacaram não estar completamente elucidado o mecanismo da ação psicofarmacológica do extrato aquoso de *P. edulis*.

A toxicidade do extrato de *P. edulis* foi estudada por Maluf *et al.* (1991) em ratos, camundongos e voluntários saudáveis. Verificou-se que algumas amostras das folhas de *P. edulis* possuem efeito depressor não específico sobre o SNC. Voluntários tratados com chá liofilizado de *P. edulis* a 10% (peso/volume) não apresentaram mudanças significativas na indução do sono. Alguns apresentaram valores aumentados na amilase sérica no dia após a ingestão do chá liofilizado de *P. edulis*, o que indica toxicidade no tecido pancreático. Outros apresentaram modificações diretas nos níveis de bilirrubina, o que indica disfunção hepatobiliar, além de um aumento do nível de ácido úrico.

P. incarnata e *P. edulis*, possuem características morfológicas e microscópicas similares. Em estudos comparativos entre *P. incarnata* e *P. edulis* utilizando extrato metanólico em ratos, *P. incarnata* mostrou-se estatisticamente equivalente ao diazepam, enquanto que *P. edulis* não exibiu qualquer efeito. Concluiu-se que *P. incarnata* é a espécie de interesse medicinal, confirmando a

necessidade de discriminá-la claramente da *P. edulis*, também para finalidades comerciais [Dhawan *et al.*, 2001a]. Desta forma, torna-se claro a necessidade de estudos pré-clínicos e clínicos rigorosos em *P. edulis*, para assegurar a sua eficácia e segurança para uso humano.

I.3. Flavonóides

Os flavonóides são particularmente importantes para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, sendo usados como “marcadores”, sendo possível através deles, identificar muitas espécies de *Passiflora* [Quércia *et al.*, 1978], [Gonzáles Ortega, 1995] [Petry *et al.*, 1998].

Figura 1 – Estrutura química geral de um flavonóide.

As principais substâncias bioativas no gênero *Passiflora* são os flavonóides C-glicosídeos derivados de apigenina e luteolina (vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, entre outros) (Figura 2), considerados atualmente a melhor opção de marcadores de qualidade [Muller, 2005].

Figura 2 – Estrutura química dos quatro principais flavonóides encontrados em *Passiflora* [Pereira & Vilegas, 2000].

Flavonóides mais conhecidos, como: orientina, vitexina, isovitexina, isoorientina e rutina, foram encontrados em trabalhos com *P. alata* [Freitas, 1985]. [Oga *et al.*, 1984], [Moraes *et al.*, 1997]. Em *P. edulis*, a presença dos flavonóides vitexina, orientina isovitexina e rutina foi confirmada por Freitas (1985) e Moraes *et al.* (1997), mas novos flavonóides foram encontrados por Mareck *et al.* (1991): luteolina 6-*C*-chinovosídeo e luteolina 6-*C*-fucosídeo, estes últimos ainda não detectados em outras espécies de *Passiflora*.

Os flavonóides são uma classe muito extensa de produtos naturais distribuída no reino vegetal. São substâncias fenólicas presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células. Ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos).

Possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligados a sua estrutura [Markhan, 1982], [Robards & Antolovich, 1997]. Muitos são coloridos (amarelos), atuando na atração de insetos para a polinização das plantas. De acordo com a estrutura, apresentam ações farmacológicas diversas, tais como a diminuição da permeabilidade e fragilidade dos vasos sanguíneos, ação antiinflamatória, antiespasmódica, antiviral, antibacteriana, entre outras. Aproximadamente 2% do carbono fotossintetizado pelas células são convertidos em flavonóides ou substâncias correlatas [Markhan, 1982].

São derivados das flavonas e ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico arranjados na configuração $C_6-C_3-C_6$, isto é, são dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que podem ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes.

Na biossíntese das várias classes de flavonóides, eles podem sofrer várias modificações: adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonóides, dimerização (produzindo biflavonóides), glicosilação de grupos hidroxila (produzindo *O*-glicosídeos) ou do núcleo dos flavonóides (produzindo *C*-glicosídeos) [Markhan, 1982].

Os flavonóides são classificados em 10 classes de compostos, de acordo com seu processo de formação: antocianinas, leucoantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavanonas e isoflavonas (Figura 3).

Figura 3 – Algumas classes de flavonóides [Robards & Antolovich, 1997, Geissman, 1962].

Os flavonóides são ácidos fracos e, como são compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água. Podem sofrer degradação em meio alcalino na presença de oxigênio. Apresentam intensa absorção no UV, aproximadamente em 350 nm devido à presença de ligações duplas conjugadas com os anéis aromáticos [Markhan, 1982]. Têm grande importância econômica e fisiológica. São utilizados como corantes naturais (como as antocianinas), reguladores de crescimento, contra queda de cabelo, como inseticida natural (ex.: rotenona, que é uma isoflavona), etc.

Dentre os interesses farmacêuticos, os flavonóides têm lugar de destaque devido às propriedades antitumorais e antivirais, sendo atualmente estudados no combate à AIDS. Em estudos sobre plantas medicinais utilizadas no combate a infecções, alguns flavonóides mostraram-se responsáveis pela inibição da oxidação de neutrófilos humanos [Hsieh *et al.*, 2004]

A formação de radicais livres é considerada uma etapa chave no desenvolvimento de câncer e doenças coronárias pelo ataque às biomoléculas (lipídeos, proteínas, DNA) ou às biomembranas. Os flavonóides atuam como potentes antioxidantes, prevenindo a formação de radicais livres. Estudos indicam o chá, o vinho tinto, a cebola e a maçã como fontes ricas em flavonóides [Robards & Antolovich, 1997].

A rutina é um composto biologicamente ativo, também conhecido como vitamina P, a qual, sozinha ou incluída em várias formulações (Tascovenol, Pentavenol, Rexiloven, Venoruton, etc), é usada para diminuir a fragilidade capilar e como agente antitrombótico, como inibidor da agregação de plaquetas.

Alguns flavonóides (catequina, epicatequina) determinam as propriedades organolépticas do chá verde, muito consumido na China e no Japão. Estes

flavonóides são oxidados enzimaticamente durante a fermentação das folhas verdes na produção do chá preto consumido naqueles países [Pierce *et al.*, 1969], [Collier & Mallows, 1971].

I.4. Técnicas para análise quantitativa de flavonóides

O presente trabalho faz parte de um estudo (trabalhos em andamento e outros já realizados) de espécies de *Passiflora* envolvendo diferentes técnicas analíticas tais como HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), HPTLC (cromatografia de camada delgada de alta eficiência) e LC/MS (cromatografia líquida com espectrometria de massas) [Moraes *et al.*, 1997], [Pereira *et al.*, 2004], [Pereira *et al.*, 2005].

A espectroscopia UV-visível é uma técnica simples, rápida e de baixo custo se comparada a outras técnicas como as citadas acima; bons resultados já foram obtidos em trabalho anterior do grupo utilizando a técnica com espécies de *Maytenus* (espinheira-santa) [Chabariberi, 2003]. Esses fatos foram relevantes para motivar a realização do presente trabalho.

I.4.1. Espectroscopia de absorção no UV-visível

Várias técnicas podem ser empregadas na detecção e quantificação de flavonóides como: HPLC, HPTLC, LC-MS, CE, TLC (cromatografia em camada delgada). A espectroscopia de absorção no UV-Visível, entretanto, é o método mais simples para a análise destes compostos. Os flavonóides absorvem no UV-visível

($\lambda_{\text{máx}}$ em 350nm, aproximadamente) devido à presença das ligações duplas dos anéis aromáticos [Markhan, 1982].

As diferentes classes de compostos de flavonóides são distinguidas pelo número e posição dos grupos funcionais, principalmente hidroxilas. Na elucidação estrutural por UV-Vis dos flavonóides, os grupos oxigenados podem ser detectados pela observação de deslocamentos batocrômicos no espectro UV-vis, obtido pela adição de reagentes como AlCl_3 , H_3BO_3 , AcONa e NaOMe [Cornard & Merlin, 2001].

Alguns flavonóides são usados como reagentes colorimétricos para a detecção e dosagem de traços de metais em solução. A maioria dos flavonóides de origem natural são polifenóis que contém um ou mais dos seguintes aspectos estruturais representados na figura 4, que o conhecimento atual indica estarem envolvidos na formação de complexos com metais [Cornard & Merlin, 2001].

Figura 4 – Sub-estruturas envolvidas na formação de complexos com metais [Cornard & Merlin, 2001].

Os o-dihidroxifenóis ou catecóis (I) são representados pelas catequinas, certas antocianinas, leucoantocianinas e flavanonas; os 3-hidroxifenóis (II) pelos flavonóis; os 5-hidroxifenóis (III) por muitas flavonas, isoflavonas e flavanonas; e os n-derivados da o-hidrocarbonila (IV) pelas chalconas, dihidrochalconas e auronas. Alguns desses grupamentos podem ocorrer juntos em uma única substância. Por exemplo, a quercetina combina I, II e III; a luteolina, I e II; etc [Jurd & Geissman, 1956].

A complexação dos flavonóides com metais, principalmente com o íon Al^{3+} , é uma técnica comumente empregada no estudo de flavonóides, pela análise da absorção no UV-Vis dos flavonóides, os deslocamentos são devidos à formação do complexo Al^{3+} -flavonóide [Markham, 1982], [Robards & Antolovich, 1997], [Deng & Van Berkel, 1998].

O esquema representado na figura 5 apresenta os três possíveis sítios quelantes: grupos 3-OH, 5-OH e 3', 4'-o-diOH. O cloreto de alumínio (AlCl_3) em solução neutra, forma complexos com estes grupos. Quando adiciona-se ácido clorídrico (AlCl_3/HCl), o Al^{3+} forma complexo somente com os grupos 3-OH e 5-OH [Markham, 1982] , [Hostettmann *et al.*, 1984].

Figura 5 – Esquema representativo da complexação de flavonóides com o íon Al^{3+} [Mabry *et al.*, 1970].

A espectroscopia de absorção UV-Visível de flavonóides na presença de Al^{3+} tem sido usada para distinguir os flavonóides que contém grupo hidroxila livre nas posições 5- ou 3- (Figura 6). Os flavonóides que não contém estes grupos não formam complexos com Al^{3+} , e, por esta razão, seus espectros não são alterados [Deng & Van Berkel, 1998].

O complexo formado entre o Al^{3+} e a 5-hidroxiavona é de coloração amarela e apresenta estrutura estável (figura 6). Os flavonóis formam complexos com Al^{3+} que são estáveis mesmo diluídos em HCl. A complexação do grupo 3-OH com o metal resulta na estrutura, a qual é muito estável em parte por seu caráter aromático.

O ácido bórico (H_3BO_3) também forma complexo com os flavonóides, mas somente com o grupo 3', 4'-o-difenil, também chamado orto-dihidroxi ou catecol [Hostettmann *et al*, 1984].

Para os flavonóides, todas estas reações fornecem informações úteis como o tipo de flavonóide e a localização de grupos hidroxila livres [Hostettmann *et al*, 1984].

Figura 6 – (I) Complexo 5-hidroxiavona com Al^{3+} e (II) Complexação do grupo 3-hidroxi com Al^{3+} [Katyal, 1968].

Os flavonóides mais usados como reagentes analíticos são os flavonóis como morina, quercetina, miricetina, etc. Eles são mais sensíveis do que as 5-hidroxiavonas, que também são usadas como reagentes. Qualquer um destes compostos pode ser extraído de plantas específicas ou sintetizado [Katyal, 1968].

A capacidade dos flavonóides em formar complexos metálicos é extensamente utilizada para elucidar sua estrutura, podendo também contribuir para a bioatividade destes compostos, agindo como portadores e reguladores de concentração de metais. Alguns flavonóides possuem um forte efeito antioxidante por sua atividade anti-radicaís e quelação de íons metálicos [Castro & Blanco, 2004].

Essa capacidade também tem sido explorada para a detecção de traços de diversos metais. A morina (3, 5, 7, 2', 4'- pentahidroxiavona), por exemplo, tem sido utilizada na quantificação de alumínio em água, fluídos biológicos e ligas metálicas, por absorção no UV-Visível. O método é baseado na complexação seletiva do reagente não absorvente, morina, em meio levemente ácido (0,0001-0,0015 M H_2SO_4) com Al^{3+} para produzir um quelato de coloração amarela intensa, seguido da medição direta da absorbância em solução etanólica 50% [Ahmed & Hossan, 1995].

Outro procedimento pode ser utilizado para a quantificação de flavonóides, o qual é baseado na reação de oxidação da quercetina em solução aquosa neutra com N-bromo-succimida (NBS) na presença de fenol, formando um composto de coloração violeta; em seguida o composto é analisado por UV-Visível. A aplicação do NBS para a determinação quantitativa da quercetina em presença de outros flavonóides é um método espectrofotométrico simples, rápido e altamente seletivo [Hassan & Gamal, 1992].

1.4.1.1. Lei de Lambert-Beer e análise quantitativa

Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de sua robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivatização química ou o acoplamento a diversas técnicas ou processos, como a cromatografia, eletroforese ou a análise em fluxo. Além disso, é uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações.

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde **A** é a absorbância, **I₀** é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e **I** é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absortividade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo **c** é a concentração da espécie absorvente e **b**, a distância percorrida pelo feixe através da amostra [Rocha & Teixeira, 2004].

É importante observar que a absortividade é uma constante característica da espécie absorvente em um solvente e para um comprimento de onda específico. A absortividade é uma propriedade da substância, enquanto que a absorbância é uma propriedade de uma determinada amostra e variará, portanto, com a concentração e espessura do recipiente [Ewing, 1977].

A lei de Lambert-Beer indica que a absortividade é uma constante independente da concentração, do comprimento do percurso e da intensidade da radiação incidente. Segundo a lei de Lambert-Beer, se a absorbância A for colocada em um gráfico em função da concentração, deverá resultar em uma linha reta [Ewing, 1977]. Assim, a espectroscopia de absorção molecular nas regiões ultravioleta e visível pode ser usada como um instrumento para análise quantitativa. O principal objetivo da análise quantitativa é determinar o quanto uma espécie está presente na amostra analisada. Na prática, a concentração de uma substância na amostra pode ser obtida através da construção de uma curva analítica.

No presente trabalho, a curva de calibração foi feita pelo método do padrão externo, a partir de soluções de concentrações diferentes e conhecidas de um padrão conhecido, obtendo-se as respectivas absorbâncias. Obtidos os dados, foi construído o gráfico que representa a curva analítica.

Às vezes, as medidas de absorbância não apresentam linearidade em toda a faixa de concentrações utilizadas, surgindo os desvios da lei denominados positivos ou negativos. A maioria dos desvios observados no uso da espectroscopia de absorção está relacionada com a natureza do sistema químico envolvido ou às limitações da instrumentação utilizada [Ohweiler, 1981].

1.4.2. Validação do método analítico

A necessidade de avaliar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, é cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um método analítico gere

informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Órgãos como ICH, IUPAC, ISSO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item *validação de métodos analíticos* como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica [Ribani *et al.*, 2004].

A Farmacopéia dos Estados Unidos resume de maneira clara os atributos que o método analítico deve apresentar: exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez [United States Pharmacopoeia, 1990].

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas [Ribani *et al.*, 2004]. A partir dos valores obtidos, o desvio padrão é calculado, e este expresso em termos de porcentagem e

denominado coeficiente de variação (CV), logo quanto maior for o valor deste, melhor será a precisão do método.

A precisão pode ser avaliada pelo grau de reprodutibilidade ou repetibilidade. A reprodutibilidade é avaliada através de resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes laboratórios, em diferentes dias por diferentes analistas em diferentes equipamentos. A repetibilidade é medida em função dos valores encontrados após análise de uma única amostra em um laboratório por um único analista num mesmo equipamento [DUX, 1990].

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método (“robustness”) mede a sensibilidade que este apresenta face à pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros [Ribani *et al.*, 2004].

A linearidade do método é expressa pela obtenção resultados diretamente proporcionais à concentração das substâncias em estudo. Para se determinar a linearidade deve-se construir uma curva analítica, e calcular a regressão linear, que é a forma de estimar qual a melhor reta que passa pelos pontos, obtidos experimentalmente.

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e outros produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ)

representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e a exatidão das determinações também devem ser registradas. Este critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Se houver necessidade de maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O método analítico e seu respectivo uso ditam esse compromisso [Ribani *et al.*, 2004].

II – OBJETIVOS

Neste trabalho foi realizado o estudo analítico dos flavonóides das folhas de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, que teve como objetivos:

- Adaptar o método espectrofotométrico conforme descrito nas Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia para a quantificação dos flavonóides totais de *Passiflora incarnata*, visando desenvolver uma metodologia adequada para as espécies *P. alata* e *P. edulis*.
- Análise quantitativa dos flavonóides das plantas medicinais brasileiras *P. alata* e *P. edulis*, (Passifloraceae), por espectrofotometria no UV-visível, visando o desenvolvimento e a validação do método espectrofotométrico para quantificação de flavonóides totais presentes nestas espécies, uma vez que ainda não há procedimento para a análise quantitativa na monografia da Farmacopéia Brasileira.
- Comparação do método espectrofotométrico com o método de quantificação de flavonóides de *Passiflora* por HPLC [Pereira, 2004].

III – PARTE EXPERIMENTAL

III. 1. Equipamentos, materiais, solventes e reagentes

III. 1.1. Equipamentos

Balança Analítica Mettler modelo AE 200

Espectrofotômetro Hitachi UV-visível duplo-feixe modelo U-2000

Espectrofotômetro Hitachi UV-visível duplo-feixe modelo U-2010

III. 1.2. Materiais, solventes e reagentes

Materiais e vidrarias usuais de laboratório;

Solventes: acetona (grau P. A. - Mallinckrodt), metanol (grau P. A. - Mallinckrodt), etanol (grau P. A. - Mallinckrodt e Merck), acetato de etila (grau P. A. - Mallinckrodt) e água destilada;

Reagentes: ácido acético anidro (Merck), ácido acético glacial (Synth), ácido bórico (Synth), ácido clorídrico (Merck), ácido fórmico (Merck), ácido oxálico (Synth), cloreto de alumínio (Merck) e hexametilenotetramina (Riede-der Haën);

Padrão de flavonóide: rutina (Sigma).

III.1.3. Material vegetal

As folhas secas de *P. alata* (coletada em março/99) e *P. edulis* (coletada em junho/98), utilizadas como material de referência no desenvolvimento do método analítico, foram obtidas do cultivo de um ensaio agrônômico do Grupo de Biotecnologia Vegetal da UNAERP (Ribeirão Preto – SP), por intermédio da pesquisadora Dr^a Ana Maria Soares Pereira.

As folhas passaram por secagem imediata, para prevenir a degradação enzimática, em temperatura de 40°C por dois dias, não tendo ultrapassado esta temperatura, pois poderia ocorrer alteração da composição dos flavonóides. As folhas secas foram pulverizadas em um processador doméstico (Walita) e posteriormente submetidas à tamização, utilizando-se o material de granulometria menor que 0,5 mm e $0,5 < 1,0$ mm para as extrações. As amostras foram armazenadas em frascos bem fechados, protegidas da luz, calor e umidade.

III. 2. Adaptação do método da Farmacopéia Francesa para quantificação de flavonóides totais

Uma amostra de 0,3 g de material vegetal moído, exatamente pesado, foi submetido à extração sob refluxo em banho-maria por 1 hora com 20 mL de etanol a 60% (V/V). O extrato foi resfriado em temperatura ambiente e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. Juntou-se ao resíduo da extração 20 mL de solvente e submeteu-se ao refluxo por 1 hora. As soluções extrativas resultantes foram reunidas em um

balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com etanol 60% (V/V) (solução mãe).

Separadamente, duas alíquotas de 0,8 mL da solução mãe foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. O primeiro balão teve seu volume completado com metanol (solução de compensação). O segundo balão foi acrescido de 0,8 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (m/V) e o volume final completado com metanol (solução a ser examinada).

Preparadas as soluções de compensação e a solução a ser examinada (amostra), após 25 minutos de adicionada a solução de AlCl_3 2% (m/V) à amostra, esta teve medida sua absorbância a 427 nm (λ máximo da rutina), contra a solução de compensação. O procedimento está representado no fluxograma (Figura 7).

A quantificação dos flavonóides totais de *P. alata* e *P. edulis* foi feita pelo método do padrão externo, empregando-se rutina como referência. O teor de flavonóides totais foi calculado pela equação da reta, obtida através do gráfico da curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, preparou-se inicialmente 50 mL de solução de rutina com concentração de 1000 mg/L em etanol 60%. A partir dessa solução, preparou-se por diluição soluções de concentrações 100; 140; 180; 220; 260 mg/L. O procedimento para a complexação das soluções (a ser examinada e de compensação) foi seguido conforme descrito no item III.2, sendo utilizadas em lugar da solução mãe as diferentes soluções de rutina. As análises foram feitas em triplicata.

Para verificar se havia diferença estatística entre os resultados obtidos para cada espécie de *Passiflora*, foi aplicado o teste *t* de Student [Harris, 2003].

Figura 7 – Método adaptado da Farmacopéia Francesa e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies *P. alata* e *P. edulis*.

III. 3. Adaptação do método da Farmacopéia Helvética para quantificação de flavonóides totais

Uma amostra de 0,3 g de material vegetal moído, exatamente pesado, foi submetido à extração sob refluxo em banho-maria por 30 minutos com 0,5 mL de solução de hexametenotetramina 0,5% (v/v), 1 mL de ácido clorídrico p. a. e 10 mL de acetona p. a. . O extrato foi resfriado em temperatura ambiente e o sobrenadante filtrado em algodão hidrófilo. Juntou-se ao resíduo da extração o algodão e 10 mL de solvente; submeteu-se ao refluxo por 10 minutos (executou-se este procedimento por 2 vezes). As soluções extrativas resultantes foram reunidas em um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetona p. a. (solução extrativa).

Em um funil de separação, colocou-se 10 mL da solução extrativa, acrescido de 10 mL de água e extraído uma vez com 7,5 mL e 3 vezes com 5 mL de acetato de etila p. a. . Os extratos orgânicos reunidos em funil de separação foi lavado 2 vezes com 25 mL de água. Os resíduos foram coletados em balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com acetato de etila p. a. (solução mãe).

Separadamente, duas alíquotas de 4,0 mL da solução mãe foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. O primeiro balão teve seu volume completado com solução de ácido acético glacial 5% (v/v) em metanol (solução de compensação). O segundo balão foi acrescido de 0,4 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (m/V) e o volume final completado com solução de ácido acético glacial 5% (v/v) em metanol (solução a ser examinada).

Preparadas as soluções de compensação e a solução a ser examinada (amostra), após 30 minutos de adicionada solução de AlCl_3 2% (m/V) à amostra,

esta teve medida sua absorbância a 430 nm (λ máximo da rutina), contra solução de compensação. O procedimento está representado no fluxograma (Figura 8).

A quantificação dos flavonóides totais de *P. alata* e *P. edulis* foi feita pelo método do padrão externo, empregando-se rutina como referência. O teor de flavonóides totais foi calculado pela equação da reta, obtida através do gráfico da curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, preparou-se inicialmente 50 mL de solução de rutina com concentração 100 mg/L em metanol. A partir dessa solução, preparou-se por diluição soluções de concentrações 1,28; 2,24; 2,88; 3,52; 4,16 mg/L. O procedimento para o preparo das soluções (a ser examinada e de compensação) foi seguido conforme descrito no item III.3, mas em lugar da solução mãe, foram utilizadas as diferentes soluções de rutina. As análises foram feitas em triplicata.

Para verificar se havia diferença estatística entre os resultados obtidos para cada espécie de *Passiflora*, foi aplicado o teste *t* de Student [Harris, 2003].

Figura 8 – Método adaptado da Farmacopéia Helvética e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies *P. alata* e *P. edulis*.

III. 4. Adaptação do método da Farmacopéia Européia para quantificação de flavonóides totais

Uma amostra de 0,2 g de material vegetal moído e exatamente pesado, foi submetido à extração sob refluxo em banho-maria por 30 minutos com 40 mL de etanol 60% (V/V). O extrato foi resfriado em temperatura ambiente e o sobrenadante filtrado em algodão hidrófilo. Juntou-se ao resíduo da extração o algodão e 40 mL de solvente; submeteu-se ao refluxo por 10 minutos. As soluções extrativas resultantes foram reunidas em um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com etanol 60% (V/V) (solução mãe).

Separadamente, duas alíquotas de 5,0 mL da solução mãe foram transferidas para balões de fundo redondo de 20 mL. O primeiro balão foi colocado no rotaevaporador até secar. O resíduo do balão foi retirado com uma mistura de 0,9 mL de metanol + 9,1 mL de ácido acético glacial. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, em seguida adicionou-se 10 mL de ácido fórmico e completou-se o volume com ácido acético anidro (solução de compensação). O segundo balão foi colocado no rotaevaporador até secar. O resíduo do balão foi retirado com uma mistura de 0,9 mL de metanol + 9,1 mL de ácido acético glacial. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL; adicionou-se 10 mL de uma solução consistindo de 0,25 g de ácido bórico + 0,20 g de ácido oxálico, diluídos em ácido fórmico e o volume foi completado com ácido acético anidro (solução a ser examinada).

Preparadas as soluções de compensação e a solução a ser examinada (amostra), após 30 minutos de adicionada a solução de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ em ácido fórmico (m/V) à amostra, esta teve medida sua absorbância a 421 nm (λ máximo da

rutina), contra solução de compensação. O procedimento está representado no fluxograma (Figura 9).

Os flavonóides totais de *P. alata* e *P. edulis* obtidos por esta metodologia foram quantificados pelo método do padrão externo, e empregou-se rutina como referência. O teor de flavonóides totais foi calculado pela equação da reta, obtida através do gráfico da curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, preparou-se inicialmente 100 mL de solução de rutina com concentração 100 mg/L em etanol 60%. A partir dessa solução, preparou-se por diluição soluções de concentrações 5; 10; 20; 30 e 40 mg/L. O procedimento para o preparo das soluções (a ser examinada e de compensação) foi seguido conforme descrito no item III.4, mas em lugar da solução mãe, foram utilizadas as diferentes soluções de rutina. As análises foram feitas em triplicata.

Para verificar se havia diferença estatística entre os resultados obtidos para cada espécie de *Passiflora*, foi aplicado o teste *t* de Student [Harris, 2003].

Figura 9 – Método adaptado da Farmacopéia Européia e utilizada na quantificação de flavonóides totais das espécies *P. alata* e *P. edulis*.

III.5. Validação dos métodos

Os métodos descritos nos itens III. 2 a III. 4 foram validados quanto à precisão, exatidão, linearidade e sensibilidade, segundo os critérios propostos pelo ICH [ICH, 1996].

Para determinar a precisão e exatidão dos métodos, foram realizadas medidas intra e interdias. A precisão intradias foi examinada em três amostras individuais em um único dia, e a precisão interdias foi determinada em três dias diferentes. O mesmo procedimento foi aplicado para determinação da exatidão nas metodologias utilizadas.

A linearidade foi determinada para a curva de calibração da rotina em cinco diferentes valores de concentração (para o método da Farmacopéia Francesa de 8 mg/L a 20,8 mg/L; para o método da Farmacopéia Helvética de 1,28 mg/L a 4,16 mg/L e para o método da Farmacopéia Européia de 5 mg/L a 40 mg/L), em triplicata.

A sensibilidade é a habilidade de um método de distinguir duas concentrações próximas, sendo determinada através dos limites de quantificação e de detecção [Cass & Degani, 2001].

Os métodos utilizados envolvem várias etapas, nas quais pode ocorrer perda dos analitos, e por isso é importante estabelecer o fator de recuperação do método. O teste de recuperação consiste na adição de quantidades de substância padrão, analiticamente mensuráveis, à amostra analisada.

Os resultados obtidos por espectrofotometria no UV-Visível foram também comparados com dados quantitativos obtidos por HPLC [Pereira, 2004], com o propósito de estabelecer qual das metodologias testadas forneceria os resultados com maior credibilidade.

No presente trabalho foi adicionado certa quantidade conhecida de rutina (100 mg/mL) às folhas de *P. alata* e *P. edulis* e foram seguidos os procedimentos descritos nos itens III. 2 (Farmacopéia Francesa) e III. 4 (Farmacopéia Européia), que foram realizados em triplicata. A equação utilizada para o cálculo do Fator de Recuperação [Leite, 1998] é:

$$\text{Fator}_{\text{Rec}} = \frac{(A_R)}{(A_i)} \times 100$$

Onde,

Fator_{Rec} – fator de recuperação

A_R – quantidade de analito recuperado

A_i – quantidade de analito introduzido

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Modificações realizadas nos métodos das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia

Os três métodos estudados necessitaram de algumas modificações para obter-se melhores resultados. O método de análise quantitativa dos flavonóides descrito na Farmacopéia Francesa para os flavonóides de *Passiflora incarnata* utiliza leitura no UV-visível a $\lambda = 394$ nm, para o padrão vitexina; na Farmacopéia Helvética, $\lambda = 422$ nm para o padrão hiperosídeo e na Farmacopéia Européia, $\lambda = 401$ nm também para o padrão vitexina. Para os três métodos, escolheu-se a rutina (Figura 10) como substância de referência, utilizada para o cálculo do teor de flavonóides totais e construção da curva de quantificação. A utilização da rutina é justificada por ser um flavonóide presente nas duas espécies de *Passiflora* estudadas no presente trabalho.

Figura 10 – Estrutura da rutina.

Outro motivo para utilização da rotina como padrão está relacionado ao seu menor custo, comparado aos outros padrões de flavonóides.

Outra modificação foi a granulometria das amostras: utilizou-se partículas com tamanhos menores que 0,5 mm e entre 0,5 e 1 mm. A preocupação com a granulometria da amostra deve-se ao fato de que os flavonóides são encontrados nos vacúolos das células vegetais e, portanto, conclui-se que quanto mais triturada a planta for, mais eficiente será a extração dos mesmos [Markham, 1982].

Inicialmente, nos três métodos testados neste trabalho, foram utilizadas partículas menores que 0,5 mm. No entanto, um dos objetivos deste trabalho é a comparação com os resultados obtidos por HPLC. Desta maneira, após verificar qual dos três métodos era mais simples e rápido, testou-se o mesmo com amostras de granulometria entre 0,5 e 1 mm, a mesma utilizada para as análises por HPLC.

Os espectros do padrão rotina apresentaram um máximo de absorção após complexação, em $\lambda = 427$ nm (Figura 11a) pelo método da Farmacopéia Francesa, em $\lambda = 430$ nm pela Helvética (Figura 11b) e em $\lambda = 430$ nm pela Européia (Figura 11b). Em todos os casos ocorrem deslocamentos batocrômicos indicando a presença de grupos OH vicinais [Mabry *et al*, 1970].

Os comprimentos de onda foram escolhidos para análise espectrofotométrica, levando-se em consideração o fato de que a rutina apresenta forte absorção em torno de 300 a 400 nm quando complexada com cloreto de alumínio ou com ácido bórico/oxálico [Mabry *et al*, 1970].

Nos espectros da Figura 11 também são observados outros máximos de absorção na região abaixo de 300 nm, porém esta região tem o inconveniente da possível interferência de outros compostos aromáticos não flavonóidicos, os quais não foram estudados neste trabalho.

Os métodos descritos na Farmacopéia Francesa e Helvética utilizam a complexação dos flavonóides com cloreto de alumínio. O método da Farmacopéia Helvética consiste na análise do complexo de alumínio após hidrólise ácida e extração com acetato de etila. Este é um método geral e é preconizado para *Passiflora incarnata* e outras espécies ricas em flavonóides tais como *Camomila recutita*, *Crataegus* spp. e *Betula alba*. Muitos autores [Wagner *et al.*, 1983; Glasl & Becker, 1984; Schimidt & González Ortega, 1993] têm atribuído ao método muitas fontes de erro analítico, uma vez que este foi desenvolvido especificamente para analisar flavonóides O-glicosilados e não para flavonóides C-glicosilados, que resistem à hidrólise ácida. Os C-glicosídeos são menos solúveis em acetato de etila do que as agliconas e flavonas e podem permanecer na fase aquosa após hidrólise, fase esta que é descartada. Durante a hidrólise ácida, podem sofrer isomerização, denominada rearranjo de Wessely-Moser, formando misturas de 8-C-glicosídeos e 6-C-glicosídeos [Markham, 1982].

O método proposto pela Farmacopéia Francesa apresenta menos erros, pois a medição espectrofotométrica é realizada após adição do cloreto de alumínio sem hidrólise ácida e extração com acetato de etila.

O método da Farmacopéia Européia propõe o uso do reagente oxalo-bórico no lugar de cloreto de alumínio para a formação do complexo a ser analisado por espectrofotometria. A adaptação deste método para as espécies brasileiras de maracujá apresenta um problema: a literatura diz que a complexação dos flavonóides com ácido bórico ocorre somente nos flavonóides que possuem hidroxilas 3' e 4' (catecol) livres, não ocorrendo em outras posições [Hostettmann *et al.*, 1984]. Esta informação é de extrema importância para a adaptação do método descrito na Farmacopéia Européia para as espécies brasileiras de maracujá, pois os flavonóides encontrados nas espécies de *Passiflora* são derivados de apigenina (como vitexina e isovitexina) e luteolina (como orientina e isoorientina). A apigenina possui o grupo 3' e 4' (catecol), mas a luteolina não o possui [Mabry *et al.*, 1970].

A utilização do ácido bórico como agente complexante é discutido em alguns artigos [Hostettmann *et al.*, 1984] e livros [Geissman, 1962, Markham, 1982], mas nenhum material foi encontrado sobre a utilização da combinação ácido oxálico e ácido bórico. Chabariberi (2003) concluiu preliminarmente que o ácido oxálico pode atuar como intermediário necessário para a complexação dos flavonóides pelo ácido bórico, também colaborando para a estabilidade do complexo formado, mas sem chegar a conclusões definitivas sobre esta reação.

No método da Farmacopéia Helvética houve diversos problemas de ordem prática. Este método utiliza dois solventes com densidades muito próximas (acetona: $d^{25} = 0,788$ e acetato de etila: $d^{25} = 0,898$) o que trouxe sérios problemas na extração líquido-líquido utilizada para “clean-up” dos extratos. Para minimizar o problema foi necessário colocar a vidraria em geladeira e manter uma temperatura ambiente em torno de 20° C com o auxílio de um condicionador de ar. No método da Farmacopéia Européia também houve problemas de dissolução no preparo da

solução a ser examinada: na etapa onde era adicionada a mistura de 0,25g de ácido bórico + 0,20g de ácido oxálico, diluídos em ácido fórmico em temperatura ambiente, o ácido bórico não se dissolvia totalmente. Foi necessário um pouco de aquecimento em banho-maria sob leve agitação, e em alguns minutos o ácido se solubilizava totalmente. Aguardava-se alguns instantes para a solução retornar a temperatura ambiente e finalizava-se o preparo da solução a ser examinada.

Resumindo, para a adaptação do método descrito nas Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia para as espécies de maracujá, as modificações necessárias foram a alteração do comprimento de onda, a granulometria da amostra e a utilização da rutina como substância de referência.

IV. 2. Análise quantitativa dos flavonóides totais por espectrofotometria no UV-visível

IV. 2. 1. Avaliação dos métodos (Farmacopéia Francesa, Helvética e Européia)

Para os três métodos utilizados (Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia), a curva padrão foi construída utilizando rutina como referência. Os dados utilizados para construção das respectivas curvas estão descritos nas Tabelas 1 a 3, e as curvas obtidas são mostradas nas Figuras 12 a 14.

A absorvidade molar da rutina (ϵ) foi calculada através da construção das curvas utilizando os valores de concentração expressos em mol/L pelas absorbâncias obtidas (Tabelas 1 a 3). Os valores encontrados foram $\epsilon = 17259$ (Farmacopéia Francesa), $\epsilon = 6062,3$ (Farmacopéia Helvética) e $\epsilon = 13201$ (Farmacopéia Européia), e na literatura foi encontrado o valor de $\epsilon_{361}^{EtOH} = 19498,45$ [Geissman, 1962].

Tabela 1 – Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Francesa).

Concentração de rutina (mg/L)	Concentração de rutina (mol/L)	Absorbância (média)* $\pm$ CV (%) ^a
8	$1,31 \times 10^{-5}$	0,217 (0,9)
11	$1,83 \times 10^{-5}$	0,307 (2,1)
14	$2,36 \times 10^{-5}$	0,393 (1,8)
18	$2,88 \times 10^{-5}$	0,473 (0,8)
21	$3,41 \times 10^{-5}$	0,587 (1,2)

* (n=3)

^a (coeficiente de variação percentual)

Figura 12 – Curva analítica expressa em mg/L obtida para a rutina pelo método descrito na Farmacopéia Francesa.

Tabela 2 - Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Helvética).

Concentração de rutina (mg/L)	Concentração de rutina (mol/L)	Absorbância (média)* $\pm$ CV (%) ^a
1,28	$2,1 \times 10^{-6}$	0,007 (28,6)
2,24	$3,7 \times 10^{-5}$	0,015 (10,4)
2,88	$4,7 \times 10^{-5}$	0,023 (9,2)
3,52	$5,8 \times 10^{-5}$	0,029 (5,2)
4,16	$6,8 \times 10^{-5}$	0,035 (5,9)

* (n=3)

^a (coeficiente de variação percentual) **Figura 13** – Curva analítica expressa em mg/L obtida para a rutina pelo método descrito na Farmacopéia Helvética.

Tabela 3 – Dados utilizados para construção da curva analítica (Farmacopéia Européia).

Concentração de rutina (mg/L)	Concentração de rutina (mol/L)	Absorbância (média)* $\pm$ CV (%) ^a
5	$8,19 \times 10^{-6}$	0,142 (1,9)
10	$1,64 \times 10^{-5}$	0,269 (2,1)
20	$3,28 \times 10^{-5}$	0,538 (3,1)
30	$4,91 \times 10^{-5}$	0,699 (2,7)
40	$6,55 \times 10^{-5}$	0,905 (1,8)

* (n=3)

^a (coeficiente de variação percentual)

Figura 14 – Curva analítica expressa em mg/L obtida para a rutina pelo método descrito na Farmacopéia Européia.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos por diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através do ICH (“International Conference on Harmonization”), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos [Ribani *et al*, 2004].

Os parâmetros de validação segundo o ICH (1996), são: exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez.

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos ensaios de recuperação, calculado para as espécies de maracujá fortificadas com rutina.

Método	Espécie	Quantidade de rutina adicionada mg/mL	Recuperação CV (%) ^a
Farmacopéia Francesa	<i>P. edulis</i>	50	78,2 (2,1)
	<i>P. alata</i>	50	75,7 (3,0)
Farmacopéia Helvética	<i>P. edulis</i>	100	71,3 (9,8)
	<i>P. alata</i>	100	70,3 (7,7)
Farmacopéia Européia	<i>P. edulis</i>	50	115,7 (7,3)
	<i>P. alata</i>	50	100,6 (8,5)

^a = (coeficiente de variação percentual)

Os valores de recuperação entre 70 e 120% são aceitáveis segundo os limites propostos pelo ICH (1996). Desta forma, os valores encontrados para os métodos em estudo foram satisfatórios.

A precisão foi avaliada pela repetitividade e precisão intermediária.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sobre as mesmas condições de medição chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo [Ribani *et al*, 2004]. Os resultados de repetitividade são apresentados nas Tabelas 5 a 7, e de acordo com os valores dos coeficientes de variação, os métodos das Farmacopéias Francesa e Européia foram considerados satisfatórios.

Tabela 5 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Francesa).

<i>Passiflora edulis</i>			
Amostras*	Massa (g)	Rutina $y = 38,313x - 0,0123$ $r^2 = 0,9964$ (g/L)	Teor de flavonóides expresso em rutina (mg flavonóide/g de Planta seca)
1	0,3030	$1,59 \times 10^{-2}$	32,81
2	0,3095	$1,55 \times 10^{-2}$	31,33
3	0,3063	$1,63 \times 10^{-2}$	33,32
Média CV (%)		$1,59 \times 10^{-2}$	32,49 3,18
<i>Passiflora alata</i>			
1	0,3033	$6,90 \times 10^{-3}$	14,12
2	0,3002	$6,76 \times 10^{-3}$	14,07
3	0,3009	$7,29 \times 10^{-3}$	15,13
Média CV(%)		$6,98 \times 10^{-3}$	14,44 4,14

*(n = 3)

Tabela 6 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Helvética).

<i>Passiflora edulis</i>			
Amostras*	Massa (g)	Rutina $y = 9,9129x - 0,0061$ $R^2 = 0,9964$ (g/L)	Teor de flavonóides expresso em rutina (mg flavonóide/g de Planta seca)
1	0,3427	$3,24 \times 10^{-3}$	2,95
2	0,3047	$4,25 \times 10^{-3}$	4,36
3	0,3051	$5,15 \times 10^{-3}$	5,28
Média CV(%)		$4,21 \times 10^{-3}$	4,20 27,96
<i>Passiflora alata</i>			
1	0,3303	$3,54 \times 10^{-3}$	3,35
2	0,3005	$3,64 \times 10^{-3}$	3,79
3	0,3345	$3,04 \times 10^{-3}$	2,84
Média CV(%)		$3,41 \times 10^{-3}$	3,33 14,29

*(n = 3)

Tabela 7 – Resultados do teste de repetitividade para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Européia).

<i>Passiflora edulis</i>			
Amostras	Massa (g)	Rutina $y = 21,606 + 0,0569$ $R^2 = 0,9916$	Teor de flavonóides expresso em rutina (mg flavonóide/g de planta seca)
1	0,2044	$2,34 \times 10^{-2}$	57,19
2	0,2006	$2,24 \times 10^{-2}$	55,85
3	0,2020	$2,31 \times 10^{-2}$	57,29
Média CV(%)		$2,30 \times 10^{-2}$	56,78 1,42
<i>Passiflora alata</i>			
1	0,2007	$9,91 \times 10^{-3}$	24,69
2	0,2006	$10,79 \times 10^{-3}$	26,89
3	0,2005	$12,32 \times 10^{-3}$	30,71
Média CV (%)		$11,01 \times 10^{-3}$	27,43 11,11

*(n = 3)

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores [Ribani *et al*, 2004].

Neste trabalho a precisão intermediária foi avaliada por variação inter-dias, como representado nas Tabelas 8 a 10. De acordo com os valores dos coeficientes de variação, os três métodos apresentaram valores satisfatórios.

Tabela 8 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Francesa).

<i>Passiflora edulis</i>						
Dia	Amostras	Teor de flavonóides expresso em rotina (mg de flavonóide/g planta seca)			Média	CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
1º dia	A₁	32,81	31,33	33,32	32,49	3,18
2º dia	A₂	33,58	32,71	32,20	32,83	2,13
3º dia	A₃	31,30	33,80	31,54	32,21	4,28
Média					32,51	0,95
<i>Passiflora alata</i>						
1º dia	A₁	14,12	14,07	15,13	14,44	4,14
2º dia	A₂	14,12	13,98	14,32	14,14	1,21
3º dia	A₃	13,89	14,29	13,90	14,03	1,63
Média					14,20	1,49

Tabela 9 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Helvética).

<i>Passiflora edulis</i>						
Dia	Amostras	Teor de flavonóides expresso em rotina (mg de flavonóide/g planta seca)			Média	CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
1º dia	A ₁	2,95	4,36	5,28	4,20	27,96
2º dia	A ₂	3,33	2,98	4,51	3,61	22,23
3º dia	A ₃	4,58	2,99	4,27	3,95	21,36
Média					3,92	7,55
<i>Passiflora alata</i>						
1º dia	A ₁	3,35	3,79	2,84	3,33	14,29
2º dia	A ₂	2,92	2,98	3,11	3,00	2,23
3º dia	A ₃	3,29	2,69	2,95	2,98	10,11
Média					3,10	6,33

Tabela 10 – Resultados da variação inter-dias para o método de quantificação de flavonóides totais de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* (Farmacopéia Européia).

<i>Passiflora edulis</i>						
Dia	Amostras	Teor de flavonóides expresso em rotina (mg de flavonóide/g planta seca)			Média	CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
1º dia	A ₁	57,19	55,85	57,29	56,78	1,42
2º dia	A ₂	56,22	56,01	55,32	55,85	0,84
3º dia	A ₃	55,24	56,02	56,32	55,86	1,00
Média					56,16	0,95
<i>Passiflora alata</i>						
1º dia	A ₁	24,69	26,89	30,71	27,43	11,11
2º dia	A ₂	25,12	26,01	27,00	26,04	3,61
3º dia	A ₃	31,01	25,07	24,5	26,86	13,42
Média					26,78	2,61

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental [Ribani *et al.*, 2004]. Esta definição se aplica à maioria das técnicas analíticas, sendo que o cálculo do limite de detecção pode ser efetuado por diferentes modos.

Neste trabalho, o limite de detecção foi avaliado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica, a partir do desvio padrão dos valores de resposta (SD), obtido para o valor de concentração inferior da curva analítica (x_1), utilizando-se a equação 1 [Massart, 1997]:

$$LD = \frac{3,3 \cdot SD \cdot x_1}{\bar{x}} \quad \text{Eq.}$$

(1)

onde $\bar{x}$ corresponde a média de todos os valores de resposta, SD é dado pela equação 2:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Eq.}$$

(2)

e n = número de replicatas.

A Tabela 11 mostra os valores obtidos de LD para cada método, que foram considerados satisfatórios, uma vez que são inferiores às concentrações médias dos analitos em estudo.

Tabela 11 – Limites de detecção (LD) para os métodos das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia.

Método	Farmacopéia Francesa	Farmacopéia Helvética	Farmacopéia Européia
Concentração do padrão (mg/L)	8	1,28	5
Absorbâncias			
x_1	0,215	0,005	0,139
x_2	0,217	0,007	0,143
x_3	0,219	0,009	0,144
$\bar{x}$	0,217	0,007	0,142
SD	$2,00 \times 10^{-3}$	$2,00 \times 10^{-3}$	$2,65 \times 10^{-3}$
LD (mg/L)	$8,18 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-3}$

O limite de quantificação (LQ) pode ser estimado a partir do limite de detecção (LD), aplicando-se a equação 3 [Massart, 1997]:

$$LQ = 3 \cdot LD \quad \text{Eq.}$$

(3)

A Tabela 12 mostra os valores obtidos de LQ para cada método. Todos os valores de LQ atendem plenamente aos objetivos deste trabalho, considerando que são inferiores às concentrações médias dos analitos em estudo.

Tabela 12 – Limites de quantificação (LQ) para as metodologias das Farmacopéias Francesa, Helvética e Européia.

Metodologia	LQ (mg/L)
Farmacopéia Francesa	$2,45 \times 10^{-3}$
Farmacopéia Helvética	$1,10 \times 10^{-2}$
Farmacopéia Européia	$5,14 \times 10^{-3}$

A rotina também foi utilizada como padrão analítico para avaliação da linearidade.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Esse parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 [Ribani *et al*, 2004].

Tabela 13 – Curva analítica e dados de linearidade e sensibilidade encontrados para o padrão analítico rotina nas metodologias estudadas.

Metodologia	Equação da curva ($y = a + bx$)	R ²
Farmacopéia Francesa	$y = -0,0123 + 28,313x$	0,9964
Farmacopéia Helvética	$y = 0,0061 + 9,9129x$	0,9964
Farmacopéia Européia	$y = 0,0569 + 21,606x$	0,9916

Pela Tabela 13, concluiu-se que o método da Farmacopéia Francesa apresentou maior linearidade e também melhor sensibilidade, uma vez que coeficientes angulares altos são mais eficientes para distinguir pequenas diferenças no sinal e conseqüentemente na concentração do analito [Massart, 1997].

A robustez de um método mede a capacidade de este não ser afetado por pequenas variações [ICH, 1993]. Os métodos da Farmacopéia Francesa e Européia mostraram possuir, de acordo com Ribani *et al* (2004), robustez intrínseca, pois mantiveram sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise.

IV.2.2. Resultados obtidos por espectrofotometria (UV-visível) e comparação com o método cromatográfico (HPLC)

A concentração total dos flavonóides presentes nas amostras de referência de *P. alata* e *P. edulis* foi calculada utilizando o método do padrão externo, empregando rotina como padrão e utilizando as curvas analíticas mostradas nas Figuras 12 a 14.

Como já descrito, um dos objetivos deste trabalho é comparar métodos espectrofotométricos com o método cromatográfico [Pereira, 2004]. Os resultados obtidos pelas duas técnicas são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Teor de flavonóides totais expressos em rutina (mg de flavonóide/g de planta seca), obtido por espectrofotometria (UV-visível) e por cromatografia (HPLC-UV/DAD).

Espécies	Técnica/ Método	Teor de flavonóides totais			Média	CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
<i>P. edulis</i>	Espectrofotometria (Farmacopéia Francesa)	32,49	32,83	32,21	32,51	0,96
	Espectrofotometria (Farmacopéia Helvética)	4,20	3,61	3,95	3,92	7,55
	Espectrofotometria (Farmacopéia Européia)	56,78	55,85	55,86	56,16	0,95
	HPLC*	11,12	11,07	10,97	11,05	0,69
<i>P. alata</i>	Espectrofotometria (Farmacopéia Francesa)	14,44	14,14	14,03	14,20	1,49
	Espectrofotometria (Farmacopéia Helvética)	3,33	3,00	2,98	3,10	6,33
	Espectrofotometria (Farmacopéia Européia)	27,43	26,04	26,86	26,78	2,61
	HPLC*	11,23	11,49	11,02	11,25	2,09

TFT – Teor de Flavonóides Totais

CV (%) – Coeficiente de Variação Percentual

*Fonte: [Pereira, 2002] e [Pereira, 2004]

Os valores obtidos na Tabela 14 mostram que o teor de flavonóides totais encontrados para *P. alata* e *P. edulis* pelo método da Farmacopéia Européia é maior se comparado aos valores encontrados pelo método da Farmacopéia Francesa e pelo método da Farmacopéia Helvética. Uma das hipóteses é que outros constituintes químicos encontrados nas espécies de *Passiflora* poderiam ser

complexados pelo ácido bórico, ou as hidroxilas 3' e 4' (catecol) não serem a única posição complexada. Porém, os resultados encontrados pelo método da Farmacopéia Francesa deveriam ser maiores do que os encontrados pelo método da Farmacopéia Européia, pois segundo Hostettmann (1984) somente os flavonóides derivados de apigenina podem ser complexados pelo ácido bórico por possuírem as hidroxilas 3' e 4' (catecol).

Aplicou-se o teste-*t* de Student, que indicou diferenças significativas entre os resultados obtidos entre as três metodologias. O mesmo ocorreu quando confrontados os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico e os resultados obtidos por cromatografia.

No entanto, é importante destacar que a granulometria utilizada para testar as três metodologias foi partículas inferiores a 0,5 mm. As análises por cromatografia foram realizadas utilizando-se partículas de tamanho entre 0,5 e 1,0 mm. Sendo assim, escolheu-se a metodologia da Farmacopéia Francesa por ser mais rápida, mais simples e com menor custo e testou-se essa metodologia com partículas entre 0,5 e 1,0 mm. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Comparação entre os resultados obtidos pela metodologia da Farmacopéia Francesa utilizando diferentes granulometrias.

Espécies	Granulometria (mm)	Teor de flavonóides totais			Média	CV%
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
<i>P. edulis</i>						
	< 0,5	32,49	32,83	32,21	32,51	0,96
	0,5 a 1,0	10,23	11,56	10,52	10,77	6,49
<i>P.alata</i>						
	< 0,5	14,44	14,14	14,03	14,20	1,49
	0,5 a 1,0	10,75	10,59	8,31	9,88	13,81

Conforme esperado, com base na análise estatística (teste *t*, *p* = 0,05) dos dados da Tabela 15, o teor de flavonóides em *P. edulis* e *P. alata* obtido diferentes granulometrias, é estatisticamente diferente. Utilizando essas informações, novamente compararam-se os valores obtidos pelo método espectrofotométrico (Farmacopéia Francesa) e pelo método cromatográfico, ambos obtidos usando partículas entre 0,5 e 1,0 mm (Tabela 16).

Tabela 16 – Comparação entre o método espectrofotométrico e cromatográfico (granulometria : 0,5 a 1,0 mm).

Espécies	Técnica/ Metodologia	Teor de flavonóides totais			Média	CV (%)
		TFT ₁	TFT ₂	TFT ₃		
<i>P. edulis</i>	Espectrofotometria (Farmacopéia Francesa)	10,23	11,56	10,52	10,77	6,49
	HPLC*	11,12	11,07	10,97	11,05	0,69
<i>P. alata</i>	Espectrofotometria (Farmacopéia Francesa)	10,75	10,59	8,31	9,88	13,81
	HPLC*	11,23	11,49	11,02	11,25	2,09

Com base na análise estatística (teste *t*, $p = 0,05$) o teor de flavonóides em *P. edulis* e *P. alata* obtido pelo método espectrofotométrico (UV-Visível) é estatisticamente idêntico ao obtido pelo método cromatográfico (HPLC). Portanto, conclui-se que o método espectrofotométrico pode ser usado como método de análise para espécies brasileiras de *Passiflora*, com a vantagem de ser mais simples, mais rápido e oferecer menor custo de reagentes e equipamentos.

A Tabela 17 mostra um resumo dos dados obtidos referentes a cada metodologia utilizada neste trabalho.

Tabela 17 – Comparação das metodologias de análise espectrofotométrica utilizadas neste trabalho.

Parâmetros	Farmacopéia Francesa	Farmacopéia Européia	Farmacopéia Helvética
Massa de planta seca utilizada	0,3 g	0,3 g	0,2 g
Solução extratora	EtOH 60%	Acetona P. A.	EtOH 60%
Agente complexante	Cloreto de alumínio (Al_2Cl_3) 2% em MeOH	Cloreto de alumínio (Al_2Cl_3) 2% em MeOH	Ácido bórico (H_3BO_3) + Ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) em HCOOH
Solução de compensação (branco)	Solução mãe + MeOH	Solução mãe + HOAc/MeOH 5%	Solução mãe + (mistura de MeOH + HOAc glacial) + HCOOH anidro + HOAc anidro
Solução a ser examinada	Solução mãe + Al_2Cl_3 + MeOH	Solução mãe + Al_2Cl_3 + HOAc/MeOH 5%	Solução mãe + (mistura de MeOH + HOAc glacial) + (H_3BO_3 + $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ em HCOOH anidro) + HOAc anidro
Tempo de reação após adição do agente complexante	25 minutos	30 minutos	30 minutos
Comprimento de onda utilizado	$\lambda = 427 \text{ nm}$	$\lambda = 430 \text{ nm}$	$\lambda = 421 \text{ nm}$
Tempo total de análise	≈ 180 minutos	≈ 210 minutos	≈ 160 minutos
T.F.T.* (<i>P. edulis</i>)	32,51 (0,96)	3,92 (7,55)	56,16 (0,95)
T.F.T.* (<i>P. alata</i>)	14,20 (1,49)	3,10 (6,33)	26,7 (2,61)
Recuperação** (<i>P. edulis</i>)	78,2 (2,1)	71,3 (9,8)	115,7 (7,3)
Recuperação** (<i>P. alata</i>)	75,7 (3,0)	70,3 (7,7)	100,6 (8,5)

*Teor de flavonóides totais (expressos em mg flavonóides/g de planta seca)

**Valores representados em % de recuperação

V. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho com a adaptação da metodologia descrita na Farmacopéia Francesa para as espécies brasileiras de *Passiflora* conclui-se que a espectrofotometria no UV-visível proporcionou bons resultados, indicando ser esta uma técnica adequada para o controle de qualidade de *Passiflora*.

Os dados obtidos por espectrofotometria no UV-visível foram comparados com os dados quantitativos obtidos por cromatografia (HPLC) com o propósito de verificar a eficiência da metodologia desenvolvida. A vantagem da espectrofotometria no UV-visível quando comparada à cromatografia (HPLC) é ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que utiliza pequena quantidade de solvente.

Por outro lado, os resultados obtidos pela metodologia da Farmacopéia Helvética foram considerados insatisfatórios, tornando esta metodologia inviável, tanto pelos resultados quanto pelos problemas enfrentados na adaptação da mesma, citados no capítulo anterior.

Os resultados obtidos com a utilização da metodologia da Farmacopéia Européia mostraram a necessidade de maiores estudos da reação de complexação. Como sugestão de trabalho futuro, pode-se explorar mais o mecanismo desta reação.

A necessidade de um maior controle de qualidade para os fitoterápicos e, principalmente, de estudos analíticos das plantas medicinais é de extrema importância, visto que grande parte das plantas medicinais nativas do Brasil ainda não tem estudos químicos e analíticos suficientes para permitir a elaboração de

monografias completas e modernas para a Farmacopéia Brasileira, como é o caso de *Passiflora*, ou para o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Ministério da Saúde. A espectrofotometria no UV-visível pode ser uma opção vantajosa no estudo analítico destas inúmeras plantas ainda não estudadas.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Anexo – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasília: ANVISA, 2003. 15p.

AHMED, H.J.; HOSSAN, J. Spectrophotometric determination of aluminum by morin. **Talanta**, v. 42, p. 1135-1142, 1995.

AKHONDZADEH, S.; KASHANI, L.; MOBASERI, M.; HOSSEINI S. H.; NIKZAD, S.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of opiates withdrawal: a double-blind randomized controlled trial. **Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, p. 369-373, 2001.

AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on *Pasiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical and Farmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 22, n. 5, p. 1008-1013, 1974.

BLACKWELL, H. W. **Poisonous and Medicinal Plants**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. p. 1-33.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 06 de 31 de janeiro de 1995. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 fev. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33 de 15 de abril de 2000. Aprova o regulamento técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos em Farmácias e seus anexos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 abr. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004.

Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da]**

República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

CARAUTA, J. P. P.; VALENTE, M. C.; DUNN DE ARAÚJO, D. S. *Dorstenia-Gracilis* and *Dorstenia-Schulzii* (Moraceae), new species from South-America. **Bulletin of Torrey Botanical Club**, v. 103, n. 4, p. 172, 1976.

CARTWRIGHT, A. C.; MATHEWS, B. R. **International Pharmaceutical Product Registration**: aspects of quality, safety and efficacy. New York: Ellis Horwood, 1994. p. 247-285.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC**: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p.

CASTRO, G. T., BLANCO, S. E. Structural and spectroscopic study of 5,7-dihydroxy-flavone and its complex with aluminum. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, p. 2235-2241, 2004.

CHABARIBERI, R. A. O. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides da “espinheira-santa” (*Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*)**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

COLLIER, P. D., MALLOWS, R. The estimation of flavonols in tea by gas chromatography of their trimetilsisyl derivatives. **Chromatographia**, v. 57, p. 29-45, 1971.

CORNARD, J. P.; MERLIN, J. C. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. **Journal of Molecular Structure**, v. 569, p. 129-138, 2001.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995. p. 335.

DeMARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. **The Review of Natural Products**. 3. ed. St. Louis: Facts & Comparisons, 2002. p. 547–550.

DENG, H.; VAN BERKEL, G. J. Electrospray mass spectrometry and UV/Visible spectrophotometry studies of aluminum (III) – flavonoid complexes. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 1080-1087, 1998.

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

DHAWAN, K.; SHARMA, A.; Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnate* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p. 397-399, 2002.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of the methanol extract of leaves of *Passiflora incarnate*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 821-822, 2003.

DOYAMA, J. T.; RODRIGUES, H. G.; NOVELLI, E. L. B.; CEREDA, E. VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371-374, 2005.

DUX, J. P. **Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory**. New York: Van Nostrand Reinold, 1990. p. 59-77.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 3. ed. Strasboug: Council of Europe, 2000. Supplement.

EVANS, W. C. **Trease & Evan's Pharmacognosy**. 13. ed., London: Balliere Tindall, 1989. 832p.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 296p.

FARMACOPÉIA Brasileira 3. ed., São Paulo: Atheneu, 1977. 1213 p.

FREITAS, P. C. D. **Estudo Farmacognóstico Comparativo de Espécies Brasileiras do gênero *Passiflora* L.** 1985. 133 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

GEISSMAN, T. A. **The Chemistry of Flavonoid Compounds**. New York: Macmillan, 1962. 666p.

GLASL, H.; BECKER, U. Flavonol-O-Glykoside: photometrische Gehaltsbestimmung. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 124, p. 2147-2152, 1984.

GONZALÉS ORTEGA, G.; SCHMIDT, P. C. Stability studies on dried extracts of passion flower (*Passiflora incarnata* L.). **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 5, n. 5, p. 385-9, 1995.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2003. 876 p.

HASSAN, F. A.; GAMAL, A. S. A selective spectrophotometric method for determination of quercetin in the presence of other flavonoids. **Talanta**, v. 39, n. 3, p. 259-263, 1992.

HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, M. On-line high-performance liquid chromatography ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 283, p. 137-147, 1984.

HSIEH, P., CHANG, F., LEE, K., HWANG, T., CHANG, S. WU, Y. A new anti-HIV alkaloid, drymaritin, and a new C-glycoside flavonoid, diandraflavone, from *Drymaria diandra*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1175-1177, 2004.

INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Guideline Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology. Genebra: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996. p. 6-13.

KATYAL, M. Flavones as analytical reagents – A Review, **Talanta**, v. 15, p. 95-106, 1968.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 3. ed. Campinas: Átomo, 1998. p.30.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmakochemische untersuchungen von drogen der gattung *Passiflora* L. Mitteilung: Phytochemische forschung der drogen aus *Passiflora edulis* Sims, forma *flavicarpa*. **Planta Medica**, v. 27, n. 3, p. 222-225, 1975.

LUTOMSKI, J.; WROCINSKI, T. Pharmacodinamic properties of *P. incarnata* preparations. The effect of alkaloid and flavonoid components on pharmacodinamic properties of the raw materials. **Biuletyn Instytut Roslin Leczniczych**, v. 6, n. 2, p. 176-184, 1960.

- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F. ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MALUF, E.; BARROS, H. M. T.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BENTI, R.; LEITE, J. R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 6, p. 262-226, 1991.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer , 1970. 354p.
- MARCHART, E.; KRENN, L.; KOOP, B. Quantification of the flavonoid glycoside in *Passiflora incarnata* by capillary eletroforesis. **Planta Medica**. v. 69, p. 452-456, 2003.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113 p.
- MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; BUYDENS, L. M. C.; JONG, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of chemometrics and qualimetrics**. New York: Elsevier, 1997. pte A.
- MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora leaves*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 5, p. 257-60, 1997.
- MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.

OGA, S.; FREITAS, P. C.; SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.

OHLWEILER, O. A. **Fundamentos de Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1981. p. 62-110.

PASTEELNICK, L. A. Analytical methods validation. In: BERRY, I. R.; NASH, R. A. (Eds.) **Pharmaceutical process validation**. New York: Marcel Dekker, 1993. cap. 13, p. 411-428.

PEREIRA, C. A. M. **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora* L.** 2002. 272 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

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

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J.; 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, **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 241-248, 2004.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MACCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 295-301, 2005.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, n. 1/2, p. 7-10, 1998.

PHARMACOPÉE Française. 10. ed. Paris: Adrapharm, 1980. 1898 p.

PHARMACOPOEA Helvetica. 7.ed. Bern: Département Federal de l'Intérieur, 1990. 1244 p.

PIERCE, A. R.; GRAHAM, H. N.; GLASSNER, S.; MADLIN, H.; GONZALES, J. G. Analysis of tea flavonols by gas chromatography of their trimethylsilyl derivatives. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 298-302, 1969.

QUERCIA, V.; TURCHETTO, L.; PIERINI, N.; CUOZZO, V.; PERCACCIO, G. identification and determination of vitexin and isovitexin in *Passiflora incarnata* extracts. **Journal of Chromatography**, v. 161, p. 396-402, 1978.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L.F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**, v. 122, p. 11R-34R, 1997.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROSS, M.S.F.; ANDERSON, A. Selection of plants for phytopharmacological study based on modernal herbal practice. **Internacional Journal of Crude Drug Research**, v. 24, p. 1–6, 1986.

SCHMIDT, V. P. C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamtlfavonoidgehaltes von *Passiflorae* herba. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, p. 4457-4466, 1993.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. E.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1986. 176 p.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of Instrumental Analysis**. 4. ed. Philadelphia: Saunders College, 1992. p. 123-170.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 23. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1990. p. 890-892.

VALE, N. B.; LEITE, J. R. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 1, p. 11-24, 1983.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WAGNER, H.; TITEL, G.; BLADT, S. Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Phytopräparaten durch Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 515, 1983.