UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de
Passiflora setacea D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila*
Killip (Passifloraceae)

Alberto Vetore Neto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de
Passiflora setacea D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila*
Killip (Passifloraceae)

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr6018.

O original encontra-se disponível no serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Alberto Vetore Neto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de
Passiflora setacea D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila*
Killip (Passifloraceae)

Alberto Vetore Neto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2015

Alberto Vetore Neto

Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra Elfriede Marianne Bacchi
Orientadora/presidente

Ingrit Elida Collantes Diaz
1º. examinador

Nádia Araci Abou Chacra
2º. examinador

São Paulo, 25 de Fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Ademir e Ercília que, com muito carinho e
apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me iluminar e guiar pelos caminhos da vida e nunca me abandonar nos momentos difíceis.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, esforço e investimento para que eu chegasse até aqui.

À profa. Doutora Elfriede Marianne Bacchi por todos esses anos de orientação e amizade. Pelo voto de confiança e investimento de tempo para minha formação.

Aos professores Doutores Edna Tomiko Myiake Kato, Dominique Hermine Fischer e Paulo Chanel Deodato de Freitas pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Leandro, Guilherme, Flávia, Harry, Bruno, Caio, Thamirys, Ângela, Alexandra, Caroline e Pedro pela ajuda no trabalho diário.

À Embrapa Cerrados por ter gentilmente cedido o material vegetal

À professora Doutora Lígia Ferreira Gomes pelo auxílio na análise das imagens das plantas.

À professora Doutora Primavera Borelli, pelo auxílio com as análises hematológicas.

Às professoras Doutoras Nilsa Sumie Yamashita Wadt e Maria de Lourdes Kikuchi, pelo auxílio no preparo e leitura das lâminas histológicas.

À professora Doutora Telma Mary Kaneko e o técnico José de Sousa Sobrinho, pela ajuda com a esterilização dos materiais.

À professora Doutora Silvia Berlanga de Moraes Barros e aos seus alunos por ceder equipamento de seu laboratório para a realização de análises de quantificação.

À professora Doutora Tais Maria Bauab pela colaboração no ensaio de avaliação da atividade anti *H.pylori*.

À professora Doutora Eliana Aparecida Varanda pela colaboração no ensaio de avaliação do potencial de mutagenicidade.

À professora doutora Maria Inês Genovese Rodriguez, pela colaboração no ensaio antioxidante.

À professora Ivana Barbosa Suffredini pelo auxílio com a liofilização dos extratos.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório pela amizade e auxílio durante os experimentos.

À Aline Ameni e Mariana Sayuri pelo auxílio nas análises bioquímicas

À equipe de funcionários do Biotério do Conjunto das Químicas pela disposição e atenção nos ensaios.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelos esclarecimentos de dúvidas.

À Capes pelo apoio financeiro.

À toda minha família pelo incentivo.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigado!

"E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que os meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida te incomode, eu sei quem sou, e sei pelo que devo lutar. Se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha FÉ!"

Tião Carreiro

Resumo

VETORE-NETO, A. **Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae).** 2015. 162f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diversas espécies de Passifloras já foram estudadas visando as atividades ansiolítica, anti-inflamatória e cicatrizante com ênfase para *P. alata* Curtis e *P. edulis* Sims. Entretanto, não se encontraram estudos farmacológicos envolvendo *P. setacea* D.C e *P. tenuifila* Killip; os estudos referentes a estas duas espécies restringem-se ao campo agrônomo e fitoquímico. No presente trabalho foram estudadas a eficácia e segurança destas duas espécies de *Passiflora*, provenientes do Cerrado. Avaliou-se a atividade antiúlcera aguda, utilizando o modelo de indução por etanol acidificado. *P. setacea* apresentou áreas relativas de lesão de 11,64%, 2,39%**, 0,43%**, respectivamente, para as doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg e *P. tenuifila*, de 16,44%, 12,42%, 10,84 , para as doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg (** $p \leq 0,01$ em relação ao controle negativo, ANOVA seguida de Tukey). Como *P. setacea* foi a espécie que apresentou melhores resultados no ensaio antiúlcera agudo, ela foi eleita para dar continuidade aos demais ensaios. O teor de flavonoides presentes no extrato bruto de *P. setacea* foi de 3,10 mg por g de extrato, através da metodologia do AlCl_3 . A quantificação de compostos polifenólicos totais presentes no extrato de *P. setacea* foi realizada utilizando o método do reagente de Folin-Dennis e obteve-se 27,05 mg de compostos polifenólicos por grama de extrato. Avaliou-se a atividade antioxidante do extrato bruto de *P. setacea* pelo método do DPPH radical, utilizando Trolox® como substância de referência, obteve-se 11,65 μmol de Trolox® por grama de extrato. Determinou-se o perfil cromatográfico do extrato de *P. setacea*, através de cromatografia líquida de alta eficiência. O cromatograma apontou a presença de compostos flavonoídicos. Avaliou-se potencial mutagênico do extrato bruto de *P. setacea* segundo o teste de Ames, e não se observaram-se sinais de mutagenicidade. A atividade anti *Helicobacter pylori* foi avaliada em modelo *in vitro* e obteve-se concentração inibitória mínima de 250 $\mu\text{g/mL}$. A toxicidade do extrato de *P. setacea* também foi avaliada, através de ensaios agudo e sub-agudo. No ensaio agudo utilizou-se o modelo de administração de dose única de 2000mg/kg por animal e observação por 14 dias de sinais e sintomas que indicassem uma possível intoxicação, durante e ao final do experimento. Ao se necropsiar os animais, não se notou nenhum sinal que apontasse para toxicidade nos animais. No ensaio de toxicidade subaguda, utilizou-se o modelo de administração reiterada do extrato de *P. setacea* aos animais por 28 dias em três doses (1200, 800 e 400mg/kg) e um grupo controle (água). Durante o experimento não se observou nenhum indício de intoxicação nos animais. Ao final do experimento houve coleta de sangue e posterior necropsia para coleta de órgãos. Nas análises hematológicas e bioquímicas, não se observou diferença significativa entre os grupos que receberam extrato e o grupo controle. Em relação aos órgãos coletados, macroscopicamente não se observou diferença entre os grupos tratados e controle. Conclui-se que *P. setacea* apresenta atividade antiúlcera bastante promissora em ratos, atividade antioxidante, que pode ser devida à presença de

flavonoides e compostos polifenólicos. Apresenta atividade anti *H. pylori in vitro* e não apresenta toxicidade, nem potencial de mutagenicidade *in vitro*.

Palavras-chave: antiúlcera – *Passiflora* – flavonoide – polifenol - antioxidante

Abstract

VETORE-NETO, A. **Evaluation of anti-ulcer activity and security of use of *Passiflora setacea* (Passifloraceae) and *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae).** 2015 162f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Several species of *Passiflora* have been tested to anxiolytic activity, anti-inflammatory and healing, mainly with emphasis on *P. alata* Curtis and *P. edulis* Sims. However, there are pharmacological studies involving *P. setacea* D.C and *P. tenuifila* Killip. Studies based on these two species are restricted to agronomic and phytochemical field. In the present work, we evaluate the efficacy and safety of these two species of *Passiflora*, that are native from Cerrado. We evaluated the acute anti-ulcer activity, using acidified ethanol induction model. *P. setacea* presented relative lesion areas of injury 11.64%, 2.39% ** and ** 0.43%, respectively, at doses of 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg and for *P. tenuifila*, 16.44%, 12.42%, 10.84%, respectively, at doses of 100mg / kg, 200mg / kg, 400mg / kg (** p ≤ 0,01 compared to negative control, ANOVA followed by Tukey). As *P. setacea* was the species that showed better results in acute anti-ulcer test, it was elected to be used on the continue to the other tests. The flavonoid content in the crude extract was 3,10 mg per g of *P. setacea* extract using AlCl₃ method. Total polyphenolic content was determined by Folin Dennis method yielding 27.05 mg of phenolics per g of dried extract. Antioxidant activity of the crude extract was evaluated by DPPH radical method, using Trolox as reference, each g of crude extract equivalated of 11.65 µg of Trolox. *P. setacea* chromatographic profile was determined using High Performance Liquid Chromatography. The chromatogram showed the presence of flavonoid compounds. Mutagenic potential of *P. setacea* crude extract was evaluated using Ames test. No signs of mutagenicity were observed. Anti *Helicobacter pylori* activity was evaluated in vitro model and yielding Minimum Inhibitory Concentration of 250 µg / ml. Toxicity of *P. setacea* extract was also evaluated through acute and sub-acute tests. Acute test was performed using a single dose of 2000 mg/kg orally given to each animal. Toxicity signs and symptoms were recorded for 14 days, during and after the experiment. After necropsy, no toxicity signs were shown. Subacute test was performed using the repeated doses model. *P. setacea* extract was orally given to animals for 28 days in three doses, control received water. No toxicity signs were shown during the experiment. At the endpoint, blood was collected and necropsy was performed to collect the organs. No significant difference was observed between test and control regarding hematological and biochemical analysis In conclusion, *P. setacea* shows promising antiulcer activity in rats. Also, its antioxidant activity may be related to the presence of flavonoids and phenolics. Additionally, it presented anti *H. pylori* activity in vitro and did not show toxicity, neither mutagenic potential in vitro.

Keywords: antiulcer - *Passiflora* - flavonoid – polifenol - antioxidant

Lista de Figuras

Figura 1. Alcalóides β -carbolínicos encontrados em <i>Passiflora</i>	37
Figura 2. Exemplos de flavonoides encontrados em espécies de <i>Passiflora</i>	38
Figura 3. Visão macroscópica do estômago humano. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.....	57
Figura 4. Esquema do arranjo estrutural das glândulas gástricas. Adaptado: SCHUBERT; PEURA, 2008.....	59
Figura 5. Regulação fisiológica da secreção gástrica. A figura mostra interações entre uma célula semelhante às células enterocromafins (ECL) que libera histamina, uma célula parietal (que secreta ácido) e uma célula epitelial superficial secretora de muco e bicarbonato. As vias fisiológicas (setas em negrito) podem ser estimuladoras (+) ou inibidoras (-). 1 e 3 indicam possíveis influxos de fibras colinérgicas pós-ganglionares, enquanto 2 mostra o influxo neural do nervo vago sobre uma célula ganglionar (CG) do sistema nervoso entérico. Os agonistas fisiológicos e seus respectivos receptores incluem: receptores de acetilcolina (ACh), muscarínicos (M) e nicotínicos (N); gastrina, receptor de colecistocinina 2 (CCK₂); histamina (HIST), receptor H₂ , e prostaglandinas E₂ e I₂ (PGE₂ , PGI₂), receptor EP₃ . A secreção ácida envolve uma bomba de prótons (P), que é uma $H^+/K^+ATPase$, um cotransportador (C) de K^+ e Cl^- e um antitransportador (A) que troca Cl^- e HCO_3^- . Adaptado de BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006 e HERNANDES, 2010.....	61
Figura 6. Esquema da fisiopatologia da úlcera péptica. Adaptado de KUMAR; ABBA; FAUSTO, 2005 e HERNANDES, 2010.....	63
Figura 7. Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (HATANAKA e CURI, 2007).	67
Figura 8. Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio. (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).	83
Figura 9. Reação de redução do radical 2,2- difenil-1-picril hidrazila (DPPH) por compostos fenólicos (ROH) (MOLYNEUX; 2004).....	86
Figura 10. CCD do extrato bruto (A), frações de n-hexano(B), clorofórmio(C), acetato de etila(D) e hidroetanólica(E) do EHEL de <i>P. setacea</i> e do extrato bruto (F), frações de n-hexano(G), clorofórmio(H), hidroetanólica (I) e acetato de etila (J) do EHEL de <i>P. tenuifila</i> ; Rutina (K) e Quercetina (L) como padrão. FE: água, suporte: Silica gel G, distância: 14cm, revelador: NP, visualização UV 366nm. Fase móvel: Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético Glacial + Água (120:11:11:07).....	96

Figura 11. Cromatograma do EHEL de <i>P.setacea</i> (1mg/mL). Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H ₂ O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos.....	97
Figura 12. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do EHEL de <i>P.setacea</i> . Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H ₂ O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos.	97
Figura 13. Cromatograma da fração hidroetanólica (1mg/mL) obtida a partir do EHEL de <i>P.setacea</i> . Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H ₂ O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos	98
Figura 14: Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlceras empregando EHEL de <i>P. setacea</i> , e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico(1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o percentual de área ulcerada e as abscissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação à água. (ANOVA seguida de Tukey).	99
Figura 15. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlceras empregando EHEL de <i>P. tenuifila</i> , e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico (1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o percentual de área ulcerada e as abscissas os grupos componentes do ensaio.....	99
Figura 16. Curva de calibração da quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato bruto <i>P.setacea</i>	99
Figura 17. Curva de calibração do ácido gálico, utilizada para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato bruto de <i>P.setacea</i>	102
Figura 18. Curva de calibração da porcentagem de descoloração da solução de DPPH referente à concentração do padrão externo Trolox®	103

Figura 19. Consumo médio de ração pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de <i>P.setacea</i> , sendo que as ordenadas representam o consumo médio de ração médio por animal (gramas) durante 48 horas e as abcissas os dias que foram medidos.....	104
Figura 20. Consumo médio de água pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de <i>P.setacea</i> , sendo que as ordenadas representam o volume médio (Mililitros) de água consumida por animal em 48 horas e as abcissas os dias que foram medidos.....	105
Figura 21. Variação média de peso pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de <i>P.setacea</i> , sendo que as ordenadas representam o peso médio dos animais (gramas) a cada 48 horas e as abcissas os dias em que foram pesados.....	106
Figura 22. Pesos relativos dos órgãos coletados ao final do experimento dos grupos, tratado e controle, sendo que as ordenadas representam o percentual dos pesos relativo seguidos do erro padrão e as abcissas os grupos componentes do ensaio. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.....	107
Figura 23. Concentração média de albumina dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de albumina (g/dL) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey) F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).....	109
Figura 24. Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de ALT (U/L) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01 em relação ao controle . (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).....	111

Figura 25. Concentração média de creatinina dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de creatinina (mg/dL) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * p<0,05 em relação ao controle; (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle)..... 112

Figura 26. Concentração média de GGT dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de GGT (U/L) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. *** p<0,001 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle)..... 113

Figura 27. Concentração média de GGT dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de GGT (U/L) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. *** p<0,001 em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle)..... 114

Figura 28. Hematócrito médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o hematócrito médio (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle). 116

Figura 29. MCHC médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o MCHC médio (g/dL) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle)..... 117

Figura 30: MCV médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o MCV médio (μm^3) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

118

Figura 31. Concentração média de hemoglobina dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a média de hemoglobina (g/dL) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle)..

119

Figura 32. Número médio de plaquetas por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o número médio de plaquetas por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

120

Figura 33. Porcentagem média de linfócitos dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a porcentagem média de linfócitos (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

122

Figura 34. Número médio de linfócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o número médio de linfócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

123

Figura 35. Porcentagem média de leucócitos segmentados dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a porcentagem média de leucócitos segmentados (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

123

Figura 36. Peso relativo médio do baço dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do baço (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).....

125

Figura 37. Peso relativo médio do fígado dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do fígado (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).....

126

Figura 38. Peso relativo médio do fígado dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do fígado (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).....

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de fármacos utilizados no tratamento de úlcera péptica, suas respectivas estruturas e classificação segundo mecanismo de ação.....	72
Tabela 2: Composição do meio reacional no ensaio de determinação da atividade antioxidante de extrato bruto de <i>P.setacea</i> com DPPH.....	86
Tabela 3: Fracionamento de extrato bruto liofilizado de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setácea</i>	94
Tabela 4: Triagem fitoquímica de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	95
Tabela 5. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHCL de <i>P.setacea</i> , e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico(1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação à água. (ANOVA seguida de Tukey).....	99
Tabela 6. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHCL de <i>P. tenuifila</i> , e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico(1ml/100g de massa corpórea) .Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. ** p<0,01; *** p<0,001. (ANOVA seguida de Tukey) em relação à água.....	100
Tabela 7. Quantificação de flavonoides totais utilizando AlCl ₃ como agente complexante. Os resultados de flavonoides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.....	101
Tabela 8. Quantificação de substâncias fenólicas utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do seu erro-padrão.....	102
Tabela 9. Consumo médio de ração pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHCL de <i>P.setacea</i>	105
Tabela 10. Consumo médio de água pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHCL de <i>P.setacea</i>	106
Tabela 11. Variação média de peso pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda de <i>P.setacea</i>	107
Tabela 12. Pesos relativos dos órgãos dos grupos componentes do ensaio empregando <i>P. setacea</i>	108

Tabela 13. Concentração média de albumina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. ** p<0,01 em relação ao controle.(ANOVA seguida de Tukey).....	109
Tabela 14. Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	110
Tabela 15. Concentração média de creatinina (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	111
Tabela 16. Concentração média de GGT (Gama-glutamil transferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. *** p<0,001 em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).....	112
Tabela 17. Concentração média de GGT (Gama-glutamil transferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. *** p<0,001 em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).....	113
Tabela 18. Hematócrito médio (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. ** p<0,01 em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).....	115
Tabela 19. MCHC médio (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	116
Tabela 20. MCV médio (μm^3) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).....	117

Tabela 21. Concentração média de hemoglobina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	118
Tabela 22. Número médio de plaquetas por mm ³ de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	119
Tabela 23. Porcentagem média de linfócitos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	120
Tabela 24. Número médio de linfócitos por mm ³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	122
Tabela 25. Porcentagem média de leucócitos segmentados (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	123
Tabela 26: Peso relativo médio de baço (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	124
Tabela 27. Peso relativo médio de fígado (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).....	125
Tabela 28. Peso relativo médio de fígado (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL <i>P.setacea</i> por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. ** p<0,01 (ANOVA seguida de Tukey).....	126

Tabela 29. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato bruto de <i>P.setacea</i> e controle com amoxicilina no ensaio de avaliação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i>	127
Tabela 30. Atividade mutagência expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o razão de mutagenicidade (RM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA97a de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com <i>Passiflora setacea</i> , em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica	128
Tabela 31. Atividade mutagência expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o razão de mutagenicidade (RM - valor entre parênteses) nas linhagens TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com <i>Passiflora setacea</i> , em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	129

Lista de abreviaturas

µg: Micrograma

Ach: Acetil colina

AINE: Anti inflamatório não esteroideal

AlCl₃: Cloreto de alumínio

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato amino transferase

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCK2: Colecistocinina tipo 2

CE₅₀: Concentração efetiva 50%

CG: Célula ganglionar

CIM: Concentração inibitória mínima

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DE₅₀: Dose efetiva 50%

DF: Distrito Federal

DL₅₀: Dose letal 50%

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picril hidrazila

ECL: Células enterocromafins

EHEL: extrato hidroetanólico liofilizado (Extrato bruto)

EUA: Estados Unidos da América

FCF- USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FE: Fase estacionária

GABA: Ácido gama aminobutírico

GGT: Gama glutamil transferase

GSH: Glutathione

H.pylori: Helicobacter pylori

H₂O: Água

HAM: Hamilton Rating Scale of Depression

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IL: Interleucina

Km: Quilômetro

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

m/v: Relação massa volume

M $\pm$ DV: Média $\pm$ Desvio Padrão

MCH: Hemoglobina globular média

MCHC: Concentração de hemoglobina globular média

MCV: Volume globular médio

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mm: Milímetro

°C: Graus Celsius

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

P. alata: Passiflora alata

P.edulis: Passiflora edulis

P.nitida: Passiflora nítida

P.serratodigitata: Passiflora serratodigitata

PDGF: Fator de crescimento de plaquetas

PG: Prostaglandina

RM: Razão de mutagenicidade

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SO₂: Dióxido de enxofre

TE: Equivalentes em Trolox®

TGF-β: Fator de crescimento transformante beta

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa

TRPV-1: Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1

UFC: Unidade formadora de colônia

VEGF-α: Fator de crescimento endotelial vascular alfa

Sumário

1. Introdução.....	29
2. Revisão da Literatura.....	33
2.1. Gênero <i>Passiflora</i>	34
2.1.1. Aspectos químicos das principais espécies de <i>Passiflora</i>	34
2.1.1.1. Alcaloides.....	36
2.1.1.2. Flavonoides.....	37
2.1.1.3. Outros constituintes.....	38
2.1.2. Principais usos, atividades farmacológicas e ações biológicas.....	39
2.1.2.1. Atividade ansiolítica.....	39
2.1.2.2. Demais atividades sobre o sistema nervoso central.....	43
2.1.2.3. Atividade antioxidante.....	44
2.1.2.4. Atividade antimicrobiana.....	46
2.1.2.5. Atividade antiviral.....	47
2.1.2.6. Atividade anti-inflamatória e cicatrizante.....	48
2.1.2.7. Atividade antitumoral.....	49
2.1.2.8. Outras atividades farmacológicas.....	50
2.1.2.9. Segurança de uso e toxicidade.....	54
2.2. <i>Passiflora setacea</i> D.C e <i>Passiflora tenuifila</i> Killip.....	56
2.3. Estrutura do estômago.....	57
2.4. Fisiologia da secreção gástrica.....	57
2.5. Úlcera péptica.....	60
2.6. O processo de cicatrização.....	65
2.7. Terapêutica da úlcera péptica.....	69
3. Justificativa.....	74
4. Objetivos.....	76
5. Metodologia.....	78

5.1.	Preparo de extratos secos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i> e suas frações.....	79
5.2.	Triagem fitoquímica.....	79
5.3.	Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto e frações de <i>P.setacea</i> e <i>P.tenuifila</i>	80
5.4.	Avaliação da atividade antiúlcera aguda dos extratos brutos de <i>P.setacea</i> e <i>P.tenuifila</i>	81
5.5.	Quantificação de flavonoides no extrato bruto de <i>P.setacea</i>	82
5.6.	Quantificação de substâncias fenólicas no extrato bruto de <i>P.setacea</i>	83
5.7.	Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	84
5.8.	Avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	86
5.9.	Avaliação da toxicidade de administração reiterada durante 28 dias do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	86
5.10.	Avaliação da atividade anti <i>Helicobacter pylori</i> do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	87
5.11.	Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	88
6.	Resultados	91
6.1.	Rendimento dos extratos secos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i> e de suas frações.....	92
6.2.	Triagem fitoquímica.....	92
6.3.	Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto e frações de <i>P.setacea</i> e <i>P.tenuifila</i>	93

6.4.	Avaliação da atividade antiúlcera aguda dos extratos brutos de <i>P.setacea</i> e <i>P.tenuifila</i>	96
6.5.	Quantificação de flavonoides no extrato bruto de <i>P.setacea</i>	99
6.6.	Quantificação de substancias fenólicas no extrato bruto de <i>P.setacea</i>	99
6.7.	Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	100
6.8.	Avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	101
6.9.	Avaliação da toxicidade de administração reiterada durante 28 dias do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	106
6.9.1.	Testes bioquímicos.....	106
6.9.2.	Testes hematológicos.....	112
6.9.3.	Pesos relativos dos órgãos.....	122
6.10.	Avaliação da atividade anti <i>Helicobacter pylori</i> do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	125
6.11.	Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de <i>P.setacea</i>	126
7.	Discussão.....	128
8.	Conclusão.....	136
9.	Referências Bibliográficas.....	138
10.	Anexos.....	160

INTRODUÇÃO

1.Introdução

Data de mais de seis milênios o uso de plantas medicinais pelo homem (GOSSELL-WILLIAM; SIMON; WEST, 2006; MUTHU et al., 2006). Graças aos estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos, é possível identificar as espécies vegetais utilizadas com fins medicinais pela população. Em diversos casos os usos não possuem comprovação científica, sendo os estudos de primordial papel para a eleição das espécies a serem estudadas terapeuticamente (ARAUJO et al., 2008). O emprego das plantas na medicina popular brasileira tem sua origem nos índios com contribuição da posterior chegada das diferentes etnias como, por exemplo, imigrantes europeus e negros (REZENDE; COCCO, 2002). Um dos fatores que mais chamam atenção para a pesquisa envolvendo plantas medicinais é o alto número de metabólitos, podendo se tratar de importantes moléculas bioativas (Mc GUIRE, 2001; PINK et al., 2005)

O Brasil é um país de território extremamente extenso e possui uma das maiores biodiversidades vegetais do planeta; devido à amplitude territorial e à localização próxima do Equador, pode-se encontrar em sua extensão diferentes biomas, como a Amazônia, o Cerrado e o Pantanal (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). A Mata Atlântica é o bioma detentor da maior biodiversidade brasileira, sendo que o mesmo está arriscado de desaparecimento visto que sua área atual figura menos de 10% da área original, antes da chegada dos colonizadores europeus no século XVI. O cerrado é um bioma de extrema importância, uma vez que possui uma altíssima biodiversidade vegetal e animal e também encontra-se em risco de desaparecimento, pois a cada ano aumentam os incêndios criminosos e áreas destruídas pelo desmatamento desse bioma brasileiro. (MORELLATO & HADDAD, 2000; KRESS et al., 1998).

Muitos países, além do Brasil, tem tradicional emprego das plantas medicinais na medicina. Em torno de 70% da população de países em ascensão econômica faz uso da medicina tradicional e, na maior parte das vezes, utiliza produtos à base de plantas medicinais, no tratamento ou prevenção de doenças. A mesma tendência ao uso das plantas medicinais também pode ser observada em países ditos

desenvolvidos como, por exemplo, França, Canadá e Alemanha (ROBINSON e ZHANG, 2011).

A identificação de muitos compostos farmacologicamente ativos ao longo da história se deu graças ao elevado número de estudos envolvendo espécies vegetais utilizadas tradicionalmente pela população (Mc GUIRE, 2001; PINK et al., 2005). Diversos compostos foram isolados e deram origem a fármacos largamente empregados na terapêutica até os dias de hoje, bons exemplos são, a digoxina (isolada das folhas de *Digitalis lanata* Ehrhart.), a morfina (proveniente dos frutos imaturos *Papaver somniferum* L.), dentre outros (MAHMMOUD, 2007; MEDEIROS et al., 2007; Mc GUIRE, 2001; PINK et al., 2005). Cerca de um terço das moléculas identificadas como promissoras para o tratamento de enfermidades nas décadas de 80 e 90 são produtos naturais ou derivações dos mesmos, além do fato de que 20% das novas moléculas são produtos sintetizados que mimetizam as estruturas encontradas na natureza. Em contrapartida, constata-se que por diversas vezes a presença concomitante de vários compostos em um extrato vegetal possui uma atividade farmacológica mais pronunciada, comparativamente ao composto isolado (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BALUNAS & KINGHORN, 2005).

A regulamentação de medicamentos fitoterápicos ainda é bastante recente, quando comparada ao tempo em que as plantas medicinais são utilizadas pelo homem. Em diversas localidades do planeta ainda faz-se o uso de medicamentos fitoterápicos de modo ilegal. Existem, entretanto, países que estão bastante empenhados em adotar medidas para a regulamentação destes medicamentos como, por exemplo, Arábia Saudita, China, Noruega e Brasil. A União Europeia está implantando metodologias para a regulamentação dos padrões de qualidade de fitoterápicos para que os mesmos possam ser registrados e, conseqüentemente, comercializados. Com iniciativas como a da União Europeia o mercado de fitoterápicos tenderá a avançar mais expressivamente já que os mesmos serão padronizados e oferecerão maior segurança e eficácia ao paciente que fizer seu uso (ROBINSON e ZHANG, 2011).

A família *Passifloraceae* destaca-se entre os principais grupos vegetais nativos utilizados na medicina popular brasileira (CARLINI, 2003, DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Ela é representada por aproximadamente 23 gêneros e

600 espécies distribuídas majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais (DERMARDEROSIAN e BEUTLER, 2002), sendo que 120 dessas espécies ocorrem no Brasil e 38 apenas no Estado de São Paulo (BERNACCI, 2003). O gênero *Passiflora* compreende cerca de 400 espécies, sendo o mais importante da família *Passifloraceae*. Suas espécies apresentam hábito escandente, folhas alternas, estípulas, gavinhas, nectários extraflorais e corola composta de uma ou várias séries de filamentos ou lobos no ápice do hipanto (JUDD, 1999; PLOTZE et al., 2005).

O gênero *Passiflora* foi descrito pela primeira vez por Nicolau Monardis em 1569 (SOUZA, 1997). O nome popular pelo qual essas espécies são conhecidas (maracujá) é de origem tupi-guarani, e significa “comida feita em cuia”, numa alusão ao formato dos frutos do vegetal. “Maracujá” é empregado para designar diversas espécies de *Passiflora* cultivadas por seu valor ornamental, por suas propriedades medicinais ou, mais destacadamente, pelos frutos apreciados na alimentação, como por exemplo a *Passiflora edulis Sims* forma *flavicarpa* Deg, conhecida por maracujá-amarelo (SALOMÃO, 1980; FREITAS, 2006).

O principal e mais tradicional uso de *Passiflora* é em relação à atividade hipnótica-ansiolítica, entretanto há relatos de diversos outros usos populares de *Passiflora* como antiespasmódico, em casos de distúrbios gastrintestinais (DUKE, 2002; MAHADY et al., 2005), em casos de insônia e histeria (KRUGER, 1992; GARCIA, 2000), como hipnótico leve (SCAVONE e PANIZZA, 1978), em casos de hipertensão arterial (GRIEVE e LEYEL, 1994), miorrelaxante (GARCIA, 2000), em casos de asma, diarreia e convulsão em crianças (BALBACHAS, 1957), no tratamento de Mal de Parkinson (DUKE, 1997) Além dois usos já citados, segundo LADE et. al. 2014, há relatos na literatura de uso de *Passiflora* como antibacteriano, em casos de queimaduras de pele, câncer, dor crônica, tosse, tratamento de toxicodependentes, tratamento de infecção por vírus Epstein-Barr, infecções micóticas e infecção por *Helicobacter pylori*, desconforto gastrointestinal (estômago nervoso), sintomas da menopausa e dores nervosas.

A úlcera péptica é uma enfermidade com uma importância global devido à sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e alta morbidade (BUCCIARELLI et al., 2010; MALFERTHEINER; CHAN; McCOOL, 2009). Sua prevenção e cura são um

dos mais importantes desafios da medicina, já que trata-se de uma doença de ocorrência mundial (CALAM e BARON, 2001; SUNG, KUIPERS, EL-SERAG, 2009).

Estima-se que entre a população dos EUA de 6% a 14% dos homens e de 2% a 6% das mulheres tenham úlcera péptica (KUMAR et al., 2008). Segundo LIN e colaboradores, no período de 1980-2009 a taxa de incidência mundial, de úlceras pépticas sem complicações é de cerca de 1 caso para 1000 pessoas ao ano. Em relação às úlceras que apresentam maiores complicações, como por exemplo sangramento e perfurações a incidência é de 0,7 caso para cada 1000 pessoas-ano. (LIN; GARCÍA-RODRIGUES; HERNÁNDES-DIAZ, 2011)

Dessa maneira, este estudo visou contribuir para a busca de uma nova terapêutica através do estudo das espécies vegetais *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifolia* Killip (Passifloraceae), buscando encontrar uma terapia com mais efetividade e segurança do que as já existentes.

REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da Literatura

2.1. Gênero *Passiflora*

A introdução de plantas do gênero *Passiflora* na terapêutica iniciou-se em 1867 por Phares, pesquisando *Passiflora incarnata* devido à sua ação calmante em casos de insônia e irritabilidade (BENIGNI; CAPRA; COTTORINI, 1964). CAMINHOÁ (1877) relata o uso de folhas de espécies de *Passiflora*, na forma de decocto, no tratamento de gota. O suco era utilizado como febrífugo e as raízes como vermífugas. CORREA (1984) menciona o emprego de folhas de maracujá no combate às febres intermitentes, inflamações cutâneas e erisipela. Citam-se ainda as propriedades diaforéticas, anti-histéricas e anti-histamínicas. Este autor relata a presença de uma substância semelhante à morfina, denominada passiflorina, indicada como calmante.

A Farmacopéia Brasileira, em sua 1ª edição, oficializou as folhas de *Passiflora alata* Curtis, embora outras espécies deste gênero encontrem emprego na fitoterapia, entre elas *Passiflora edulis* Sims. *Passiflora incarnata*, é a que possui mais monografias inscritas em compêndios oficiais. Os produtos dela derivados são reconhecidos internacionalmente como medicamentos fitoterápicos (MORAES, 1995; SOUZA e ORTEGA, 1997; DERMARDEROSIAN e BEUTLER, 2002; PLOTZE et al., 2005; CARLINI, 2003). MIRODDI e colaboradores em seu trabalho de revisão chamam atenção para os usos, a aplicação clínica, a segurança e avaliação de ensaios clínicos envolvendo *Passiflora incarnata* (MIRODDI et al, 2013)

2.1.1. Aspectos químicos das principais espécies do gênero *Passiflora*

Do ponto de vista fitoquímico, o gênero *Passiflora* caracteriza-se principalmente pela presença de flavonoides, alcaloides e glicosídeos cianogênicos. O interesse farmacêutico no perfil fitoquímico do gênero *Passiflora* varia muito, embora as duas classes mais estudadas sejam alcaloides e flavonoides (BOKSTALLER e SCHMIDT, 1997; ABOURASHED; VANDERPLANCK; KHAN,

2003). Os flavonoides têm notável papel de substâncias marcadoras na análise de medicamentos fitoterápicos compostos por *Passiflora* visto que os mesmos são encontrados em diversas partes dos vegetais (principalmente em folhas e frutos), e geralmente são do tipo flavonas glicosiladas ou antocianinas. Já os alcaloides, geralmente do tipo harmânico, são encontrados em folhas e caules. Isolou-se também, em espécies do gênero *Passiflora*, glicosídeos cianogênicos, compostos voláteis, saponinas, carotenóides, compostos de interesse nutricional (aminoácidos, vitaminas, minerais, fibras), encontrados principalmente no fruto e na semente (ZIBADI et al., 2007).

Até os anos sessenta do século XX, o enfoque dos estudos envolvendo *Passiflora* era a investigação da presença de alcaloides indólicos do tipo harmânico; sua farmacologia foi alvo de interesse desde o início do século e vários efeitos farmacológicos como alucinações, tremores e convulsões crônicas, inibição da monoamino oxidase, propriedades estimulantes, anti-helmíntica, antitripanosômica e antileishmania foram descritos (BARROSO, 1978; SACCO, 1980).

No transcorrer dos anos houve uma modificação de enfoque rumo ao estudo de compostos de natureza flavonoídica. LUTOMSKI, em 1959, foi o primeiro autor que atribuiu a estas substâncias, a atividade sedativa de *Passiflora* e chamou atenção para a importância da presença concomitante das classes alcaloídica e flavonoídica na eficiência do resultado terapêutico. O flavonoide vitexina, testado isoladamente por PRABHAKAR em 1981, apresentou efeitos anti-hipertensivo, anti-inflamatório e antiespasmódico. Os flavonoides 2"-O-xilosilvitexina e 2-vicenina, encontrados respectivamente, em *Passiflora alata* e em *Passiflora incarnata*, mostraram acentuada atividade anti-hipertensiva quando isolados de espécies pertencentes ao gênero *Citrus*. A presença destes compostos poderia, até certo ponto, justificar a atividade anti-hipertensiva encontrada em algumas pesquisas (PEREIRA, 2000).

Com o aprimoramento das técnicas de fracionamento e identificação de moléculas, tem sido possível melhorar o conhecimento da composição fitoquímica das espécies. Os primeiros estudos com relação aos flavonoides em *Passiflora* datam da década de sessenta, quando foi estudada principalmente a espécie *Passiflora incarnata*, que é até hoje a mais largamente estudada. As folhas de

Passiflora alata contêm C-glicosilflavonóides, rutina, alcalóide harmano e glicosídeos esteroidais e triterpênicos. Segundo BRUNETON (2009), as folhas de *Passiflora incarnata* contêm ácidos fenólicos, fitoesteróis, óleo essencial, glicosídeos cianogênicos (ginocardina), maltol e traços de alcalóides indólicos (harmano, harmina e harmol).

2.1.1.1. Alcalóides

Os alcalóides comumente isolados em espécies do gênero *Passiflora* são do tipo indólico. Diversos alcaloides do tipo indólico tem tradicional emprego como tranqüilizantes e anti-hipertensivos. *Passiflora incarnata* é a espécie mais amplamente estudada no gênero em relação à composição alcaloídica. Harmana, harmol, harmina, harmalol e harmalina foram identificadas em suas folhas em estudos realizados nos anos 60.

Em estudos posteriores até meados dos anos 1990, entretanto, somente traços de harmana ou até mesmo nenhum alcaloide foi identificado em *Passiflora incarnata* (REHWALD, 1995). No início do século XXI essa questão dos alcaloides hamânicos voltou a ser estudada e segundo PEREIRA (2000), uma explicação plausível para tais contradições encontradas na literatura e o estudo de 1995 de REHWALD é o fato de podem ter sido empregadas diferentes metodologias para a identificação dos alcaloides e algumas dessas metodologias não foram capazes de identificar sua presença em baixas concentrações. Além de que pode-se levar em conta diversos vieses como por exemplo: variação do teor alcaloídico em diferentes drogas vegetais, os órgãos empregados para a obtenção da droga vegetal, a qualidade da droga vegetal, a época e local de colheita. Considerando-se que a droga, comercialmente utilizada, é representada pelas partes aéreas de *Passiflora incarnata*; a variação na proporção folhas em relação ao caule também pode levar a uma diferença expressiva do teor alcaloídico (PEREIRA, 2000). Exemplos de alcalóides podem ser observados na Figura 1.

Harmana R = H

Harmalol R = OH

Harmol R = OH

Harmalina R = OCH₃Harmina R = OCH₃

Figura 1. Alcalóides β -carbolínicos encontrados em *Passiflora*.

2.1.1.2. Flavonóides

Os flavonoides isolados de *Passiflora incarnata* são derivados da apigenina e luteolina, e observou-se no início dos anos oitenta que a constituição era bem mais complexa do que foi observado em estudos anteriores feitos nos anos sessenta e setenta (BRUNETON, 2009). O teor flavonoídico da droga, constituída de folhas e caules, de *Passiflora incarnata* é aproximadamente 2,5%, visto que se pode citar como majoritários os seguintes compostos: flavonas di-C-glicosídeos (shaftosídeo e isoshaftosídeo), 2''-O-glicosídeos provenientes de isovitexina, iso-orientina, swertisina e lucenina-2 (DHAWAN; DHAWN; SHARMA, 2004; MIRODDI et al., 2013.). Exemplos de flavonóides encontrados em *Passiflora*, estão representados na Figura 2.

Orientina $R_1 = H$ $R_2 = \text{glicose}$ $R_3 = OH$

Iso-orientina $R_1 = \text{glicose}$ $R_2 = H$ $R_3 = OH$

Vitexina $R_1 = H$ $R_2 = \text{glicose}$ $R_3 = H$

Isovitexina $R_1 = \text{glicose}$ $R_2 = H$ $R_3 = H$

Figura 2. Exemplos de flavonoides encontrados em espécies de *Passiflora*.

Sob a luz dos estudos mais recentes, sabe-se que além da apigenina e da luteolina, pode-se encontrar em *Passiflora incarnata* outros compostos: quercetina, canferol, 6- β -D-glicopiranosil-8- β -xilopiranosilapigenina; flavonoides C-glicosídeos como vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina, schaftosídeo, isochaftosídeo, isovitexina-2''-O- β -glicopiranosídeo, iso-orientina-2''-O-glicopiranosídeo, 2-glicosilapigenina, isoscoparina-2''-O-glicosídeo, 2''-O-glicosil-6-C-glicosilapigenina, 6- β -D-glicopiranosil-8- β -D-ribopiranosilapigenina e swertisina (DHAWAN; DHAWN; SHARMA, 2004, MIRODDI et al, 2013)

2.1.1.3. Outros constituintes

Diversos outros constituintes tem tido sua presença relatada em espécies de *Passiflora*, alguns exemplos são:

- maltol,
- derivados de γ -benzopirona,
- carboidratos tais como rafinose, sacarose, D-glicose e D-frutose;

- óleo essencial contendo hexanol, álcool benzílico, linalol, 2-feniletilálcool, éster do ácido metil-2-hidroxibenzóico, carvona, trans-anetol, eugenol, isoeugenol, β -ionona, α -bergamotol, fitol e um glicosídeo cianogênico derivado da ginocardina.
- Constituintes que conferem o odor característico às *Passifloras*, como o limoneno, cumeno, α -pineno, prezizaeno, zizaeno e zizaneno; (DHAWAN et al., 2004; MIRODDI et al, 2013).

2.1.2. Principais usos, atividades farmacológicas e ações biológicas

O principal e mais tradicional uso de *Passiflora* é em relação à atividade hipnótica-ansiolítica, entretanto há relatos de diversos outros usos populares de *Passiflora* como antiespasmódico, em casos de distúrbios gastrintestinais (DUKE, 2002; MAHADY et al., 2005), em casos de insônia e histeria (KRUGER, 1992; GARCIA, 2000), como hipnótico leve (SCAVONE & PANIZZA, 1978), em casos de hipertensão arterial (GRIEVE e LEYEL, 1994), miorrelaxante (GARCIA, 2000), em casos de asma, diarreia e convulsão em crianças (BALBACHAS, 1957), no tratamento de Mal de Parkinson (DUKE, 1997).

Além dos usos já citados, segundo LADE e colaboradores (2014), há relatos na literatura de uso de *Passiflora* como antibacteriano, em casos de queimaduras de pele, câncer, dor crônica, tosse, tratamento de toxicodependentes, tratamento de infecção por vírus Epstein-Barr, infecções micóticas e infecção por *Helicobacter pylori*, desconforto gastrointestinal (estômago nervoso), sintomas da menopausa (síndrome do climatério) e dores nervosas.

2.1.2.1. Atividade ansiolítica

Os primeiros estudos que investigaram a atividade ansiolítica de extratos de *Passiflora* iniciaram-se em 1940, quando RUGGY e SMITH (1940) isolaram de *Passiflora incarnata* uma substância, que denominaram de “o princípio fisiologicamente ativo de *Passiflora incarnata*”. Os autores observaram que tanto o princípio ativo como o extrato fluido apresentavam ação sedativa

No final da década de quarenta um estudo conduzido por NEUGEBAUER relacionou a atividade sedativa dos extratos de *Passiflora incarnata*, *Passiflora edulis* e *Passiflora bryonioides* à presença de uma substância de caráter alcalino, provavelmente um alcalóide. O estudo apontava que uma das substâncias isoladas de *Passiflora incarnata* que apresentavam atividade sedativa em ratos, era estruturalmente idêntica à maracujina, que fora isolada por PECKOLT (1909) de extratos provenientes de espécies brasileiras de *Passiflora*, entre elas *Passiflora alata*. (NEUGEBAUER, 1949). Além do fato de que o autor sugeriu que essa substância pertencia à mesma família do composto anteriormente obtido por RUGGY e SMITH em 1940 (HEGNAUER, 1990).

AOYAGI e colaboradores em 1974 avaliou as atividades farmacológicas do extrato seco de *Passiflora incarnata*, e isolou maltol (3-hidroxi-2-metil-4-pirona) da fração solúvel em ácido clorídrico. Avaliou-se as atividades farmacológicas do extrato seco, da sua fração solúvel em ácido clorídrico, do maltol e do etilmaltol. Observou-se que a fração solúvel em ácido clorídrico reduziu o consumo de oxigênio do córtex cerebral de ratos. O maltol causou depressão do sistema nervoso central, constatada devido a maior potência de indução do sono por hexabarbital, houve também inibição da atividade motora nos animais e aumento da atividade anticonvulsivante. O etilmaltol, um derivado sintético do maltol, exibiu efeitos bastante parecidos àqueles do maltol, entretanto, a inibição da atividade motora foi menos pronunciada e a atividade anticonvulsivante mais acentuada. (AOYAGI; KIMURA; MURATA, 1974)

ROMMELSPACHER et al., em 1980, estudaram o mecanismo de ação sedativa dos alcaloides β -carbolínicos. Avaliou-se a interação existente entre vários alcaloides β -carbolínicos na ligação específica de [3 H]-flunitrazepam com receptores benzodiazepínicos. Utilizou-se membrana cerebral de rato e retina de bovinos, ambos tecidos contendo altas concentrações de receptores benzodiazepínicos. Diante dos compostos investigados, a harmana e a nor-harmana apresentaram-se como os inibidores mais potentes da ligação específica do [3 H]-flunitrazepam, tendo valores de IC_{50} em concentrações de ordem micromolar. Demais derivados, tais como, harmina, harmalina e vários tetraidro-derivados foram, no mínimo, dez vezes menos potentes. A harmana, era o mais potente inibidor conhecido da ligação específica do [3 H]-flunitrazepam. Sua afinidade com os receptores

benzodiazepínicos exibiu-se centenas de vezes maior que a da inosina e da hipoxantina. Dessa maneira, sugere-se que harmana, ou outros alcalóides β -carbolínicos, poderiam ser candidatos em potencial como ligantes endógenos do receptor benzodiazepínico (ROMMELSPACHER et al., 1980).

OGA e colaboradores em 1984 verificaram que o extrato de folhas de *Passiflora alata* acentuou o sono induzido pelo pentobarbital em ratos, gerou aumento do tempo de latência na convulsão provocada por estricnina e reduziu a atividade motora espontânea.(OGA et al., 1984) O extrato fluido de órgãos aéreos de *Passiflora incarnata*, administrado por gavagem em ratos, aumentou o limiar nociceptivo no teste de *tail-flick* e de placas quentes. Quando administrado por via intraperitoneal, o mesmo extrato aumentou significativamente o tempo de sono, protegeu os animais do efeito convulsivo do pentilenotetrazol e afetou a locomoção. (SPERONI e MINGHETTI, 1988)

Crisina, um composto flavonoídico isolado de *Passiflora caerulea*, foi descrito como um agonista parcial dos receptores benzodiazepínicos, por ter ação ansiolítica sem indução de sedação ou de relaxamento muscular (WOLFMAN et al., 1994). Segundo SOULIMANI e colaboradores, o extrato hidroalcoólico proveniente de órgãos aéreos de *Passiflora incarnata* apresentou atividade ansiolítica, em camundongos, com 400 mg/kg, enquanto que o mesmo extrato aquoso apresentou atividade sedativa na mesma dosagem. (SOULIMANI et al., 1997)

Um estudo conduzido por MALUF e colaboradores em 1991, utilizou o extrato aquoso obtido de folhas de *Passiflora edulis* para investigação de efeitos hipnótico e sedativo, e pôde ser observado efeito depressor não específico quando o extrato foi administrado em camundongos, ratos e humanos, entretanto o efeito hipnótico-sedativo não foi observado. (MALUF et al., 1991)

Em 2000, ZANOLI e colaboradores, avaliaram os efeitos comportamentais da administração de apigenina e crisina em ratos. Observou-se que os dois flavonoides tiveram igual capacidade de diminuição da atividade locomotora quando administrados na dose de 25mg/kg. A crisina apresentou atividade ansiolítica com uma dose de 1 mg/kg, enquanto que a apigenina não exibiu atividade com a mesma dose. O efeito sedativo destes dois flavonoides não pôde ser relacionado a uma interação existente com os receptores do tipo GABA-benzodiazepínicos, pois o

efeito não foi bloqueado pelo flumazenil, um antagonista benzodiazepínico. (ZANOLI; AVALLONE; BARALDI, 2000)

PETRY e colaboradores observaram atividade ansiolítica, em animais de laboratório, empregando extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora edulis*. (PETRY et al., 2001). O extrato aquoso de flores de *Passiflora edulis* gerou redução da atividade locomotora e provocou aumento do tempo de sono em roedores e humanos (WHEATLEY, 2005). Santos e colaboradores constataram em 2005 a ação sedativa de extratos e frações de *Passiflora actinia*. Apesar da obtenção de resultados satisfatórios, não pôde ser relacionado a nenhum grupo específico de substâncias o efeito observado (SANTOS; SANTOS; OLIVEIRA, 2005).

Estudos clínicos foram realizados utilizando extratos padronizados de *Passiflora incarnata*. Um estudo duplo-cego randomizado empregou 32 pacientes com ansiedade, que receberam aleatoriamente 45 gotas de uma tintura de *Passiflora incarnata* (+ comprimido placebo) ou 30 mg de oxazepam (+ gotas placebo) por dia. Após quatro, sete, vinte e um e trinta dias de tratamento, não se observou diferença significativa no nível de ansiedade entre controle positivo e tratados. Os pacientes que receberam a tintura relataram menos efeitos colaterais que aqueles que foram tratados com ansiolítico sintético. Dessa maneira concluiu-se que o extrato de *Passiflora incarnata* possui a mesma eficácia que o ansiolítico sintético, e ainda possui efeitos adversos menos proeminentes (AKHONDZADEH et al., 2001).

Segundo um estudo multicêntrico, duplo-cego randomizado que avaliou a associação de *Passiflora incarnata* com *Hypericum perforatum* no tratamento da depressão moderada em associação com ansiedade, os pacientes que receberam a medicação apresentaram uma redução bastante significativa ($p < 0,0001$) nos escores de *Hamilton Rating Scale for Depression* (HAM-D) para a avaliação do grau de depressão, sendo que no grupo-placebo não foi possível observar essa melhoria. Os autores concluem que o uso dessa medicação, para pacientes com depressão moderada associada à ansiedade, é apropriada, existindo uma boa eficácia terapêutica, com raros efeitos adversos (CHAUDHRY et al., 2007). Em um estudo duplo-cego controlado com placebo, 60 pacientes que passariam por cirurgia, receberam oralmente 500 mg de extrato de *Passiflora incarnata*, e houve redução da

ansiedade do grupo teste de modo significativo ($p < 0,001$), sem se observar alterações nas variáveis psicológicas e função psicomotora no pós-operatório (MOVAFEGH et al., 2008).

LIN e colaboradores, compararam a atividade ansiolítica e conteúdo de flavonoides dos extratos etanólicos obtidos das folhas de duas variedades diferentes de *Passiflora edulis*. *Passiflora edulis* 'edulis' (frutos roxos) e *Passiflora edulis* flavicarpa (frutos amarelos). Segundo os autores não foi possível notar diferença na atividade ansiolítica entre os dois extratos e não houve diferença significativa no conteúdo de flavonoides. (LIN; GARCÍA-RODRIGUES; HERNÁNDES-DIAZ, 2011).

2.1.2.2. Demais atividades sobre o sistema nervoso central

A atividade sobre o sistema nervoso central de extratos de *Passiflora* foi estudada por diversos pesquisadores, mas não visando a atividade ansiolítica. Em 2003, DHAWAN e colaboradores, fizeram a avaliação do comportamento sexual em camundongos que receberam extrato metanólico de *Passiflora incarnata*, nas doses de 75 a 150 mg/kg. Observou-se um aumento significativo no número de copulas em relação ao grupo controle, que recebeu somente o veículo. Observou-se que o maior aumento do número de copulas se deu no grupo que recebeu 100 mg/kg de extrato, visto que em doses maiores há um predomínio do efeito sedativo, não se pode atribuir a atividade observada a determinado grupo de princípios ativos; unicamente os alcaloides foram descartados já que não foram identificados no extrato (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2003a). Em outro estudo com o intuito de avaliar a atividade analgésica do extrato hidroetanólico de *Passiflora foetida* em ratos, foi administrado o extrato por via oral nas doses de 200 e 300 mg/kg, e observou-se um aumento significativo da tolerância dos animais frente à fonte de algesia, no caso, uma chapa aquecedora. A atividade pode ser comparada àquela observada no controle positivo, ácido acetilsalicílico na dose de 25 mg/kg (BASHA et al., 2008)

NASSIRI-ALS e colaboradores em 2007 realizaram um estudo que avaliou o potencial anticonvulsivante extrato hidroetanólico de *Passiflora incarnata*. Comparou-se a atividade do extrato, nas doses de 0,05 a 0,4 mg/kg intraperitoneal, com diazepam nas doses de 0,5 a 1 mg/kg intraperitoneal, em modelo animal de

convulsão induzida por pentilenotetrazol. Observou-se uma boa atividade anticonvulsivante do extrato na dose de 0,4 mg/kg. Utilizando flumazenil, um antagonista de receptor benzodiazepínico, e naloxona, um antagonista de receptor opióide, conclui-se que o mecanismo de ação da atividade anticonvulsante do extrato de *Passiflora incarnata* pode ser devido a receptores GABA bem como a receptores opióides, e correlacionou-se essa atividade com a presença de flavonoides (NASSIRI-ALS; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007).

Em 2013, WANG e colaboradores, relacionaram efeitos do tipo antidepressivo, gerados em ratos após consumo de *Passiflora edulis*, relatados na literatura à presença de saponinas triterpênicas nesta espécie vegetal. (WANG et al., 2013)

2.1.2.3. Atividade antioxidante

Diversos estudos têm apontado para uma atividade antioxidante de *Passiflora* bastante pronunciada. Em um estudo, avaliaram-se diversas espécies vegetais, de uso comum na medicina popular local, oriundas da caatinga brasileira, quanto ao potencial antioxidante. Em meio as espécies selecionadas, *Passiflora cincinnata* se destacou por apresentar uma excelente atividade antioxidante frente à proteção de oxidação de β -caroteno, além de apresentar uma DE_{50} por volta de 20 mg/mL, empregando ratos Wistar para essa avaliação. Entretanto, segundo os autores os resultados obtidos com o extrato de *Passiflora cincinnata* não são comparáveis ao obtidos utilizando substâncias antioxidantes disponíveis no comércio, como por exemplo Trolox® (DAVID et al., 2007).

Extratos hidroetanólicos de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* foram avaliados quanto à atividade antioxidante, segundo modelo *in vitro* e *ex vivo*. Ambos os extratos apresentaram razoável atividade antioxidante, porém a atividade do extrato de *Passiflora alata* foi maior em todos os modelos ensaiados. Atribuiu-se a atividade antioxidante observada à presença de compostos polifenólicos (RUDNICKI et al., 2007). Outros dois estudos avaliaram a atividade antioxidante de extratos de *Passiflora edulis* bem como de suas frações, segundo modelo *in vitro* utilizando DPPH (SUNITHA e DEVAKI, 2009; RIPA et al., 2009) . Em ambos estudos foi

observada uma atividade antioxidante bastante significativa, com valores de DE_{50} ao redor de 50mcg/ml empregando as frações clorofórmica e de éter de petróleo, esses valores podem ser comparáveis aos valores obtidos com agentes antioxidantes comerciais como por exemplo ácido ascórbico, porém nesses dois estudos não foi possível relacionar o potencial antioxidante à determinadas moléculas características das espécies vegetais. SIMIRGIOTIS e colaboradores isolaram flavonoides C-glicosídeos de *Passiflora tripartita* e atribuíram a atividade antioxidante dos extratos dessa espécie à presença de flavonoides (SIMIRGIOTIS et al., 2013)

LUGATO et al., usando folhas de *Passiflora alata*, avaliaram a influência do tempo de maceração, número de extrações, proporção água:etanol e proporção de droga:líquido extrator; sobre o rendimento de extrato seco produzido, concentração de compostos polifenólicos presentes no extrato e atividade antioxidante. Para isso prepararam diferentes extratos variando as condições de extração e calculando o rendimento, quantificando compostos polifenólicos e atividade antioxidante dos extratos produzidos. Os autores concluíram que todos os fatores avaliados estão diretamente relacionados ao rendimento da produção de extrato seco e ao conteúdo de compostos polifenólicos extraídos e consequentemente à atividade antioxidante, pois relacionam essa atividade à quantidade de compostos polifenólicos presentes nos extratos. (LUGATO et al., 2014)

RAMAIYA e colaboradores, enfatizaram a relação existente entre atividade antioxidante e presença de ácido ascórbico, presença de açúcares e compostos polifenólicos totais, em frutos de alguns cultivares de *Passiflora*. (RAMAIYA; BUJANG; ZAKARIA, 2014)

SILVA et al., avaliaram *in vitro* o potencial antioxidante do extrato aquoso de folhas de *Passiflora edulis*. No modelo do DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazila) radical obteve-se DE_{50} (concentração inibitória 50%) de $1100 \mu\text{g mL}^{-1}$. No modelo de redução de íons de ferro obteve-se $205,7 \pm 4,12 \mu\text{mol}$ de equivalentes de Trolox®(TE) g^{-1} (média $\pm$ erro padrão), no ensaio usando o modelo de capacidade antioxidante por equivalentes de Trolox® obteve-se $19,2 \pm 0,50 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ (média $\pm$ erro padrão) e no modelo de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) o valor obtido foi de $373,02 \pm 1,63 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ (média $\pm$ erro padrão). Os autores consideraram todos os resultados como promissores (SILVA et al., 2013).

No ano seguinte ano SILVA e colaboradores também avaliaram a capacidade antioxidante da farinha de casca de *Passiflora edulis* em mesmo modelo do estudo anterior e os resultados se mostraram bastante parecidos com os valores obtidos com o extrato de folhas de *Passiflora edulis*. (SILVA et al., 2014 a). Um estudo de 2013 comprovou o efeito de proteção contra espécies reativas de oxigênio e glicação proteica, em modelo *in vitro* e *ex vivo*, exercido pelo extrato aquoso de folhas de *Passiflora manicata* Juss (MORRONE et al., 2013).

2.1.2.4. Atividade antimicrobiana

PERRY et al. atribuíram a atividade anti pseudomonas e citotóxica observada no extrato metanólico dos órgãos aéreos de *Passiflora tetrandra* à 4-Hidroxi-2 –ciclopentenona, um componente isolado do mesmo extrato (PERRY et al., 1991). RIPA e colaboradores ensaiaram diferentes extratos de *Passiflora edulis* para avaliação da atividade antimicrobiana. Constatou-se que aqueles extratos provenientes dos caules do vegetal apresentaram atividade e espectro de ação significativos. Os extratos de origem caulinar preparados com éter de petróleo e clorofórmio apresentaram respectivamente, 8-17cm e 7-12cm de proteção, quando usados na dose de 500mg/kg, entretanto foram menos eficientes que o controle positivo, kanamicina (RIPA et al., 2009).

Um estudo conduzido por BEZERRA e colaboradores em 2006, realizou uma triagem do potencial leishmanicida dos extratos de dez plantas medicinais, dentre elas a *Passiflora edulis*, que apresentou uma moderada atividade sob as formas promastigotas do microorganismo, entretanto em relação ao crescimento desta forma, ele foi inibido em 100%. A presença de compostos do tipo flavonoídicos e triterpenóides foi apontada como responsável pela atividade observada. (BEZERRA et al., 2006).

MAHADI e colaboradores, em 2005, avaliou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico proveniente dos órgãos aéreos de *Passiflora incarnata*, frente à bactéria *Helicobacter pylori*, que é associada à incidência de úlcera gástrica na população mundial. A atividade antimicrobiana mínima *in vitro* foi observada com 50 µg/mL do extrato de *Passiflora incarnata*, concentração bastante próxima da concentração de metronidazol (MAHADI et al, 2005).

KANNAN et al, realizaram dois estudos em 2011. No primeiro estudo avaliaram a atividade antibacteriana de um composto isolado do extrato metanólico de folhas de *Passiflora ligularis* frente a diferentes microrganismos. O composto isolado se mostrou significativamente eficiente contra *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris* quando comparado ao controle positivo (ciprofloxacino 5µg/disco) (KANNAN et al., 2011 a). No segundo estudo sob mesmo modelo, avaliou-se a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Passiflora edulis* e constatou que o extrato foi significativamente eficaz contra *Bacillus subtilis* (Gram-positiva) e *Eschechia coli* (Gram-negativa) e os autores sugeriram uma ação eficaz contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi* em comparação com ciprofloxacino (controle) em condições semelhantes. (KANNAN; PARIMALA DEVI; JAYAKAR, 2011 b)

RAZIA et al. em 2014, comprovaram significativa atividade antibacteriana de extratos aquosos de *Passiflora edulis* (200µg/disco) sobre a seis importantes patógenos patógenos: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* (RAZIA et al. 2014)

RAZIA e colaboradores comprovaram a atividade antimicrobiana; de extratos obtidos a partir de folhas de *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora maliformis*, e *Passiflora edulis*; sobre cinco bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus gallolyticus*, e *Staphylococcus aureus* e 5 bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteritidis*, and *Escherichia coli*. (RAZIA; BEULAH; SIVARAMAKRISHNAN, 2014)

2.1.2.5. Atividade antiviral

MÜLLER e colaboradores avaliaram a atividade antiviral *in vitro* de extratos etanólico e aquoso de raízes de *Passiflora alata*. A atividade antiviral foi avaliada frente a duas cepas do vírus *Herpes simplex* tipo I e a uma cepa do vírus da raiva. O extrato aquoso demonstrou eficácia contra os três tipos de vírus avaliados, com CE₅₀ de 800 µg/mL para o vírus da raiva, 290,9 µg/mL para a cepa do vírus Herpes simplex sensível ao aciclovir, 89,9 µg/mL para o vírus Herpes simplex resistente ao

aciclovir. Já o extrato etanólico a 40% não se mostrou eficaz contra nenhum tipo de vírus. A atividade antiviral observada no extrato aquoso foi atribuída à presença de saponinas e flavonoides (MÜLLER et al., 2007).

2.1.2.6. Atividades anti-inflamatória e cicatrizante

BORRELLI e colaboradores, em 1996, avaliaram a atividade anti-inflamatória em ratos, administrando o extrato etanólico de órgãos aéreos de *Passiflora incarnata*, por gavagem. Observou-se atividade significativa nos grupos de animais que receberam de 125 a 500 mg/kg, entretanto não foram identificados os princípios e nem os possíveis mediadores endógenos envolvidos no processo. BORRELLI et al., 1996)

A atividade anti-inflamatória de extratos de *Passiflora edulis* e *Passiflora alata* foi bastante estudada (BENINCA et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007; ZUCOLOTTO et al., 2009). O extrato aquoso dos órgãos aéreos de *Passiflora edulis* mostrou resultados significativos, segundo modelo de pleurisia em ratos, quando avaliado em relação à inibição de infiltração de leucócitos (que foram inativados) para o foco inflamatório; à inibição de produção de mieloperoxidase, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1, e especialmente nesse caso houve uma inibição maior que no controle positivo, dexametasona (MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007) Outro estudo realizado por BENINCA e colaboradores em 2007 comprovou a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Passiflora edulis*, bem como de suas frações butanólica e aquosa residual, avaliou-se a inibição de migração celular e de citocinas pró-inflamatórias, e essa atividade pode ser relacionada à presença de flavonoides do tipo C-glicosídeos (BENINCA et al., 2007).

ZUCOLOTTO e colaboradores, isolaram iso-orientina, vicianina-2 e spinosina da fração butanólica do extrato de *Passiflora edulis*, e atribuíram parte da atividade anti-inflamatória a estes compostos (ZUCOLOTTO et al., 2009).

ARAÚJO e colaboradores em 2008 realizaram um estudo etnofarmacológico e constataram que em meio a diversas espécies estudadas, *Passiflora foetida* possui uso popular como cicatrizante e anti-inflamatória. A atividades foram comprovadas

entretanto não puderam ser atribuídas à presença de flavonoides como em estudos anteriores, mas sim ao alto teor e de taninos (ARAÚJO et al., 2008). Dois estudos avaliaram parâmetros histológicos e tensiométricos relacionados com a atividade cicatrizante de *Passiflora edulis* em ratos. Um dos estudos avaliou cicatrização após cirurgia de bexiga urinária (GONÇALVES FILHO et al., 2006), enquanto o outro avaliou cicatrização de pele (GOMES et al., 2006). Segundo os autores, a administração intraperitoneal de 200 mg/kg (pele) e 250 mg/kg (bexiga) de extrato de *Passiflora edulis* durante a cirurgia produziu efeitos favoráveis na cicatrização dos animais. Efeitos esses relacionados principalmente com redução de processo inflamatório agudo e crônico. Constatou-se que houve favorecimento de proliferação fibroblástica, formação de colagênio e neoangiogênese capilar. Os parâmetros tensiométricos avaliados apontaram para uma cicatrização mais eficiente (GONÇALVES FILHO et al., 2006; GOMES et al., 2006).

2.1.2.7. Atividade antitumoral

Alguns estudos visando avaliar a atividade antitumoral, mostraram que algumas espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* são promissoras quanto a essa atividade. Em 2003 PURICELLI realizou um estudo, empregando decoctos de frutos de duas espécies de *Passiflora* (*Passiflora edulis* e *Passiflora foetida*), no qual avaliou-se *in vitro* a capacidade de inibição de metalo-proteases, que são enzimas essas relacionadas à progressão e invasão de tumores, metástase e angiogênese tumoral. Verificou-se ambos os extratos inibiram metalo-proteases e que a inibição era dose-dependente. O extrato de *Passiflora foetida* apresentou-se mais potente uma vez que gerou uma inibição maior em menores concentrações (PURICELLI et al., 2003).

ZHANG relatou a atividade antimelanogênica de extratos obtidos de folhas de *Passiflora edulis*, o autor atribuiu a atividade observada a presença de glicosídeos flavonoídicos, glicosídeos triterpenos e ciano glicosídeos. (ZHANG et al., 2013)

2.1.2.8. Outras atividades farmacológicas

No transcorrer dos anos o gênero *Passiflora* foi alvo de estudos de investigação de outras atividades além das anteriores. Algumas outras atividades estudadas foram: hepatoprotetora, hipoglicemiante, relaxante da musculatura lisa, vasoativa e sobre sistema respiratório.

FELLOWS e SMITH, observaram hipotensão em cães, após administração de extrato aquoso de *Passiflora incarnata*. (FELLOWS e SMITH, 1938), em continuidade a esse trabalho, RUGGY e SMITH, isolaram em 1940 um princípio ativo a partir do extrato *Passiflora incarnata*. O princípio ativo gerou contração da musculatura lisa uterina e intestinal de cobaias e coelhos e provocou redução da pressão arterial e cardiomegalia em cães. Constatou-se que essas atividades não foram alteradas pela administração de nicotina ou atropina, e nem pela vagotomia. Segundo os autores, o princípio ativo isolado atuava diretamente sobre os músculos lisos e que não se tratava de um composto de natureza alcaloídica, mas sim de um tipo de glicosídeo, porém de natureza não conhecida (RUGGY e SMITH, 1940). Em 1939, outro estudo relatou atividade de paralisia do intestino em coelhos e um efeito espasmolítico periférico após a administração de resíduo seco do extrato alcoólico de *Passiflora incarnata*. (BORGATTI, 1939)

SHI e colaboradores, avaliaram o efeito de harmana em relação ao sistema cardiovascular. A harmana foi administrada em ratos anestesiados com pentobarbital, nas doses de 1 a 10 mg/kg, observou-se uma bradicardia de longa duração e hipotensão transitória, ambos os efeitos se mostraram dose-dependentes. O efeito vasodilatador está relacionado à liberação de óxido nítrico nos músculos lisos vasculares e em células endoteliais, inibição das contrações induzidas pela ativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes e ligados à receptores, os autores sugerem que a atividade vasodilatadora pode contribuir para o aumento do efeito hipotensor exercido pela harmana (SHI et al., 2000). DOYAMA e colaboradores avaliaram alterações de parâmetros bioquímicos em ratos, após a

administração de extrato aquoso de folhas de *Passiflora alata*. Observou-se que houve aumento na fração HDL do colesterol, entretanto sem aumento do colesterol total. Devido ao fato de que o HDL-colesterol é capaz de inibir a oxidação do LDL-colesterol, concluiu-se que o extrato poderia ser um potencial cardioprotetor e anti-aterogênico (DOYAMA et al., 2005).

Em um estudo com ratos hipertensos, constatou-se que o extrato de *Passiflora edulis* foi capaz de gerar vasodilatação e reduzir significativamente a pressão arterial dos animais. Empregaram-se doses entre 10 e 50 mg/kg do extrato bruto e de uma molécula isolada do extrato (Luteolina). A atividade hipotensora foi relacionada à presença de flavonoides, e o mecanismo de ação provavelmente está relacionado à atividade GABAérgica e à atividade vasodilatadora dos polifenóis presentes, inclusive a luteolina (ICHIMURA et al., 2006). Em estudo semelhante, ROJAS ARMAS e colaboradores no mesmo ano avaliaram a atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico das folhas e do suco obtido dos frutos de *Passiflora edulis*. Durante dez dias, os extratos foram administrados oralmente na dose de 500 mg/kg e captopril na dose de 100 mg/kg como controle positivo. O suco bem como o extrato etanólico se mostraram capazes de reduzir significativamente a pressão sistólica dos animais desde o primeiro dia em que foram tratados. A atividade hipotensora observada, foi relacionada à presença de flavonoides e demais compostos polifenólicos no extrato.(ROJAS ARMAS et al., 2006). Um estudo que durou 28 dias, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, em humanos, mostrou que o extrato obtido das cascas do fruto de *Passiflora edulis* reduziu significativamente a pressão sistólica e diastólica dos pacientes. O estudo relacionou a atividade anti-hipertensiva à presença de ácidos fenólicos, antocianinas e flavonoides e apontou como sendo a modulação de óxido nítrico o principal mecanismo de ação. (ZIBAD et al., 2007). LEWIS e colaboradores, também observaram significativa redução da pressão arterial, em ratos espontaneamente hipertensos que receberam extrato de cascas de *Passiflora edulis*. (LEWIS et al., 2013). KONTA em estudo semelhante comprovou a atividade anti-hipertensiva da polpa de *Passiflora edulis*. Foram utilizados nesse estudo, ratos espontaneamente hipertensos que tiveram sua pressão arterial monitorada durante o experimento. A administração de polpa de *Passiflora edulis* diretamente por gavagem aos animais

reduziu significativamente a pressão arterial durante o experimento. (KONTA et al., 2014).

Um estudo relacionou o consumo de farinha de cascas do fruto de *Passiflora edulis*, com a prevenção de colite ulcerativa. Foram utilizados ratos para a avaliação. Os animais foram separados em dois grupos distintos, controle e tratado. Grupo controle recebeu ração enriquecida com a farinha *Passiflora edulis* e o controle apenas ração normal. Após sete dias a colite ulcerativa foi induzida e os animais acompanhados por mais sete dias. Ao final do experimento comparou-se os distintos grupos. Os autores chegaram a conclusão que o consumo de farinha de *Passiflora edulis* exerceu papel de proteção frente as ulcerações. (CAZARIN et al., 2014). Em um estudo, no mesmo ano, SILVA et al., comprovaram que o consumo da mesma farinha levou ao aumento da síntese colônica de ácidos graxos de cadeia curta em ratos wistar (SILVA et al, 2014 b).

Em relação à atividade hepatoprotetora, segundo BABENKO e SHAKHOVA (2008), alguns tipos de flavonoides são capazes de proteger hepatócitos frente a lesões causadas por tetracloreto de carbono (BABENKO; SHAKHOVA, 2008). O extrato hidroetanólico obtido a partir das folhas de *Passiflora alata* diminuiu significativamente a hepatotoxicidade, em ratos, gerada por tetracloreto de carbono, resultado embasado na análise dos seguintes parâmetros: alanina amino-transferase, aspartato amino-transferase, superóxido dismutase e atividade de catalase (RUDNICKI et al., 2007).

Há dois estudos de um grupo que apontam atividade promissora, dos extratos metanólicos de *Passiflora incarnata*, em relação ao sistema respiratório. Em 2002, utilizou-se camundongos expostos ao SO₂ para a avaliação da atividade antitussígena do extrato. O extrato foi ministrado por gavagem nas doses de 100 e 200 mg/kg, e codeína foi utilizada como controle, e verificou-se ação antitussígena bastante significativa nos animais que receberam o extrato. Segundo os autores os extratos de *Passiflora incarnata* poderiam ser utilizados na diminuição da tosse, uma vez que, além terem se mostrado eficazes, não apresentaram efeitos adversos relacionados com os antitussígenos tradicionais (DHAWAN e SHARMA, 2002).

Em 2003, a atividade antiasmática do mesmo extrato foi avaliada pelo mesmo grupo. Utilizaram-se cobaias segundo modelo de indução de broncoespasmo por

cloreto de acetilcolina. Três doses de extrato foram avaliadas (50, 100 e 200 mg/kg) administradas aos animais durante 7 dias por gavagem. Na dose de 50mg/kg não se observou efeito; em contrapartida nas demais doses, houve redução significativa de broncoespasmos, expressa sob aumento de tempo pré-convulsivo. A atividade antiasmática foi relacionada à presença de benzoflavonas no extrato, que supostamente poderiam atuar como agonistas de receptores alfa-adrenérgicos (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2003 b).

TEIXEIRA et al, avaliaram os efeitos do extrato hidroetanólico oriundo de folhas de *Passiflora nitida* Kunth sobre enzimas digestivas e dieta altamente calórica em ratos, em comparação com Xenical. O extrato hidroetanólico de *Passiflora nitida* foi capaz de inibir a atividade *in vitro* da lipase pancreática. A dislipidemia e esteatose hepática induzida pela dieta calórica nos animais foi parcialmente reduzida pelo extrato de *Passiflora nitida*, que também gerou em redução significativa da hiperglicemia pós-prandial e impediu o aumento da obesidade visceral. (TEIXEIRA et al, 2014)

MARUKI-UCHIDA et al. comprovaram o efeito de piceatanol, isolado de sementes de *Passiflora edulis*, sobre queratinócitos irradiados com raios do tipo UVB. O piceatanol protegeu significativamente as células contra a irradiação e reduziu os danos gerados pós irradiação. (MARUKI-UCHIDA et al., 2013).

MONTEFUSCO-PEREIRA e colaboradores destacaram em seu trabalho de 2011, o poder hipoglicemiante, anti-inflamatório e antioxidante do extrato hidroetanólico de *Passiflora nitida*. (MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013). SIRIWARDHENE et al., relataram atividade anti-hiperglicemiante em ratos normais após receberem extrato de *Passiflora foetida* (SIRIWARDHENE et al, 2013). COLOMEU et al., comprovaram atividade antioxidante e potencial antidiabético em ratos portadores de *diabetes mellitus* tipo 1 (COLOMEU et al, 2014). No mesmo ano SARAVANAN e colaboradores estudaram duas espécies de *Passiflora*. Em um estudo comprovaram a atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e antipirética dos compostos polifenólicos presentes em folhas de *Passiflora subpeltata*. (SARAVANA; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2014 a). Em outro estudo SARAVANAN et al, constatarem propriedades antioxidante, antimicrobiana e

anti-diabética dos polifénóis presentes na polpa dos frutos de *Passiflora ligularis* Juss. (SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014 b).

2.1.2.9. Segurança de uso e toxicidade

O uso indiscriminado de plantas medicinais e seus derivados pode trazer diversos riscos à saúde, apesar de a maioria da população mundial acreditar o contrário (FISHER; PURCELL; LE COUTER, 2000; CARRASCO et al., 2009). Para que a população possa consumir com segurança, extratos e outros derivados vegetais não farmacêuticos que são comercializados livremente, como por exemplo chás e suplementos vitamínicos, é de suma importância que os mesmos passem por testes para avaliação da toxicidade e segurança de uso. (DOYAMA et al., 2005; CARRASCO et al., 2009).

Em um estudo conduzido por DOYAMA e colaboradores, avaliou-se as alterações de parâmetros bioquímicos em ratos, após os animais receberem três vezes por semana, durante quinze dias 100mg/kg de chá de folhas de *Passiflora alata*. Quando os resultados obtidos pelo grupo tratado foram comparados com os do grupo controle, não foram observadas variações significativas nos níveis de proteínas séricas, glicose, triacilgliceróis, e enzimas de biotransformação (superóxido dismutase e glutathione peroxidase). Apenas observou-se um aumento significativo no HDL-colesterol, e tal aumento foi atribuído à presença e ação de flavonoides no chá (DOYAMA et al., 2005).

A DL₅₀ do extrato etanólico das folhas e do suco do fruto de *Passiflora edulis* foram avaliadas. As doses administradas foram de 2.500 a 20.000 mg/kg e em dose única. Nos animais que receberam as doses mais elevadas foi possível observar demasiada sonolência logo no primeiro dia e depois os mesmos se restabeleceram. A DL₅₀ para o extrato é por volta de 10.000 mg/kg e acima de 20.000 mg/kg para o suco do fruto, o que demonstra uma certa segurança para o uso (ROJAS ARMAS et al., 2006).

TABACH e colaboradores, realizaram um estudo pré-clínico, utilizando ratos, cães e camundongos, visando avaliar a segurança de uso de um medicamento fitoterápico contendo: *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba*

L. Realizou-se testes de toxicidade aguda com administração de dose única (160 à 5000 mg/kg) no qual se avaliou a DL_{50} . Realizou-se uma triagem farmacológica observacional e observou-se a coordenação e atividade motora dos animais. A toxicidade crônica também foi avaliada, com administração diária durante 180 dias de doses de 160 à 640 mg/kg, neste caso os parâmetros avaliados foram: alterações comportamentais, variação de peso, fertilidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Não se observou nenhuma evidência de toxicidade no modelo de toxicidade aguda bem como no de toxicidade crônica, dessa maneira concluiu-se que o fitoterápico é bastante seguro, até mesmo quando utilizado em doses muito acima das doses terapêuticas e por tempo maior que o recomendado (TABACH; RODRIGUES; CARLINI., 2009).

Uma possível interação medicamentosa existente entre lorazepam, infusão de *Valeriana officinalis* L. e droga oriunda de folhas de *Passiflora incarnata* L. foi relatada em um caso clínico. Segundo os autores houve um efeito sinérgico entre os medicamentos que o paciente fez uso e esse efeito sinérgico pode ter sido o gerador dos efeitos adversos que estão relacionados ao aumento da atividade inibitória do lorazepam que se liga ao receptor GABA (CARRASCO et al., 2009).

Outro caso clínico, correlaciona o uso de uma formulação comercial de *Passiflora incarnata* L. em doses terapêuticas com o surgimento de reações adversas como prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma, bradicardia, arritmia ventricular, náusea, emêses e sonolência. A presença e atividade de flavonoides e alcaloides do tipo harmânico foi dada como a responsável pelos efeitos adversos apresentados pela paciente (FISHER; PURCELL; LE COUTE, 2000).

Em dois estudos avaliou-se em humanos a toxicidade e segurança de uso de produtos derivados de espécies de *Passiflora*. No primeiro estudo avaliou-se o uso de farinha de casca de *Passiflora edulis*, que se caracteriza por ser rica em fibras solúveis, na alimentação de 36 indivíduos saudáveis. A farinha foi consumida durante 8 semanas, três vezes ao dia em porções de 10g cada. Nenhum efeito tóxico pode ser observado nos órgãos e sistemas estudados, e o nível de aceitação por parte dos voluntários foi bastante alto. Devido ao fato de a farinha ser muito rica em pectina, poderia atuar como um agente hipoglicemiante e ser introduzida na

alimentação de pacientes portadores de diabétes tipo 2 (MEDEIROS et al., 2009). No segundo estudo avaliou-se um medicamento fitoterápico, composto por *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. O fitoterápico foi administrado durante 28 dias a 24 pacientes que tomaram dois comprimidos duas vezes ao dia (equivalente a 400 mg de extrato de *Passiflora incarnata* L. ao dia), durante o experimento e ao final não foi relatada nenhuma reação adversa, e ao final não se observou nenhuma alteração em testes eletrocardiográficos, exames clínicos e laboratoriais. Os autores concluíram que o fitoterápico é seguro na dose estudada (NASCIMENTO et al., 2009).

2.2. *Passiflora setacea* D.C e *Passiflora tenuifila* Kilip

Passiflora tenuifila bem como *Passiflora setacea*, são espécies silvestres e bastante conhecidas e disseminadas na região centro-oeste do Brasil, sendo tradicionalmente utilizadas na culinária local. Os frutos imaturos de *P.tenuifila* são utilizados no preparo de saladas, pois quando imaturos, os frutos possuem sabor e odor que lembram o alho; por esse motivo *P.tenuifila* é também conhecida como maracujá alho. BIRK et al.,2005, identificaram por cromatografia em camada delgada a presença do flavonoide vitexina nas folhas de *P. tenuifila*. (BIRK et al., 2005).

Recentemente, com a intensificação da coleta do germoplasma de *Passiflora*, tem-se dado maior atenção aos parentes selvagens do maracujá, como a *P. tenuifila* e *P.setacea* (PEREIRA; VILEGAS, 2000; VICENTINI; COSTA; MADALENA, 2010), possibilitando sua incorporação aos programas de melhoramento genético, permitindo a obtenção de híbridos interespecíficos entre espécies pouco exploradas comercialmente (OLIVEIRA E RUGGIERO, 2005), seja para a incorporação de resistência contra doenças às espécies comerciais (JUNQUEIRA et al., 2005) ou para fins ornamentais (PEIXOTO, 2005).

Passiflora setacea é uma espécie de maracujá bastante utilizada no preparo de doces e sorvetes e é denominada popularmente por maracujá-sururuca, maracujá-do-sono, maracujá de cascavel (OLIVEIRA e RUGGIERO 2005). Porém esta espécie é pouco estudada, com quase nenhuma informação sobre sua composição química e efeitos medicinais. *Passiflora setacea* trata-se de uma espécie de *Passiflora* selvagem, dessa maneira apresenta uma alta resistência à

morte precoce e à outras patologias advindas da presença de patógenos no solo quando comparada às demais espécies tradicionalmente cultivadas (MENEZES et al, 1994, OLIVEIRA et al, 1994, MELETTI e BRUCKNER, 2001, FISCHER, 2003).

Um projeto de pesquisa em andamento na EMBRAPA CERRADOS (projeto Rede Passitec – Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres) indica que realizando cruzamentos artificiais entre *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*, é possível a obtenção de híbridos férteis e mais resistentes às pragas, com características genéticas melhoradas, maior número de frutos com mais sementes viáveis por planta, algo que é extremamente interessante do ponto de vista econômico (JUNQUEIRA et al, 2004).

PINELI e colaboradores, avaliaram a atividade antioxidante, conteúdo de flavonóides e compostos polifenólicos e propriedades sensoriais de extratos hidroetanólicos e infusões de *P.setacea* e *P.tenuifila*. (PINELI et al., 2015)

2.3. Estrutura e funções do estômago

O estômago é o órgão responsável pelo recebimento do bolo alimentar após a deglutição, destacando-se pelo armazenamento e digestão do mesmo. (SILVERTHORN, 2010). Pode-se identificar macroscopicamente quatro regiões estomacais distintas: cárdia, fundo, corpo e piloro ou antro (Figura 3), entretanto quando analisado microscopicamente a região do fundo e do corpo são idênticas, dessa maneira pode-se distinguir histologicamente apenas três regiões. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Figura 3. Visão macroscópica do estômago humano. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

2.4. Fisiologia da secreção gástrica

Em torno de 2500 mL de suco gástrico são secretados pelo estômago em um período de 24 horas (RANG et al., 2012). Apreciáveis quantidades de muco e bicarbonato, que são de suma importância para a proteção da mucosa gástrica também são secretadas pelo estômago (KOEPPEN e STANTON, 2009).

É possível se encontrar dois importantes tipos de glândulas tubulares na mucosa gástrica: glândulas pilóricas e glândulas oxínticas e, também células que desempenham papel importantíssimo na manutenção da integridade gástrica, são elas as células secretoras de muco que revestem toda a superfície do estômago. As glândulas pilóricas possuem três tipos de células: células mucosas responsáveis pela secreção do muco; células do tipo G responsáveis pela liberação de gastrina e células D. As glândulas oxínticas possuem em sua composição: células mucosas, células parietais responsáveis pela secreção de ácido clorídrico, células do tipo enterocromafins responsáveis pela secreção de histamina, células principais ou pépticas que desempenham importante papel na secreção de pepsinogênio, células do tipo D que secretam de somatostatina. As glândulas pilóricas encontram-se na porção antral do estômago já as glândulas oxínticas recombrem a superfície do fundo e corpo estomacal. (GUYTON e HALL, 2011; SCHUBERT e PEURA, 2008). Um esquema de arranjo estrutural das glândulas estomacais pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Esquema do arranjo estrutural das glândulas gástricas. Adaptado: SCHUBERT; PEURA, 2008.

Basicamente há três neurotransmissores ou hormônios que são responsáveis pelo estímulo da secreção gástrica de maneira direta das glândulas gástricas, são eles: acetilcolina, gastrina e histamina. A acetilcolina trata-se de um neurotransmissor parassimpático vagal que, estimula todos os tipos de células secretoras nas glândulas gástricas, inclusive as células parietais a secretarem ácido clorídrico, células pépticas a secretarem pepsinogênio e células mucosas na secreção do muco. Por outro lado, tanto a gastrina (sintetizada e secretada pelas células do tipo G localizadas no antro) quanto a histamina (de origem parácrina e sintetizada a partir da histidina pelas células enterocromafins) estimulam vigorosamente as células parietais a secretarem ácido, entretanto exercem pouco efeito na estimulação das outras células (GUYTON e HALL, 2011; AIRES, 2008).

O estimulante mais potente da secreção gástrica de H^+ é a inervação parassimpática, via nervo vago. Os neurônios pós-ganglionares do nervo vago liberam acetilcolina e essa por sua vez age diretamente na célula parietal pela ativação dos receptores muscarínicos M_3 , e estimula a secreção ácida. A acetilcolina também é capaz de atuar de maneira indireta nas células enterocromafins gerando liberação de histamina e nas células do tipo G estimulando a secreção de gastrina que ativa receptores de colecistocinina tipo 2 (CCK_2), encontrados na célula parietal,

estimulando-as a secretarem íons H^+ , gerando formação de ácido (KOEPPEN, 2009; LEVY; KOEPPEN e STANTON, 2006).

A gastrina atua nas células enterocromafins as estimulando a liberarem histamina, a histamina liberada é difundida e atinge as células parietais, promovendo a secreção ácida graças à ativação de receptores histaminérgicos (Tipo H_2) encontrados nessas células (LEVY; KOEPPEN e STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2010).

A somatostatina, presente nas células D das glândulas oxínticas e pilóricas, é quem controla a inibição da secreção gástrica. A somatostatina tem ação direta em células parietais e ação indireta na inibição da secreção de histamina e gastrina. EGF (Fator de crescimento epidérmico) e alguns tipos de prostaglandinas (PGs), principalmente do tipo E_2 e I_2 , são capazes de estimular os receptores IP e EP_3 , também possuem envolvimento no mecanismo de regulação da secreção de íons H^+ . (RANG et al., 2012; AIRES, 2008).

Um esquema com a regulação da secreção gástrica pode ser observado abaixo na Figura 5.

Figura 5. Regulação fisiológica da secreção gástrica. A figura mostra interações entre uma célula semelhante às células enterocromafins (**ECL**) que libera histamina, uma célula parietal (que secreta ácido) e uma célula epitelial superficial secretora de muco e bicarbonato. As vias fisiológicas (setas em negrito) podem ser estimuladoras (+) ou inibidoras (-). **1** e **3** indicam possíveis influxos de fibras colinérgicas pós-ganglionares, enquanto **2** mostra o influxo neural do nervo vago sobre uma célula ganglionar (**CG**) do sistema nervoso entérico. Os agonistas fisiológicos e seus respectivos receptores incluem: receptores de acetilcolina (**ACh**), muscarínicos (**M**) e nicotínicos (**N**); gastrina, receptor de colecistocinina 2 (**CCK₂**); histamina (**HIST**), receptor **H₂**, e prostaglandinas **E₂** e **I₂** (**PGE₂**, **PGI₂**), receptor **EP₃**. A secreção ácida envolve uma bomba de prótons (**P**), que é uma H⁺/K⁺ATPase, um cotransportador (**C**) de K⁺ e Cl⁻ e um antitransportador (**A**) que troca Cl⁻ e HCO₃⁻. Adaptado de BRUNTON, 2006 e HERNANDES, 2010.

2.5. Úlcera péptica

Atualmente uma das patologias do sistema digestório de maior relevância é a úlcera péptica (BUCCIARELLI et al., 2010). Úlceras pépticas são lesões crônicas que podem surgir na mucosa duodenal ou gástrica, normalmente solitárias, com diâmetro de até 4cm. As úlceras pépticas podem ser caracterizadas por uma descontinuidade da mucosa do trato gástrico, estendendo-se pelo segmento

muscular da mucosa rumo à submucosa ou até mesmo podendo atingir camadas mais profundas. (KUMAR; ABBAS e FAUSTO, 2005).

Úlceras gástricas geralmente incidem em pacientes com idade superior a 40 anos, enquanto que úlceras duodenais são mais comumente encontradas em pacientes com faixa etária entre 20 e 50 anos. A incidência anual de úlcera péptica no mundo varia de 0,10 a 0,19%, e a prevalência, de 0,12 a 1,5%. (SUNG, 2009). Cerca de 66% dos indivíduos que a

presentam úlcera péptica são do sexo masculino e essa doença gastrointestinal está intimamente ligada ao tabagismo, é bastante alto seu risco recorrência. (KUIPERS e BLASER, 2009). Não há uma mensuração estatística precisa que mostre o número de indivíduos portadores de úlcera péptica no Brasil (BOLETIM DA FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA DE 2012).

Sob o ponto de vista histológico, a úlcera se compõe basicamente de duas regiões distintas: base e margem da úlcera. A base da úlcera é formada por tecido de granulação (componente de tecido do tipo conectivo) que se compõe de fibroblastos, macrófagos e nessa região pode-se encontrar proliferação de células endoteliais envolvidas no processo de angiogênese capilar. A margem da úlcera é composta por pela mucosa adjacente que não se encontra necrosada (o componente epitelial) (TARNAWSKI, 2005, 2010). Um esquema da fisiopatologia da úlcera péptica, pode ser observado na Figura 6.

Figura 6. Esquema da fisiopatologia da úlcera péptica. Adaptado de KUMAR, 2005 e HERNANDES, 2010.

Por muitos anos vem se estudando extensivamente a patogênese das úlceras pépticas, seu surgimento é o resultado de um desbalanço existente entre fatores protetores (produção de muco e bicarbonato suficientes, fluxo sanguíneo adequado, presença de prostaglandinas, etc.) e fatores lesivos (presença de espécies reativas de oxigênio, produção exacerbada de íons H^+ , etc.), dessa maneira culminando em um processo inflamatório na mucosa gastroduodenal (KAWANO e TSUJI, 2000; KUMAR et al.; 2008; MALFERTHEINER et al., 2009).

Segundo MALFERTHEINER e colaboradores, a presença da bactéria *Helicobacter pylori* é um dos fatores preponderantes para o surgimento de úlceras pépticas. Diversos estudos de caráter epidemiológico apontam para uma ligação existente entre infecção por *H. pylori* e presença de úlceras pépticas. Em mais da metade da população mundial pode-se detectar *H. pylori* na mucosa gástrica, e na maioria dos casos essa infecção é de natureza crônica, estima-se que de haja o desenvolvimento de úlceras pépticas em 5-10% dos indivíduos infectados cronicamente (MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL, 2009). Outros fatores também podem ser citados como responsáveis pelo desencadeamento e evolução de úlceras pépticas, tais como uso de corticoesteróides em doses altas, tabagismo, alcoolismo,

estresse, uso regular e prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008).

Segundo GLAVIN e SZABO (1992), o uso de etanol na indução de úlceras ocorre através de procedimentos simples e reprodutíveis, com a administração de diferentes doses (0,5 a 2ml/kg). Dependendo da quantidade de etanol administrada, entre 10 e 40% da porção glandular dos estômagos de camundongos e ratos se tornam repletos de lesões hemorrágicas e úlceras, que podem ser observadas após curto espaço de tempo (entre 1 e 2 horas) após a administração do etanol. Diversos estudos realizados com base no tempo do modelo mostraram que a maioria das lesões são formadas nos primeiros minutos de contato entre a mucosa estomacal e o etanol.

A administração aguda de etanol em conjunto ao ácido já presente no estômago ou administração de etanol acidificado torna a mucosa gástrica mais sensível ao ataque pelo ácido produzido pelo estômago, pelo fato de romper a barreira muco-bicarbonato. O contato do etanol com a mucosa gástrica gera uma resposta inflamatória, havendo destruição da camada protetora da mucosa gástrica causando necrose celular. A necrose celular é o resultado de uma cadeia de eventos que envolvem a liberação de radicais livres, enzimas e mediadores vasoativos, conduzindo a uma vasoconstrição, edema e hemorragia, havendo um comprometimento no fluxo sanguíneo da mucosa (CASTRO et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Além disso, ocorre a diminuição da liberação do óxido nítrico, o qual auxilia na redução das lesões gástricas hemorrágicas devido à sua ação vasodilatadora. Ao se realizar estudos histológicos constatou-se que o comprometimento do fluxo sanguíneo exerce papel primordial na etiologia da úlcera induzida por etanol, devido as lesões vasculares provocadas pelo próprio etanol (REPETTO; LLESUY, 2002; KAWANO; TSUJI, 2000, GLAVIN; SZABO, 1992)

Diversos fatores são responsáveis pela indução das úlceras gástricas no modelo do etanol acidificado. Alguns deles são: aumento da geração de radicais livres, aumento do refluxo na difusão de ácido, aumento da liberação de serotonina e histamina, aumento do efluxo de sódio e potássio, aumento do influxo de cálcio, aumento da produção de leucotrienos, aumento da isquemia, aumento da permeabilidade vascular gástrica e diminuição da produção de muco, diminuição

motilidade gástrica, diminuição da diferença de potencial transmucosa, diminuição da produção endógena de GSH (glutathiona), diminuição da produção de prostaglandinas e diminuição fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (GLAVIN; SZABO, 1992).

A patogenia da úlcera péptica é bastante complexa, pois ela ocorre após um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gástrica e as forças que direcionam a lesão dessa mucosa, com ênfase ao ácido gástrico e a pepsina (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Embora a hiperacidez estomacal não seja um pré-requisito para o desenvolvimento da úlcera péptica, pois diversos pacientes com tal lesão não apresentam hiperacidez, podem ocorrer ulcerações na mucosa gástrica quando as defesas da mucosa falham, como por exemplo, quando o fluxo sanguíneo da mucosa é reduzido, pode-se observar um retardo no esvaziamento gástrico ou impedimento da restituição epitelial (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). O bicarbonato e muco liberados pelas células endoteliais fazem parte do mecanismo de defesa da mucosa gástrica e exercem um importantíssimo papel na proteção da mucosa gastroduodenal. Embora a regulação fisiológica da secreção de muco e bicarbonato envolva fatores neurais, a prostaglandina E_2 é importante no controle local desta secreção (GRACIOSO et al., 2002).

Em 1999 DI CARLO et al., demonstraram que a geração de radicais livres derivados do oxigênio e a peroxidação lipídica estão entre os mecanismos envolvidos na patogênese da úlcera péptica. (DI CARLO, 1999) No ano de 2002, REPETTO enfatizou em sua revisão o importante papel das espécies reativas de oxigênio na patogênese da úlcera gástrica, inclusive quando essas lesões são geradas pelo uso de etanol. Atribui-se ao álcool etílico o acentuado aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, dessa maneira induzindo-se o estresse oxidativo intracelular. (REPETTO; LLESUY, 2002). Nesse mesmo ano KWIECIÉN e seus colaboradores, também encontraram evidências de que as espécies reativas de oxigênio têm importante papel na etiologia da ulceração gerada pelo etanol. KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002. GAZZIERI e colaboradores, em 2007 realizaram um trabalho visando colaborar na elucidação do mecanismo que correlacione lesão gástrica, radicais livres e etanol. Com o resultados obtidos de tal trabalho, sugeriu-se que há o envolvimento de canais de receptores de potencial transiente vanilóides do tipo 1 (TRPV-1), que ao serem ativados pelo álcool

etílico resultam na liberação de substância P, que por sua vez estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio; desta maneira é plausível atribuir atividade antiúlcera dos compostos estudados à sua capacidade antioxidante. (GAZZIERI et al., 2007) Em contrapartida LI *et al.*, 2012, propõe que a ativação de TRPV-1 e a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina estão relacionados com a gastroproteção da mucosa gástrica, após a indução de lesão gástrica por etanol. Isto ocorre porque este neuropeptídeo é um potente vasodilatador, e dessa maneira facilita a restituição da mucosa. No mesmo estudo, os autores verificaram que a administração de etanol não provocou mudança significativa no nível de calcitonina indicando que este neuropeptídeo não está envolvido na formação de lesão gástrica.(LI et al,2012)

2.6. O processo de cicatrização

Cicatrização pode ser definida como um processo no qual um tecido que passou por lesão é substituído por um novo tecido vascularizado de natureza conjuntiva. Na cicatrização há o envolvimento de:

- mediadores de natureza lipídica (leucotrienos, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária);
- mediadores de natureza protéica (citocinas, e fatores de crescimento);
- componentes da matriz extracelular;
- leucócitos,
- células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas).

O processo de cicatrização é dividido em quatro fases: coagulação, inflamação, proliferativa e remodelamento. Estas fases não ocorrem isoladamente, mas sim se sobrepondo sem se excluírem, pois o processo como um todo ocorre segundo uma sequência de eventos bioquímicos, celulares e teciduais culminando com o restabelecimento do tecido lesionado após a injúria. (HATANAKA e CURI, 2007; PORTH e MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008). Pode-se observar na Figura 7, a relação entre os tipos celulares nas diferentes fases do processo de cicatrização.

Figura 7. Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (HATANAKA e CURI, 2007).

Após a injúria vascular inicial, inicia-se a fase de coagulação, na qual há formação de coágulos de sanguíneos afim de conter o extravasamento de sangue dos vasos. O processo de coagulação e consequente estancamento do sangramento está diretamente ligado às interações existentes entre plaquetas, fatores de coagulação e paredes dos vasos lesionados. (TERKELTAUB; GINSBERG, 1998). Ao ocorrer a lesão vascular, as plaquetas são ativadas e consequentemente há liberação de apreciáveis quantidades de fatores tais como: PDGF (fator de crescimento de plaquetas), que gera a quimiotaxia de leucócitos e fatores de crescimento transformantes beta ($\text{TGF-}\beta$, $\text{TGF-}\beta 1$, $\text{TGF-}\beta 2$, $\text{TGF-}\beta 3$)

Ressalta-se o papel de plaquetas, fibroblastos e macrófagos que secretam $\text{TGF-}\beta 1$ imediatamente após a lesão, dessa maneira exercendo papel primordial na infiltração de neutrófilos, o que marca o início da fase inflamatória. (CLARK e HERSON, 1988, GRINNEL; BILLINGHAM; BURGERSS, 1981).

A fase inflamatória dura geralmente de 24 a 72 horas após a lesão inicial e é bem marcada pelo surgimento dos sinais clássicos da inflamação já descritos desde a antiguidade grega: dor, calor, tumor e rubor. Inicialmente há uma vasodilatação gerada graças à liberação de mediadores químicos pelas plaquetas e mastócitos, a permeabilidade vascular aumenta e há favorecimento da quimiotaxia, aumentando principalmente a migração de neutrófilos e monócitos/macrófagos que por sua vez

combatem os agentes invasores e fagocitam produtos oriundos da lise tecidual (MOLLÍNEDO; BORREGAARD; BOXES, 1999; PORTH e MATFIN, 2010).

As células de linhagem branca mais abundantes no sangue são os neutrófilos, que são capazes de alcançar o campo inflamado em poucos minutos. Estas células produzem uma gama de proteinases e espécies reativas de oxigênio, destinadas à formação de uma barreira contra a infecção por microrganismos na área lesada, os neutrófilos estão envolvidos na fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual. (BABIOR, 1999; BORREGAARD et al, 1993).

Neutrófilos estão ligados às reações de formação de tecidos através da produção de ROS, fatores de crescimento (VEGF- α), quimiocinas, e citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-8), responsáveis pela recomposição da celularidade regional, restabelecimento da homeostasia tecidual e sinalização para o início da fase seguinte (MOLLÍNEDO; BORREGAARD; BOXES, 1999).

Macrófagos são células teciduais que se derivam dos monócitos. Os macrófagos são as células predominantes no processo inflamatório crônico, auxiliando na eliminação de material estranho e na eliminação de neutrófilos senis. Uma vez ativados são capazes de produzir citocinas (TNF- α e IL-1) e fatores de crescimento importantes na evolução da resposta inflamatória e no início do processo de cura (BALBINO; PEREIRA e CURI, 2005; HATANAKA e CURI, 2007; PORTH e MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

A fase proliferativa também denominada fase fibroblástica e de deposição da matriz extracelular tem início após 2 ou 3 dias após a lesão e tem duração de cerca de 3 semanas. Na fase proliferativa ocorre produção de colágeno pelos fibroblastos, formação de novos vasos sanguíneos e intensa migração celular (queratinócitos), dessa maneira gera-se uma reepitelização. Primeiramente, há um aumento significativo na migração e ativação de fibroblastos, pois há liberação de mediadores, em sua maioria pelos macrófagos, são liberados principalmente TGF- α (Fator de crescimento transformante-alfa) e VEGF-A (Fator de crescimento vascular – endotelial – A). Ocorre fibroplasia (aumento dos fibroblastos em número) e sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos (KNIGHTON; SILVER; HUNT, 1981; HARTLAPP et al, 2001).

As células endoteliais presentes no interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador do plasminogênio, isso se dá graças a estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores (WERNER e GROSE, 2003). O processo mitótico das células epidérmicas é rapidamente ativado, dessa maneira uma cicatriz é formada graças ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

Em relação aos queratinócitos pode-se observar que essas células passam a se apresentar de maneira hiperproliferativa e migratória, passando a produzir e secretar componentes da matriz extracelular e polipetídeos sinalizadores, há modificações em relação ao seu citoesqueleto direcionando a produção de queratina (MONTESANO e ORCI, 1988). A matriz celular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico (PORTH; MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

A fase seguinte de remodelamento pode durar desde meses até anos. Nessa fase é que há a reorganização do colágeno e um aumento de resistência do tecido cicatricial que passa a ganhar maior força tensil e torna-se hipocrômico. Após o fechamento da ferida e eliminação dos microrganismos, os linfócitos respondem pelo subsistema leucocitário mais numeroso em ferimentos humanos (CLARK e HERSON, 1988). E esses linfócitos não desempenham apenas papel de efetores imunes, mas também agem como produtores de fatores de crescimento (ENGELHARD et al, 1998). Os eosinófilos aparecem nas últimas fases do reparo e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (BLOTNICK et al, 1994).

No processo de remodelamento estão envolvidas várias etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. Inicialmente a deposição de colágeno é realizada de maneira aleatória, orientada para imediata organização da fibronectina e condicionada à natureza e direção das tensões que são aplicadas ao tecido. Em um segundo momento essas fibras passam por digestão graças à ação da collagenase, são novamente sintetizadas e passam a ser organizadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo localizado ao lado e são lateralmente conectadas graças a ligações covalentes. As ligações covalentes são formadas entre moléculas de tropocolágeno presentes na fibrila e outras fibrilas. Diversas vezes esse ciclo de lise, neossíntese, direcionamento e ligação, conduzem

para formação de fibras colágenas cada vez maiores, culminando numa configuração cada vez mais regular da cicatriz. Dessa maneira a cicatriz passa a ganhar resistência devido ao fato de que a organização das fibras acompanha as forças mecânicas impostas ao tecido durante o cotidiano. (HATANAKA e CURI, 2007; PORTH e MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

2.7. Terapêutica da úlcera péptica

Levando em conta que os principais fatores que levam a formação de úlceras no trato gastrointestinal estão diretamente envolvidos com o desequilíbrio entre os fatores que provocam dano da mucosa (como ácido e pepsina) e os agentes protetores (muco e bicarbonato), além da infecção por *H. pylori*, as estratégias de tratamento de úlceras visam corrigir ou atenuar estes problemas, baseadas nos mecanismos de ação dos fármacos disponíveis.

Os principais alvos farmacológicos para o tratamento de úlceras pépticas estão voltados para: substâncias capazes de reduzir a secreção ácida, substâncias que possam neutralizar o ácido presente no trato gastroduodenal, substâncias citoprotetoras que atuem potencializando os mecanismos de proteção da mucosa e substâncias ou combinação delas que possam mesclar os três mecanismos anteriores. (RANG et al., 2012). Os medicamentos mais utilizados na terapêutica das úlceras são os inibidores da bomba de prótons seguidos pelos antagonistas do receptores do tipo H_2 (GOODMAN et al., 2012).

Os sais de magnésio e de alumínio são representantes da classe dos antiácidos. Atuam de maneira a aumentar o pH do meio gástrico, graças à capacidade de neutralizar o ácido gástrico presente. São considerados importantes adjuvantes na terapêutica das úlceras. Os citoprotetores representados por: quelato de bismuto, sulcrafato, carbenoxolona e misoprostol; atuam protegendo a mucosa gástrica ou propiciando a formação de uma barreira física de muco na superfície da área ulcerada. (RANG et al., 2012).

A classe de inibidores da bomba de prótons é representada por pantoprazol, omeprazol, esomeprazol, lansoprazol e rabeprazol. São os medicamentos que se mostram mais potentes em relação à supressão da secreção de íons H^+ , uma vez

que são capazes de inibir por um longo tempo a bomba H^+/K^+ ATPase. Tratam-se de pró-fármacos que são ativados quando há contato com o meio ácido. Caracterizam-se por serem de bases fracas lipofílicas que tem a propriedade de se acumularem no ambiente ácido dos canálculos da célula parietal, local onde é ativado e bloqueia a secreção de ácido. (RANG et al., 2012; JAIN et al., 2007). Os antagonistas dos receptores de H_2 são capazes de inibir a secreção ácida, graças a propriedade de competir com a histamina pelos receptores H_2 nas células parietais. São rapidamente absorvidos pelo intestino. Exemplos de antagonistas de receptores de H_2 são: ranitidina, cimetidina, famotidina e nizatidina. (KATZUNG, 2006; RANG et al., 2012).

Quando a infecção por *H. pylori* é diagnosticada junto com úlcera péptica, é preciso que sejam associados antimicrobianos no esquema de tratamento clássico de úlceras. Normalmente associa-se antimicrobianos com antagonistas de receptores H_2 ou inibidores da bomba de prótons. Os principais esquemas de tratamento são:

- omeprazol/ amoxicilina/ metronidazol,
 - omeprazol/ claritromicina/ amoxicilina ou tetraciclina,
 - ranitidina/ metronidazol/ tetraciclina,
 - tetraciclina/ metronidazol/ compostos de bismuto
- (MÖSSER e CACA, 2005).

Tabela 1. Exemplos de fármacos utilizados no tratamento de úlcera péptica, suas respectivas estruturas e classificação segundo mecanismo de ação.

Mecanismo de ação	Exemplo de fármaco	Estrutura
Antagonistas dos receptores H₂ de histamina	Cimetidina
	Ranitidina
Inibidores da bomba de prótons	Omeprazol
	Lansoprazol
	Pantoprazol
Antiácidos	hidróxido de magnésio	$\text{HO}-\text{Mg}-\text{OH}$
	hidróxido de alumínio	$\text{HO}-\text{Al}(\text{OH})_2$
	bicarbonato de sódio	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-\text{Na}^+$

Mecanismo de ação	Exemplo de fármaco	Estrutura
Antibióticos	Amoxicilina
	Metronidazol
	Clarithromicina
	Tetraciclina
Citoprotetores	Carbenoxolona
	Misoprostol

Segundo Rang, quando se faz uso por longo tempo de inibidores da bomba de prótons ou de antagonistas de receptores H_2 , os pacientes podem ter alguns efeitos indesejáveis tal como: colite, diarreia, ginecomastia, tontura, além de haver a indução hiperplasia nas células gástricas, que pode levar a reincidência da úlcera e indução de processo neoplásico gástrico (RANG et al., 2012; BABU et al., 2010; KESZTHELYI et al., 2010).

Dessa forma, uma possível alternativa para o tratamento clássico que emprega fármacos sintéticos é a utilização de derivados vegetais. Várias substâncias oriundas de vegetais, dentre elas flavonoides, vem sendo relatadas como antiúlceras com atividade farmacológica satisfatória (BORRELI e IZZO, 2000; SANNOMIYA et al., 2005; ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

JUSTIFICATIVA

3. Justificativa

O grupo de pesquisa em Farmacognosia da FCF – USP, estuda há oito anos espécies do gênero *Passiflora*, realizando estudos farmacognósticos direcionados à avaliação da atividade antiulcerogênica, elucidação da estrutura de compostos isolados de material vegetal e caracterização botânica das espécies. O grupo já comprovou a atividade antiúlcera em ratos, de outras espécies de *Passiflora* em estudos anteriores, como no estudo de WASICKY, em 2007, em que demonstrou atividade antiúlcera do extrato bruto de *Passiflora alata*, com 100% de proteção, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. No mesmo estudo, o extrato bruto de *Passiflora nitida*, outra espécie brasileira, apresentou 27%, 74% e 92% de proteção frente as ulcerações estomacais, nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, respectivamente.

Em 2011 STRASSER demonstrou proteção de 72,6%, 75,8% e 75,5%, respectivamente para as doses de 100, 200 e 400 mg/ml do extrato bruto de *Passiflora serratodigitata*. No mesmo estudo, 50mg/kg das frações acetato de etila e aquosa residual do extrato bruto apresentaram proteção de 95,7% e 49,3% das ulcerações gástricas, respectivamente. O presente estudo avaliou a atividade antiúlcera de *Passiflora setacea* e de *Passiflora tenuifila* e sua toxicidade. Não há, até o momento, estudos farmacológicos dos extratos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, sendo, portanto, este projeto inédito. Os estudos realizados com estas espécies até o momento restringiram-se à área agrônômica, fitoquímica e alimentar (ATAÍDE, DE OLIVEIRA, RUGGIERO, 2012; CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; WONDRACEK, 2012; NOGUEIRA FILHO et al., 2011; PINELI et al., 2015).

O grupo de pesquisa em Farmacognosia da FCF–USP bem como o presente trabalho estão integrados ao projeto “Rede Passitec Etapa II: Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das *Passifloras* silvestres” proposto pela EMBRAPA e aprovado no Edital: Encomenda – CT- Biotecnologia 2012 COBRG (APQ), visando tanto do aspecto nutricional, toxicológico, como econômico de espécies de *Passiflora*.

OBJETIVOS

4. Objetivos

O Objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos dos extratos obtidos das drogas vegetais constituídas de folhas e caules de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*. Inicialmente foram utilizadas as duas espécies vegetais, visando a escolha daquela que apresentasse melhores resultados para continuação do estudo, no caso a *P.setacea*.

Objetivos específicos do trabalho:

- Elaborar extratos hidroalcoólicos secos de *P. setacea* e *P. tenuifila* e de suas frações;
- Realizar triagem fitoquímica;
- Determinar o perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto e das frações;
- Quantificar polifenóis totais no extrato bruto;
- Quantificar flavonoides no extrato bruto;
- Avaliar atividade antiulcerogênica aguda do extrato bruto;
- Avaliar a toxicidade aguda e sub-crônica do extrato bruto;
- Determinar o potencial mutagênico do extrato bruto;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto;
- Avaliar atividade anti *Helicobacter pylori* do extrato bruto.

METODOLOGIA

5. METODOLOGIA

5.1. Preparo de extratos secos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* e suas frações.

P. tenuifila Killip (Passifloraceae) e *P. setacea* D.C (Passifloraceae) foram cultivadas e coletadas na EMBRAPA CERRADOS. *P. tenuifila* foi cultivada na Fazenda Experimental da EMBRAPA CERRADOS – Rodovia Brasília/Fortaleza BR 020 Km 18 - Planaltina – DF - 15°36'12.44"S; 47°43'20.89"O e *P.setacea*, na fazenda São José da Serrinha, no município de Lajeado – TO, coordenadas 9°56'35" S; 48°13'16"O e altitude de 443m. O material vegetal (folhas e caules) foi recebido seco e submetido a nova secagem, previamente à moagem, em estufa com circulação de ar forçada de marca Fabbe®, a 40° C por 48 horas. Em seguida, foi pulverizado em moinho de facas e martelos de marca Thomas®, passando por tamis de 1 mm. Com o pó obtido foram elaborados os extratos. O extrato hidroetanólico liofilizado (EHEL) foi preparado de acordo com o método A da Farmacopéia Brasileira 2ª ed. (1959). O pó da droga permaneceu em maceração em etanol a 60% por 24 horas e foi realizada percolação com o mesmo solvente. O percolado foi concentrado em evaporador de película ascendente do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e a solução aquosa restante, liofilizada em liofilizador LK4, da marca Edwards do Brasil.

O extrato foi fracionado em hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol 50%.

5.2. Triagem Fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada com o pó da droga vegetal obtida a partir das folhas e caules de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, para os seguintes grupos de princípios ativos:

- Saponinas: teste de espuma (COSTA, 2001);

- Polifenóis: reação com cloreto férrico (FeCl_3) (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMAN, 2006);
- Flavonoides: cianidina (Shinoda), cloreto de alumínio e hidróxido de sódio (COSTA, 2001);
- Taninos: acetato de chumbo, proteína (gelatina), alcaloides, reação com FeCl_3 . (COSTA, 2001; SIMÕES; SCHENKEL; GOSMAN, 2006);
- Cumarinas: visualização em solução alcalina com aparecimento de coloração amarela, e visualização do extrato sob a luz UV (fluorescência azul ou verde) (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMAN, 2006);

5.3. Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto e das frações de *P. setacea* e *P. tenuifila*

O perfil cromatográfico em camada delgada dos extratos e frações foi desenvolvido, utilizando diversos sistemas cromatográficos, descritos por WAGNER E BLADT (1996). Nos sistemas cromatográficos selecionados, o extrato bruto liofilizado e cada fração obtida foram diluídos a 10% (m/v) nos seus respectivos líquidos extratores.

As melhores separações foram obtidas com o sistema para flavonoides:

Tamanho das placas de vidro: 20 x 20 cm

Suporte: Sílica gel G

Espessura da camada: 300 μm

Saturação da cuba: total

Percurso: distância: 12 cm; sentido: ascendente

Fase móvel: Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético Glacial + Água (120:11:11:07)

Revelador: difenilborinato de 2-aminoetila a 1% em metanol (NP)

Visualização: U.V a 366 nm e à luz do dia (ambos antes e após revelar).

CLAE foi realizada apenas para as amostras de *P.setacea*, pois foi a espécie que apresentou atividade antiúlcera mais promissora. As amostras foram analisadas em cromatógrafo analítico Shimadzu®, composto por bomba LC-10ADVP, câmara de mistura e degaseificador DGU-14A acoplados, injetor

manual 7725i, detector espectrofotométrico por arranjo de diodos modelo SPD-M10AVP, coluna Shim-pack® VP-ODS, 5 µm (4,6 x 250 mm), precedido por pré-coluna PREP ODS 20 x 250 mm. O aparelho foi conectado a um computador comportando o software “Multi System” Class VP® 6.12.

A escolha da fase móvel adequada, bem como os comprimentos de onda para a detecção dos picos, foi baseada em ensaios iniciais, após revisão bibliográfica de metodologias (LI et al., 2009; MULLER et al., 2005; ABOURASHED; VANDERPLANCK; KHAN, 2003).

5.4. Avaliação da atividade antiúlcera aguda dos extratos brutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*

A atividade antiúlcera foi avaliada utilizando o modelo de ulceração aguda (indução por etanol acidificado), de mecanismo mais geral e que indica ação protetora contra lesões ulcerativas

Foram utilizadas ratas - *Rattus norvegicus* (albino) - da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 180 g, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura (22 ± 2)° C e umidade controlada. Para adaptação, os animais permaneceram no local do experimento durante os 7 dias que antecederam o experimento. Na véspera, os animais foram mantidos em jejum por 10 horas. Os experimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da FCF-USP sob número 395. Foram realizados 2 ensaios, sendo um para cada espécie de *Passiflora*, empregando os EHELs. Esse modelo é preventivo, e avalia a proteção do extrato frente à formação das úlceras.

O experimento consistiu na divisão dos animais em 5 grupos com 7 indivíduos cada. Um dos grupos serviu como controle negativo (recebeu água), um recebeu Cloprostenol (controle positivo) na dose de 100 µg/kg, os outros três grupos receberam extrato ou fração de *Passiflora* nas doses de 400mg/kg, 200mg/kg e 100mg/kg. A administração aos ratos Wistar foi feita por via oral. O extrato foi

ressuspenso em água destilada, e administrado em concentração de 10 mL/kg. Após 30 minutos, foi administrado, também por gavagem, ácido clorídrico a 0,3 M em etanol a 60%, na concentração de 10 mL/kg. Uma hora após a administração do indutor, os animais foram mortos em câmara de CO₂ (MIZUI e DOTEUCHI, 1983).

Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, prensados entre placas de vidro e copiados por scanner para o computador. A área das ulcerações foi medida através do software Image-Pro Plus®. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância, seguida do teste de Tukey para análise de dados paramétricos, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5.5. Quantificação de flavonoides no extrato bruto de *P.setacea*

Para a quantificação foi empregado o método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl₃) como agente complexante. Isso porque, o íon Al³⁺ se complexam com os oxigênios vicinais presentes nos flavonoides, ocorrendo um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda, possibilitando a determinação da quantidade de flavonoides (MARCUCCHI; WOISKY; SALATINO, 1998). Abaixo está a Figura 8, representativa dos sítios quelantes possíveis presentes nos flavonoides.

Figura 8. Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio. (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopeia Francesa (POZZI, 2007). A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinada, após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl₃ a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm. As amostras foram analisadas em triplicatas.

Para a execução da técnica utilizou-se quercetina (Sigma Aldrich) em etanol 60% como padrão externo. A construção da curva de calibração foi preparada a partir da solução de quercetina nas seguintes concentrações: 250 µg/mL, 200 µg/mL, 175 µg/mL, 150 µg/mL, 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. A concentração de flavonoides foi calculada de acordo com a equação da reta, obtida da curva de calibração e expressa como equivalentes de quercetina por grama de extrato.

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto de *P.setacea*. Para isso preparou-se soluções em etanol 60 % com concentração de 2.5 mg/mL de extrato bruto. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

5.6. Quantificação de substâncias fenólicas no extrato bruto de *P.setacea*.

O método utilizado foi de Folin-Ciocalteu. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas, após 2 horas de reação no escuro, em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 760 nm. As amostras foram analisadas em triplicatas. Ácido gálico em etanol a 10% foi utilizado como padrão externo. A construção da curva de calibração foi preparada a partir da solução de ácido gálico nas seguintes concentrações: 85 µg/mL, 75 µg/mL, 65 µg/mL, 55 µg/mL, 45 µg/mL, 35 µg/mL e 25 µg/mL.

Para a realização da técnica foi empregado 50 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), 20 µL de amostra ou padrão, 30 µL de água destilada e 100 µL de carbonato de sódio a 700mM. Foi quantificado o extrato bruto *P.setacea*. Dessa maneira, preparou soluções em etanol a 10% a uma concentração de 500 µg/mL para o extrato bruto. Os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, com média seguida do seu respectivo erro padrão.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste do ácido fosfotúngstico/fosfomolibdênico e quando reage com compostos fenólicos há transferência de

elétrons formando um complexo de coloração azul e que pode ser espectrofotometricamente determinados. A reação ocorre em meio alcalino (AINSWORTH; GILLEPSIE, 2007).

5.7. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de *P. setacea*.

A atividade antioxidante do EHEL de *P. setacea* foi avaliada *in vitro* através do método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), preconizado por BRAND-WILLIAMS et al, 1995. O radical DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, que produz uma solução violácea em etanol. Em presença de substâncias antioxidantes o DPPH é reduzido e a solução etanólica torna-se incolor (BRAND-WILLIAMS; CURVELIER; BERSET, 1995).

A capacidade dos extratos vegetais liofilizados de reduzir o radical livre DPPH é visualizada através da perda da coloração das soluções. O padrão utilizado nos ensaios foi o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®).

Cada amostra foi processada em triplicata sendo inicialmente dissolvida em metanol 70% na concentração inicial de 50mg/mL. Uma diluição seriada(2, 5, 10 e 20 vezes) foi realizada com cada amostra empregando metanol 70%, observando-se a eventual formação de precipitado. As diluições do padrão foram obtidas de modo semelhante, sendo a solução inicial preparada também com metanol 70%. A amostra utilizada como branco foi preparada com o solvente (metanol 70%). A solução de DPPH foi preparada em metanol a 70%, na concentração de 20mg/mL. O procedimento foi realizado na ausencia de luz.

As amostras foram preparadas em placas de noventa e seis poços e lidas em leitor espectrofotométrico Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek®, no comprimento de onda de 517 nm, após vinte minutos em ausência de luz. A composição do meio reacional no ensaio pode ser observada na Tabela 2 e pode-se observar a reação de redução do radical 2,2- difenil-1-picril hidrazila (DPPH) por compostos fenólicos na Figura 9.

Tabela 2. Composição do meio reacional no ensaio de determinação da atividade antioxidante de extrato bruto de *P.setacea* com DPPH.

Amostra	Volume amostra	de Solvente	Volume DPPH
EHEL	50µL	Metanol 70%	250 µL
Branco	200µL	Metanol 70%	-
Trolox	50 µL	Metanol 70%	250 µL

Figura 9. Reação de redução do radical 2,2- difenil-1-picril hidrazila (DPPH) por compostos fenólicos (ROH) (MOLYNEUX; 2004).

O cálculo da porcentagem de descoloração da solução de DPPH foi efetuado da seguinte maneira :

$$\% \text{ de descoloração} = [(Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{branco}}] \times 100$$

Onde:

Abs_{branco} = Absorbância do branco

Abs_{amostra} = Absorbância amostra e ou Trolox[®]

A capacidade antioxidante da amostra de EHEL de *P.setacea* foi avaliada como equivalente em Trolox®, através da % de descoloração, da solução de DPPH, gerada pela adição da amostra.

5.8. Toxicidade aguda do extrato bruto de *P. setacea*

Para avaliação da toxicidade aguda, foram utilizados ratas Wistar (fêmeas) com 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em dois grupos de 5 indivíduos cada. O grupo tratado recebeu via oral dose única de 2000mg/kg de EHEL de *P.setacea* e o grupo controle, água (10mL/kg).

Realizou-se esse procedimento afim de que se utilizasse o menor número possível de animais, segundo a Guideline 425, da OECD, 2008. Cada animal do grupo foi observado por 14 dias em relação a sintomas de toxicidade e morte e, ao final deste período, o animal foi morto em câmara de CO₂, tendo seus órgãos (coração fígado, rins, baço e pulmões) coletados para posterior avaliação do aspecto macroscópico e de seus pesos relativos. Os parâmetros de peso corporal, consumo de água e de ração foram medidos por grupos de 5 animais, que se encontravam alojados na mesma gaiola.

5.9. Avaliação da toxicidade de administração reiterada durante 28 dias de extrato bruto de *P. setacea*.

Para este teste foram utilizados ratos da raça Wistar divididos em 4 grupos, três grupos teste (com 5 machos e 5 fêmeas, recebendo a dose de 1200, 800 e 400 mg/kg de EHEL de *P.setacea*) e um grupo controle de mesma constituição, recebendo água. Os animais receberam por gavagem EHEL ou água, durante 28 dias. Cada animal foi observado duas vezes ao dia quanto a sintomas de intoxicação. Ao final do ensaio, sob anestesia, o sangue dos animais foi coletado por punção na aorta abdominal (com consequente eutanásia) e submetido a testes bioquímicos e hematológicos.

Para avaliação hematológica dos animais foram analisados os seguintes parâmetros:

- número de leucócitos totais;
- número e porcentagem de leucócitos segmentados;
- número e porcentagem de leucócitos em anel;
- número e porcentagem de eosinófilos;
- número e porcentagem de linfócitos;
- número e porcentagem de monócitos;
- número de eritrócitos;
- concentração de hemoglobina;
- hematócrito;
- número de plaquetas;
- MCV;
- MCH;
- MCHC.

Para determinação dos parâmetros bioquímicos foram empregadas 3 a 5 amostras de soro, coletadas de ratos que foram submetidos às diferentes doses de extrato. (BORELLI et al., 1995; BORELLI e NARDINELLI, 2001).

Para avaliação bioquímica do sangue dos animais foram analisados os seguintes parâmetros:

- concentração sérica de AST,
- concentração sérica de ALT,
- concentração sérica de GGT,
- concentração sérica de fosfatase alcalina,
- glicemia,
- concentração sérica de proteínas totais,
- concentração sérica de albumina,
- concentração sérica de globulinas,
- concentração sérica de colesterol total e fração HDL,
- concentração sérica de triglicerídeos,
- concentração sérica de uréia,

- concentração sérica de creatinina.

Os órgãos foram observados macroscopicamente e análise histológica foi proposta. Para isto, fragmentos representativos de fígado, rim, coração, baço, pulmão foram previamente fixados em solução tamponada (pH= 7,4) de formaldeído a 10%, a serem incluídos em parafina. A seguir, seriam realizados cortes de 5µm de espessura, a serem corados pela hematoxilina-eosina e avaliados em microscópio de luz (Guideline 407, OECD). Os pesos dos órgãos, assim como o peso corporal, nos tratados e controles, foram comparados.

5.10. Avaliação da atividade anti *Helicobacter pylori* do extrato bruto de *P. setacea*

O ensaio foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara sob supervisão da Professora Doutora Tais Maria Bauab.

Helicobacter pylori (ATCC 43504) foi armazenado a -80 ° C em caldo de Muller - Hinton, contendo 15 % de glicerol até à sua utilização. No momento do uso o micro-organismo foi descongelado e cultivado em ágar de Muller-Hinton com 5 % de sangue de carneiro durante 4 dias a 37°C em 10 % de CO₂ e 98 % de umidade. Cada placa foi esfregada com um aplicador com ponta de algodão esterilizado e as células foram suspensas em solução salina estéril para obter uma turbidez equivalente ao padrão 2,0 McFarland (~ 10⁸ UFC / mL). A solução estoque de *P. setacea* foi preparada em 5% de dimetilsulfóxido aquoso (DMSO) (BERAHOU et al, 2007) para uma concentração final de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana.

As soluções estoque de amoxicilina (usados como controle) foram preparadas em DMSO. Diluições posteriores foram então realizadas utilizando água destilada estéril. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo procedimento de microdiluição em caldo . Caldo de Muller-Hinton contendo 10% de soro de cavalo foi adicionado a todos os poços de uma placa de 96 poços. Cada microplaca foi

incubada com *Helicobacter pylori* a uma concentração final de $\sim 1 \times 10^6$ UFC/ml e extrato em concentração de 2000 µg/mL em DMSO 20%. Utilizou-se cinco diluições em série, e a faixa de teste do extrato iniciou-se em 1000 µg/mL. O antibiótico foi testado em concentrações variando de 2 a 100 µg/mL.

As microplacas foram incubadas durante cinco dias sob atmosfera microaeróbia em 39°C. Após a incubação, as placas foram examinadas visualmente e espectrofotometricamente. A menor concentração que mostrou a inibição completa do crescimento foi registrada como a CIM, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute*, (KUSHIMA et al, 2009).

5.11. Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *P. setacea*

O ensaio foi realizado de acordo com o modelo de MARON E AMES (1983), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara sob supervisão da Professora Doutora Eliana Aparecida Varanda.

Uma vez que não foram encontrados dados na literatura referentes à mutagenicidade do extrato bruto de *P.setacea*, utilizou-se as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102, capazes de detectar as diferentes possibilidades de mutação gênica. As linhagens de *Salmonella typhimurium* foram armazenadas permanentemente em freezer a -70 °C, em ampolas com 0,9mL de meio de cultura e 0,1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), como agente crioprotetor.

As placas-mãe foram preparadas a cada dois meses e as características genéticas de cada cepa foram previamente avaliadas, como descrito abaixo.

Uma alíquota de cultura permanente foi inoculada em 30 mL de caldo nutriente e após 16 horas de incubação sob agitação de 150 a 170 rpm, a cultura foi estriada em placas de ágar nutriente, para isolamento de colônias.

Após incubação sob agitação a 37°C, inoculou-se cada cultura na forma de estrias grossas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina, histidina e ampicilina, e após incubação, as placas foram seladas com parafilme e mantidas sob refrigeração.

A taxa de reversão espontânea foi avaliada inoculando-se 100µL de cada cultura em 2,0mL de ágar de superfície, mantido em banho-seco a 45°C, e

vertendo-se a mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. Cada cultura foi inoculada em triplicata. A taxa de reversão espontânea foi avaliada 48 horas após a incubação a 37° C.

As culturas das diferentes cepas foram inoculadas com alça de platina em 30 mL de caldo nutriente, utilizando-se as placas-mãe como fonte de inóculo. Após crescimento por uma noite, a 37° C, sob agitação mecânica, as culturas foram mantidas sob refrigeração até o momento do teste.

As solução de extrato bruto de *P.setacea* foi preparada a uma concentração de 150mg/mL em DMSO e posteriormente foi realizada uma diluição seriada para os testes.

Aos tubos de ensaio, contendo 2 mL de ágar de superfície, previamente fundido e mantido a 45° C em banho seco, foram adicionadas as diferentes doses da solução de extrato bruto de *P.setacea*, 100 µL de cultura de cada linhagem (10⁹ células/mL) e, para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500 µL da mistura S9. Após homogeneização em agitador, o conteúdo do tubo foi vertido em placas de ágar mínimo. A cada ensaio, todas as doses e controles foram feitos em triplicata. Neste ensaio, as culturas foram submetidas a uma incubação prévia de 20 minutos a 37°C. Esta preincubação acontece antes da adição do Top ágar e da adição do S9.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37° C. Paralelamente a cada ensaio foi feito o controle negativo, inoculando-se 100 µL de DMSO, também em triplicata. Além do controle negativo, foi feito um controle positivo, utilizando-se as seguintes substâncias mutagênicas :

- 2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa) – para as linhagens TA97a, TA98 e TA100, na presença de S9 (ativação metabólica);
- 2-aminofluoreno (10,0 µg/ placa) – para a linhagem TA102 na presença de S9 (ativação metabólica);
- 4-nitro-o-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa) – para as linhagens TA97a e TA98 na ausência de S9 (sem ativação metabólica);
- Azida sódica (1,25 µg/ placa) – para a linhagem TA100 na ausência de S9 (sem ativação metabólica)
- Mitomicina C (0,5 µg/ placa) – para a linhagem TA102 na ausência de S9 (sem ativação metabólica)

Para a análise do presente ensaio foi utilizado o software gentilmente cedido pelo Professor Ames da Universidade da California Berkley, SALANAL (de Salmonella Analysis) baseado no modelo matemático de BERNSTEIN et al., 1982.

A razão de mutagenicidade (RM) é a média do número de revertentes na placa teste (espontânea e induzidos) dividido pela média do número de revertentes na placa controle negativo (espontâneos). Uma amostra é considerada positiva quando o RM é maior ou igual a dois em pelo menos, uma das doses do ensaio, com diferença significativa entre, pelo menos, uma dose testada e o controle.

Quando um destes critérios é observado, a amostra é considerada como apresentando indícios de mutagenicidade, segundo Mc GEORGE et al., (1985) e VALENTE (1990)

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Rendimento dos extratos secos de *P. setacea* e *P. tenuifila* e de suas frações

Para *P. setacea* partiu-se de 23kg de planta fresca e após secagem e perda de 61,7% de água obteve-se 9kg de droga vegetal resultando em um rendimento de 38,3%. Já para *P. tenuifila* partiu-se de 17 kg de planta fresca e obteve-se 6 kg de droga vegetal, obtendo-se rendimento de 35,14%.

O rendimento do extrato hidroetanólico de *P. tenuifila* e *P. setacea* após liofilização foi de 13,8% e 18,75% respectivamente a partir da droga.

Os fracionamentos para *P. tenuifila* e *P. setacea* foram realizados usando 50,10g e 50,06g respectivamente, do EHEL, e apresentaram os resultados mostrados na tabela 3 :

Tabela 3: Fracionamento de extrato bruto liofilizado de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Fração	<i>P. setacea</i> 50,06g		<i>P. tenuifila</i> 50,10g	
n-hexano	1,28g	2,56%	1,06g	2,11%
Clorofórmio	6,4g	12,8%	4,50g	9,0%
Acetato de etila	0,12g	0,24%	0,76g	1,51%
Hidroalcóolica (50%)	41,1g	82,1%	41,89g	83,61%

6.2.Triagem fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica do EHEL de *P. tenuifila* e *P. setacea* estão representados na Tabela 4:

Tabela 4: Triagem fitoquímica de *P. tenuifila* e *P. setacea*

Grupos de Princípios Ativos	Reações	Resultados	
		<i>P.setacea</i>	<i>P.tenuifila</i>
Glicosídeos saponínicos	Espuma	-	-
Glicosídeos flavonoídicos	Cloreto de Alumínio	++	+
	Hidróxidos alcalinos	++	+
	Shinoda	++	+
Taninos	Acetato de Chumbo	+	+
	Acetato de Cobre	+	+
	Cloreto Férrico	+	+
	Alcalóides	+	+
	Gelatina	+	+
Alcalóides	Dragendorff	-	-
	Bouchardat	-	-
	Bertrand	-	-
	Mayer	-	-
Cumarinas	Hidroxilamina	-	-
Antraquinonas	Bornträger	-	-

6.3. Perfil Cromatográfico do extrato bruto e das frações de *P. setacea* e *P. tenuifila*

O perfil cromatográfico do EHEL e das frações de *P.setacea* e *P.tenuifila*, está representado na Figura 10.

Figura 10. CCD do extrato bruto (A), frações de n-hexano(B), clorofórmio(C), acetato de etila(D) e hidroetanólica(E) do EHEL de *P. setacea* e do extrato bruto (F), frações de n-hexano(G), clorofórmio(H), hidroetanólica (I) e acetato de etila (J) do EHEL de *P. tenuifila*; Rutina (K) e Quercetina (L) como padrão. FE: água, suporte: Silica gel G, distância: 14cm, revelador: NP, visualização UV 366nm. Fase móvel: Acetato de Etila + Ácido Fórmico + Ácido Acético Glacial + Água (120:11:11:07)

O perfil cromatográfico do EHEL de *P.setacea* bem como o da fração acetato de etila e hidroetanólica obtidas do EHEL, por CLAE, estão representados pelas Figuras 11,12, 13, respectivamente.

Figura 11. Cromatograma do EHEL de *P.setacea* (1mg/mL). Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos.

Figura 12. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do EHEL de *P.setacea*. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos.

Figura 13. Cromatograma da fração hidroetanólica (1mg/mL) obtida a partir do EHEL de *P.setacea*. Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B (Acetonitrila) em 60 minutos.

6.4. Avaliação da atividade antiúlcera aguda dos extratos brutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

O EHEL de *P.setacea* exibiu atividade antiúlcera, no modelo de indução aguda, como pode-se observar na Figura 14. Houve significativa redução da área relativa ulcerada nas doses de 200 e 400 mg/kg em relação ao grupo controle negativo (água), o grupo controle positivo (Cloprostenol) houve inibição quase total da formação de úlceras. A Tabela 5 resume os resultados obtidos.

Figura 14: Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHEL de *P. setacea*, e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico (1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o percentual de área ulcerada e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação ao controle (água). (ANOVA seguida de Tukey)

Tabela 5. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHEL de *P.setacea*, e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico (1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação ao controle (água). (ANOVA seguida de Tukey)

Grupo	Área relativa de lesão ± erro padrão
Água	12,75±2,79
100 mg/kg	11,64±2,31
200 mg/kg	2,39±0,67 **
400 mg/kg	0,43±0,25 ***
Cloprostenol	0,33±0,19 ***

O EHEL de *P.tenuifila* exibiu aparente atividade antiúlcera, no modelo de indução aguda, como pode-se observar na Figura 15, entretanto não houve diferença significativa na redução da área relativa ulcerada nas doses de 100, 200 e

400 mg/kg em relação ao grupo controle negativo (água), o grupo controle positivo (Cloprostenol) houve inibição quase total da formação de úlceras. A Tabela 6 resume os resultados obtidos. Desta maneira optou-se em dar continuidade ao estudo apenas com a *P. setacea*.

Figura 15. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHEL de *P. tenuifila*, e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico (1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o percentual de área ulcerada e as abcissas os grupos componentes do ensaio. *** p<0,001 em relação ao controle (água) (ANOVA seguida de Tukey) em relação à água.

Tabela 6. Médias das áreas relativas ulceradas nos grupos constituintes do ensaio antiúlcera empregando EHEL de *P. tenuifila*, e dos grupos controle positivo (Cloprostenol) e controle negativo (água) em modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico (1ml/100g de massa corpórea). Cada valor corresponde à média do número de animais (n) ± erro padrão. ** p<0,01; *** p<0,001. (ANOVA seguida de Tukey) em relação à água.

Grupo	Área relativa de lesão ±Erro padrão
Água	15,07±3,65
100mg/kg	16,44±2,02
200 mg/kg	12,42±1,69
400 mg/kg	10,84±2,09
Cloprostenol	0,31±0,06***

6.5. Quantificação de flavonoides no extrato bruto de *P.setacea*

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto de *P.setacea*. Quercetina foi utilizada como padrão externo para a construção da curva de calibração. Foi escolhida por ser uma aglicona presente na maioria dos flavonoides identificados para espécie. Abaixo segue os resultados expressos em equivalentes de quercetina por grama de extrato (Figura 16 e Tabela 7).

Figura 16. Curva de calibração da quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato bruto *P.setacea*.

Tabela 7. Quantificação de flavonoides totais utilizando $AlCl_3$ como agente complexante. Os resultados de flavonoides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.

Amostra	Flavonoides totais (mg/g de extrato)	Porcentagem (%)
Extrato bruto	3,10±0,20	0,31±0,02

6.6. Quantificação de substâncias fenólicas no extrato bruto de *P.setacea*

A quantificação de substâncias fenólicas foi realizada para o extrato bruto de *P.setacea*. O ácido gálico foi escolhido como padrão externo para a construção da

curva de calibração (Figura 17 e Tabela 8). E os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Figura 17. Curva de calibração do ácido gálico, utilizada para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato bruto de *P.setacea*.

Tabela 8. Quantificação de substâncias fenólicas utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do seu erro-padrão.

Amostra	Fenólicos totais (mg/g de extrato)	Porcentagem (%)
Extrato bruto	27,05±0,40	2,70±0,04

6.7. Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de *P. setacea*

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH radical para o extrato bruto de *P. setacea*. Trolox[®] foi utilizado como substancia de referência. Conforme pode-se observar na Figura 18.

Figura 18. Curva de calibração da porcentagem de descoloração da solução de DPPH referente à concentração do padrão externo Trolox®.

A diluição 5 vezes foi eleita para a realização dos cálculos, por encontrar-se dentro da curva

O valor equivalente em Trolox® do EHEL de *P.setacea* no ensaio de determinação de atividade antioxidante foi de $11,65 \pm 1,47 \mu\text{mol/g}$ (média $\pm$ erro padrão).

6.8. Avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto de *Passiflora setacea*

Não houve nenhuma morte durante o experimento e observou-se que antes da administração de água ou EHEL de *P.setacea* aos animais, eles se encontravam com piloereção moderada. Após a administração do EHEL ao grupo correspondente observou-se dificuldade para movimentação, ptose palpebral parcial. Os efeitos puderam ser observados 10 minutos após a administração do EHEL de *P.setacea*. Os efeitos perduraram por cerca de 80 minutos de maneira mais acentuada e posteriormente foram desaparecendo progressivamente. Os efeitos iniciais observados puderam deixar de ser notados após 4 horas do início do experimento. Os animais se mantiveram normais, sem nenhuma alteração de comportamento ou estado de saúde até o fim do experimento.

Os animais tiveram alguns parâmetros acompanhados durante o experimento, são eles: Consumo de ração (Figura 19 e Tabela 9), Consumo de água (Figura 20 e Tabela 10) e variação de peso (Figura 21 e Tabela 11). Ao final do experimento alguns órgãos foram coletados e seus pesos relativos foram medidos (Figura 22 e Tabela 12).

Figura 19. Consumo médio de ração pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *P.setacea*, sendo que as ordenadas representam o consumo médio de ração médio por animal (gramas) durante 48 horas e as abcissas os dias que foram medidos.

Tabela 9. Consumo médio de ração pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *P.setacea*.

Período	Massa de ração consumida pelos animais	
	Controle	<i>P. setácea</i>
24/06 – 26/05	33,52g	33,26g
26/06 – 28/05	33,50g	33,20g
28/06 – 30/05	41,48g	49,5g
30/06 – 02/06	46,02g	53,00g
02/06 – 04/06	38,12g	43,20g
04/06 – 06/06	20,0g	44,00g
06/06 – 08/06	34,6g	48,70g

Figura 20. Consumo médio de água pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *P.setacea*, sendo que as ordenadas representam o volume médio (Mililitros) de água consumida por animal em 48 horas e as abscissas os dias que foram medidos.

Tabela 10. Consumo médio de água pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *P.setacea*.

Período	Volume de água consumida	
	Controle	<i>P. setácea</i>
24/06 – 26/05	65mL	75 MI
26/06 – 28/05	67 mL	70 mL
28/06 – 30/05	80 mL	90 mL
30/06 – 02/06	165 mL	185 mL
02/06 – 04/06	85 mL	80 mL
04/06 – 06/06	90 mL	85 mL
06/06 – 08/06	85 mL	85 mL

Figura 21. Variação média de peso pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda do EHEL de *P.setacea*, sendo que as ordenadas representam o peso médio dos animais (gramas) a cada 48 horas e as abcissas os dias em que foram pesados.

Tabela 11. Variação média de peso pelos grupos de animais no transcorrer do experimento de avaliação da toxicidade aguda de *P.setacea*.

Data	Pesos	
	Controle	<i>P. setácea</i>
24/06	182,8 g	192,6 g
26/06	191,0 g	199 g
28/06	199,6 g	206 g
30/06	209,8 g	219,8 g
02/06	209,8 g	222,6 g
04/06	211,2 g	218,6 g
06/06	218,3 g	227,6 g
08/06	225,7g	237,2 g

Figura 22. Pesos relativos dos órgãos coletados ao final do experimento dos grupos, tratado e controle, sendo que as ordenadas representam o percentual dos pesos relativo seguidos do erro padrão e as abcissas os grupos componentes do ensaio. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Tabela 12. Pesos relativos dos órgãos dos grupos componentes do ensaio empregando *P. setacea*.

Órgão	Peso relativo médio (%) $\pm$ erro padrão	Grupo
Coração- Pulmão	0,992$\pm$0,071	Controle
Coração- Pulmão	1,128$\pm$0,049	Tratado
Rim	0,842$\pm$0,025	Controle
Rim	0,876$\pm$0,019	Tratado
Baço	0,266$\pm$0,068	Controle
Baço	0,201$\pm$0,013	Tratado
Fígado	5,177$\pm$0,229	Controle
Fígado	4,935$\pm$0,196	Tratado

6.9. Avaliação da toxicidade de administração reiterada durante 28 dias de extrato bruto de *P.setacea*.

Esse ensaio foi realizado com a administração reiterada de extrato de *P.setacea* por 28 dias consecutivos, não houve nenhuma morte durante o experimento e os animais apresentaram-se fisicamente saudáveis e normais, nenhum sinal ou sintoma de intoxicação pôde ser notado. A variação de peso dos animais foi acompanhada individualmente, porém apenas para o controle da dose de extrato que era administrada ao animal diariamente. Os consumos de água e ração foram acompanhados, porém sem nenhuma diferença entre os diferentes grupos. Para avaliação da toxicidade ao final do experimento os animais foram anestesiados, amostras de sangue foram coletados, para realização de testes bioquímicos e hematológicos, e posteriormente os animais foram mortos. Os órgãos tiveram seus pesos relativos mensurados e fragmentos retirados para o preparo de lâminas histológicas.

6.9.1. Testes bioquímicos

Alguns parâmetros apresentaram diferença significativa em relação ao controle, são eles :

- concentração sérica de albumina em fêmeas do grupo 1200mg/kg (Figura 23 e Tabela 13);
- concentração sérica de ALT em fêmeas do grupo 1200mg/kg (Figura 24 e

Tabela 14);

- concentração sérica de creatinina em machos do grupo 800mg/kg (Figura 25 e Tabela 15);
- concentração sérica de GGT em machos dos grupos 400, 800, 1200 mg/kg (Tabela 16 e Figura 26) e fêmeas do grupo 1200mg/kg (Figura 27 e Tabela 17).

Tabela 13. Concentração média de albumina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$ em relação ao controle.(ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de albumina $\pm$ erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	4,54 $\pm$ 0,05**
Fêmeas 800mg/kg	4,47 $\pm$ 0,09
Fêmeas 400mg/kg	4,70 $\pm$ 0,1
Fêmeas controle	4,25 $\pm$ 0,01

Figura 23. Concentração média de albumina dos grupos controle e tratados, de ratos

fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de albumina (g/dL) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey) F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).

Tabela 14. Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Fêmeas 1200mg/kg	98,75 $\pm$ 4,58**
Fêmeas 800mg/kg	75,00 $\pm$ 1,7
Fêmeas 400mg/kg	73,25 $\pm$ 5,05
Fêmeas controle	75,40 $\pm$ 4,08

Figura 24. Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de ALT (U/L) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p<0,01$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).

Tabela 15. Concentração média de creatinina (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de creatinina $\pm$ erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	1,57 $\pm$ 0,24
Machos 800mg/kg	2,09 $\pm$ 0,41*
Machos 400mg/kg	1,21 $\pm$ 0,01
Machos controle	1,21 $\pm$ 0,03

Figura 25. Concentração média de creatinina dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHCL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de creatinina (mg/dL) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle; (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 16. Concentração média de GGT (Gama-glutamyl transferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHCL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. *** $p<0,001$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de GGT (Gama-glutamyl transferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Machos 1200mg/kg	0,80 $\pm$ 0,20***
Machos 800mg/kg	1,66 $\pm$ 1,20***
Machos 400mg/kg	0 $\pm$ 0***
Machos controle	0,40 $\pm$ 0,24

Figura 26. Concentração média de GGT dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de GGT (U/L) e as abscissas os grupos componentes do ensaio. *** $p<0,001$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 17. Concentração média de GGT (Gama-glutamil transferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. *** $p<0,001$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de GGT (Gama-glutamil transferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Fêmeas 1200mg/kg	0,50 $\pm$ 0,28***
Fêmeas 800mg/kg	0,20 $\pm$ 0,20
Fêmeas 400mg/kg	1,00 $\pm$ 0,70
Fêmeas controle	1,00 $\pm$ 0,31

Figura 27. Concentração média de GGT dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a concentração média de GGT (U/L) e as abcissas os grupos componentes do ensaio. *** $p<0,001$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).

6.9.2. Análises hematológicas

Dentre todos os parâmetros hematológicos analisados houve alguns que apresentaram diferença significativa em relação ao controle, são eles:

- hematócrito em machos do grupo 800mg/kg (Figura 28 e Tabela 18);
- MCHC em machos do grupo 800mg/kg (Figura 29 e Tabela 19);
- MCV em machos do grupo 800mg/kg (Figura 30 e Tabela 20);
- concentração de hemoglobina em machos do grupo 800mg/kg (Figura 31 e Tabela 21);
- número de plaquetas em machos do grupo 800mg/kg (Figura 32 e Tabela 22);
- porcentagem e número de linfócitos em machos dos grupos 800 e

1200mg/kg (Figura 33 e 34 e Tabela 23 e 24);

- porcentagem de leucócitos segmentados em machos dos grupos 400 e 1200mg/kg (Figura 35 e Tabela 25);

Tabela 18. Hematócrito médio (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Hematócrito médio $\pm$ erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	43,58 $\pm$ 0,35
Machos 800mg/kg	43,33 $\pm$ 0,88**
Machos 400mg/kg	45,26 $\pm$ 1,41
Machos controle	47,38 $\pm$ 1,00

Figura 28. Hematócrito médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o hematócrito médio (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 19. MCHC médio (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	MCHC médio $\pm$ erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	34,32 $\pm$ 0,22
Machos 800mg/kg	34,95 $\pm$ 0,65*
Machos 400mg/kg	33,94 $\pm$ 0,51
Machos controle	33,18 $\pm$ 0,08

Figura 29. MCHC médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o MCHC médio (g/dL) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).30

Tabela 20. MCV médio (μm^3) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao controle. (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	MCV médio $\pm$ erro padrão (μm^3)
Machos 1200mg/kg	57,80 $\pm$ 0,86
Machos 800mg/kg	60,00 $\pm$ 1,00*
Machos 400mg/kg	56,80 $\pm$ 0,58
Machos controle	58,40 $\pm$ 0,40

Figura 30: MCV médio dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o MCV médio (μm^3) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 21. Concentração média de hemoglobina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Concentração média de hemoglobina $\pm$ erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	14,96 $\pm$ 0,12
Machos 800mg/kg	15,15 $\pm$ 0,25*
Machos 400mg/kg	15,38 $\pm$ 0,48
Machos controle	15,72 $\pm$ 0,30

Figura 31. Concentração média de hemoglobina dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a média de hemoglobina (g/dL) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 22. Número médio de plaquetas por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Número médio de plaquetas $\times 10^3$ por mm^3 de sangue $\pm$ erro padrão
Machos 1200mg/kg	783,20 $\pm$ 39,18
Machos 800mg/kg	702,50 $\pm$ 96,50**
Machos 400mg/kg	805,60 $\pm$ 14,98
Machos controle	849,60 $\pm$ 28,27

Figura 32. Número médio de plaquetas por mm³ de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o número médio de plaquetas por mm³ de sangue dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** p<0,01 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 23. Porcentagem média de linfócitos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão. * p<0,05 em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Porcentagem média de linfócitos ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	83,2±1,40*
Machos 800mg/kg	92,50±0,28
Machos 400mg/kg	86,80±2,15
Machos controle	90,60±1,08

Figura 33. Porcentagem média de linfócitos dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a porcentagem média de linfócitos (%) dos grupos controle e tratados e as abscissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle)

Tabela 24. Número médio de linfócitos por mm^3 de sangue grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Número médio de linfócitos por mm^3 de sangue $\pm$ erro padrão
Machos 1200mg/kg	2866,00 $\pm$ 107,10*
Machos 800mg/kg	2684,00 $\pm$ 168,60*
Machos 400mg/kg	3280,00 $\pm$ 156,31
Machos controle	3595,03 $\pm$ 242,36

Figura 34. Número médio de linfócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o número médio de linfócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 25. Porcentagem média de leucócitos segmentados (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Porcentagem média de leucócitos segmentados $\pm$ erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	13,60 $\pm$ 0,97*
Machos 800mg/kg	6,33 $\pm$ 0,33
Machos 400mg/kg	15,00 $\pm$ 2,60*
Machos controle	7,83 $\pm$ 0,90

Figura 35. Porcentagem média de leucócitos segmentados dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam a porcentagem média de leucócitos segmentados (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

6.9.3. Pesos relativos dos órgãos coletados

Os pesos relativos de coração, pulmões, rins, fígado e baço foram avaliados. Observou-se diferença significativa em:

- Baço em fêmeas do grupo de 400mg/kg (Tabela 26 e Figura 36);
- Fígado em machos do grupo de 1200mg/kg (Figura 37 e Tabela 27) e fêmeas do grupo de 400mg/kg (Figuras 38 e Tabelas 28).

Tabela 26: Peso relativo médio de baço (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Peso relativo médio do baço $\pm$ erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,26 $\pm$ 0,01
Fêmeas 800mg/kg	0,31 $\pm$ 0,03
Fêmeas 400mg/kg	0,34 $\pm$ 0,03*
Fêmeas controle	0,21 $\pm$ 0,01

Figura 36. Peso relativo médio do baço dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do baço (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. * $p<0,05$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).

Tabela 27. Peso relativo médio de fígado (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Peso relativo médio do fígado $\pm$ erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	4,50 $\pm$ 0,17**
Machos 800mg/kg	4,01 $\pm$ 0,09
Machos 400mg/kg	3,87 $\pm$ 0,08
Machos controle	3,67 $\pm$ 0,09

Figura 37. Peso relativo médio do fígado dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do fígado (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). M1200: machos 1200mg/kg, M800: machos 800mg/kg, M400: machos 400mg/kg, MA: machos água (controle).

Tabela 28. Peso relativo médio de fígado (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. ** $p<0,01$ (ANOVA seguida de Tukey).

Grupos	Peso relativo médio do fígado $\pm$ erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	3,76 $\pm$ 1,77
Fêmeas 800mg/kg	3,64 $\pm$ 0,95
Fêmeas 400mg/kg	4,82 $\pm$ 0,90**
Fêmeas controle	3,76, $\pm$ 2,31

Figura 38. Peso relativo médio do fígado dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão. Sendo que as ordenadas representam o peso relativo médio do fígado (%) dos grupos controle e tratados e as abcissas os grupos componentes do ensaio. ** $p<0,01$ em relação ao controle (ANOVA seguida de Tukey). F1200: fêmeas 1200mg/kg, F800: fêmeas 800mg/kg, F400: fêmeas 400mg/kg, FA: fêmeas água (controle).

6.10. Avaliação da atividade anti *Helicobacter pylori* do extrato bruto de *P. setacea*

Após a avaliação da atividade anti *Helicobacter pylori* do extrato bruto de *P.setacea*, obteve-se a Tabela 29, que resume os resultados obtidos.

Tabela 29. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) do extrato bruto de *P.setacea* e Controle com amoxicilina no ensaio de avaliação da atividade anti- *Helicobacter pylori*.

Composto avaliado	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato bruto de <i>P.setacea</i>	250
Controle com Amoxicilina	15

5.11. Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *P. setacea*

O potencial mutagênico do extrato bruto de *P.setacea* foi expresso através da média±desvio-padrão do número de revertentes/placa e pela razão de mutagenicidade (RM) – em diferentes linhagens de *S. typhimurium* após o tratamento com o extrato de *Passiflora setacea*, em diferentes concentrações; avaliou-se com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. As Tabelas 30 e 31 resumem os resultados obtidos.

Tabela 30. Atividade mutagênci expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o razão de mutagenicidade (RM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98 e TA97a de *S. typhimurium* após o tratamento com *Passiflora setacea*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamentos	Número de Revertentes (M ± DP)/ placa e RM			
	TA 97 a		TA98	
mg/ placa	-S9	+S9	-S9	+S9
0,0^a	132±19	153±12	26±3	32±3
1,9	124±27 (0,9)	141±19 (0,9)	27±2 (1,0)	36±6 (1,1)
3,7	107±22 (0,8)	119±12 (0,8)	29±1 (1,1)	30 ±6 (0,9)
7,5	98±19 (0,7)	112±22 (0,7)	37±3 (1,4)	33±7 (1,0)
11,2	88±21 (0,7)	95±7 (0,6)	35 ±4 (1,3)	30±3 (0,9)
15,0	99±14 (0,8)	90±9 (0,6)	33±6 (1,2)	29±1 (1,2)
C+	1693±179 ^b	2419±154 ^e	1321±171 ^b	1761±138 ^e

M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C+): ^b4-nitro-o-fenilenodiamino (NPD – 10,0 µg/ placa); e ^e2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/ placa).

Tabela 31. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o razão de mutagenicidade (RM - valor entre parênteses) nas linhagens TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com *Passiflora setacea*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamentos	Número de Revertentes (M $\pm$ DP)/ placa e RM			
	TA 100		TA102	
mg/ placa	-S9	+S9	-S9	+S9
0,0^a	111 $\pm$ 9	96 $\pm$ 8	283 $\pm$ 51	336 $\pm$ 28
1,9	124 $\pm$ 18 (1,1)	130 $\pm$ 26 (1,3)	220 $\pm$ 28 (0,8)	301 $\pm$ 14 (0,9)
3,7	130 $\pm$ 17 (1,2)	116 $\pm$ 19 (1,2)	245 $\pm$ 16 (0,9)	326 $\pm$ 24 (1,0)
7,5	131 $\pm$ 11 (1,2)	122 $\pm$ 15 (1,3)	258 $\pm$ 22 (0,9)	299 $\pm$ 22 (0,9)
11,2	130 $\pm$ 18 (1,2)	115 $\pm$ 24 (1,2)	278 $\pm$ 24 (1,0)	319 $\pm$ 36 (1,0)
15,0	131 $\pm$ 25 (1,2)	117 $\pm$ 12(1,2)	259 $\pm$ 25 (0,9)	318 $\pm$ 35 (0,9)
C+	1181 $\pm$ 153 ^c	999 $\pm$ 110 ^e	1692 $\pm$ 184 ^d	1963 $\pm$ 206 ^f

M $\pm$ DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 μ L/placa; Controle positivo (C+): ^cAzida Sódica (AZS - 1,25 μ g/placa), ^dMitomicina C (MMC - 0,5 μ g/placa), ^e2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 μ g/ placa), ^f2-aminofluoreno (2-AF - 10 μ g/ placa).

DISCUSSÃO

7. Discussão

O uso das plantas no alívio, prevenção, tratamento e cura de muitas enfermidades é tão antigo quanto registros do surgimento da espécie humana (MACIEL et al., 2002). As plantas medicinais constituem uma fonte de grande diversidade de compostos químicos e produtos naturais que apresentam alta relevância na descoberta de novos fármacos (KOHEN; CARTER, 2005). O emprego de espécies vegetais por certas populações indígenas, no tratamento de doenças, é revelado por estudos etnobotânicos. Os estudos etnobotânicos são de suma importância não somente para a conservação da cultura tradicional dessas populações e preservação da biodiversidade, mas também pelo fato de que através desses estudos que se dá a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico (BEKALO; WOODMATAS; WOLDEMARIAM, 2009).

As plantas medicinais são capazes de produzir inúmeros fármacos importantes, os quais bem provavelmente não seriam obtidos sinteticamente. Há também a possibilidade da produção de compostos que podem sofrer ligeira modificação estrutural via síntese orgânica, podendo os tornar menos tóxicos e com maior efetividade no tratamento de doenças, além do fato de que produtos naturais podem ser empregados como modelos para a obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes às dos compostos de referência (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997).

Apesar de o interesse da indústria farmacêutica estar voltado para modelagem molecular, química combinatória entre outras técnicas, para a produção de compostos sintéticos, o papel dos produtos naturais, sobretudo os provenientes de plantas medicinais, continua figurando uma importante fonte de novas moléculas. (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Uma das inúmeras vantagens apresentadas por produtos fitoterápicos é a possibilidade de uma extensa variedade de efeitos farmacológicos em comparação a fármacos isolados. Com isso torna-se mais fácil contornar possíveis eventos adversos causados por esses fármacos (KOHEN; CARTER, 2005). Um corriqueiro exemplo de evento adverso associado ao uso de fármacos é o surgimento de úlcera gástrica induzida por anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). O mecanismo ocorre pela redução da síntese de prostaglandinas no organismo, culminando na diminuição da produção de muco

gástrico e conseqüentemente redução da proteção da mucosa gástrica contra a secreção gástrica, levando à formação da úlcera (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Grande parte dos estudos sobre o gênero *Passiflora* relaciona-se ao isolamento e à elucidação da estrutura dos diversos compostos; entretanto, poucos são os relatos que apresentam relação entre ensaios farmacológicos e estudos fitoquímicos. Ademais, a maior parte dos estudos farmacológicos do gênero dirige-se às atividades sobre o sistema nervoso central, destacando-se a atividade ansiolítica e sedativa.

Na pesquisa empregando extratos vegetais com atividade antiúlcera utilizam-se concentrações de até 1000mg/kg. Entretanto, alguns autores sugerem a utilização de concentrações inferiores a 300 ou 400 mg/kg (BORRELLI e IZZO 2000). Neste trabalho foram utilizada soluções de 100, 200 e 400mg/kg.

No ensaio da atividade antiúlcera aguda, o extrato bruto de *P.tenuifila* não apresentou resultados significativos nas três doses ensaiadas em relação ao controle negativo, enquanto que *P.setacea* apresentou resultados significativos em relação ao controle negativo em duas das três doses ensaiadas. Para a dose de 200 e 400mg/kg de *P.setacea* observou-se uma área relativa de lesão $\pm$ erro padrão de $2,39 \pm 0,67\%$ ($p < 0,01$) e $0,43 \pm 0,25\%$ ($p < 0,001$), respectivamente o que mostra uma tendência de dose-resposta. Como o foco do trabalho é a avaliação da atividade antiúlcera e a proposta inicial era ensaiar previamente duas espécies e aquela que se apresentasse mais promissora em relação à atividade antiúlcera, seria eleita para continuidade no trabalho, neste caso a escolhida foi *P.setacea*.

A presença de compostos polifenólicos, principalmente flavonoides e taninos, foi confirmada no EHEL de *P.setacea*. Na triagem inicial se identificou flavonoides e taninos e posteriormente foi feita a cromatografia em camada delgada para delinear o perfil flavonoídico do extrato. Ao se analisar a placa cromatográfica nota-se diversas manchas que evidenciam a presença dos flavonoides, entretanto nenhuma se assemelhou aos padrões utilizados, rutina e quercetina. No ensaio de quantificação de flavonoides obteve-se $3,1 \pm 0,2$ mg (média $\pm$ erro padrão) de flavonoides por grama de extrato bruto de *P.setacea* e $27,05 \pm 0,4$ mg de compostos fenólicos por grama de extrato bruto de *P.setacea*. WASICKY (2007) identificou $6,7 \pm 0,1$ mg de flavonoides/g de extrato bruto de folhas e caules de *P.alata* e

2,3±0,1mg mg de flavonoides/g de extrato bruto de folhas e caules de *P.nitida*. BERALDO em 2008, ao quantificar flavonoides no extrato hidroetanólico de folhas e caules de *P.edulis* e obteve a quantidade de 12,1±1,3 mg de falvonoides/g de extrato.

Em seu estudo PINELI et al. 2015, quantificou o conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos de folhas de *P.setacea*, em extrato etanólico 40%, e obteve resultados bastante próximos dos obtidos nesse trabalho com extrato etanólico 60% oriundo de folhas e caules de *P.setacea*. PINELI et al. obteve 3,08±0,09mg (média±erro padrão) de flavonóides por grama de extrato e 22,17±2,39mg (média±erro padrão) de compostos fenólicos por grama de extrato. Nota-se que dentre os vários estudos, que envolvem quantificação de flavonoides e compostos polifenólicos, apresentados na revisão bibliográfica deste trabalho, o valores obtidos, neste trabalho, do conteúdo de flavonoides e compostos polifenolicos do extrato bruto de *P.setacea*, estão dentro da faixa característica para *Passifloras*.

Extratos vegetais contendo flavonóides podem inibir a atividade da bomba de prótons ou aumentar a secreção de muco e PGE₂ , o que pode explicar sua atividade antiulcerogênica. GRACIOSO et al. (2002), investigando a atividade antiúlcera de *Turnera ulmifolia* L., Turneraceae, através do modelo de indução aguda por etanol, apontaram a atividade antiúlcera relacionada à presença de flavonas C-glicosiladas derivadas da apigenina e luteolina, presentes na fração ativa. Os flavonoides de maneira geral, protegem a mucosa gástrica contra uma série de agentes ulcerogênicos em distintas espécies de mamíferos. (GRACIOSO et al.,2002)

Como resultado, muitos estudos tem sido realizados com plantas contendo flavonoides ou até mesmo flavonoides sintéticos, para verificação da atividade. Apesar destes resultados promissores poucos flavonoides são explorados comercialmente devido a suas propriedades antiulcerogenicas. (GRACIOSO et al., 2002).

Considera-se que a maioria dos flavonoides e compostos polifenólicos sejam dotados de capacidade antioxidante e que esta atividade é muito importante para a proteção da mucosa gástrica contra o estresse oxidativo e na facilitação da cicatrização da mucosa gástrica (BENAVENTE-GARCIA et al. 1997; KARAKOYUN

et al., 2009). Assim, foi realizada uma investigação da capacidade antioxidante, pelo método de radical DPPH, do extrato bruto de *P.setacea*, visando uma proposta para o mecanismo de ação da atividade antiúlcera observada. No experimento de determinação da capacidade antioxidante observou-se que o extrato bruto apresentou valor em equivalentes de Trolox® $11,65 \pm 1,47$ $\mu\text{mol/grama}$ de extrato, o que poderia contribuir parcialmente para o processo de gastroproteção. Não foi realizada a avaliação da atividade antiúlcera aguda empregando as frações acetato de etila e hidroetanólica provenientes do extrato bruto de *P.setacea*. A fração acetato de etila apresentou um rendimento baixíssimo (0,24%), que não possibilitou quantidade de material suficiente para a realização do ensaio. A fração hidroetanólica não foi utilizada, pois apresentou perfil cromatográfico em camada delgada e na análise por CLAE muito próximo do perfil do extrato bruto de *P.setacea*.

No delineamento do perfil cromatográfico por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) do extrato bruto de *P.setacea*, foi possível observar que no extrato bruto bem como nas frações acetato de etila e hidroetanólica há predominância de substâncias de caráter polar, com predominância de picos no cromatograma e tempos de retenção na faixa dos 15-25 minutos. Ao se comparar os três perfis obtidos, observa-se que o perfil do extrato bruto e da fração hidroetanólica são bastante parecidos, com concentração dos picos na faixa de 20-25 mins, com muitos picos próximos uns dos outros. No perfil da fração acetato de etila, diferentemente da fração hidroetanólica e extrato bruto, nota-se que os picos apareceram em um intervalo de tempo de 15-30min e com picos mais separados uns dos outros.

Ao se analisar os resultados obtidos no ensaio toxicológico agudo, constata-se que não houve morte durante o experimento, notou-se que após a administração, o extrato de *P.setacea* os apresentaram bastante dificuldade de locomoção e ptose palpebral e esses efeitos perduraram por tempo.

Sabe-se que diversas espécies do gênero *Passiflora* apresentam atividade sobre o sistema nervoso central, o que poderia justificar os efeitos nos animais após o tratamento com extrato bruto de *P.setacea*. Ao se analisar os pesos relativos de órgãos entre os grupos nota-se que não houve diferença significativa entre o grupo

controle e o grupo tratado. O mesmo pode-se observar em relação ao consumo médio de ração e água pelos diferentes grupos; não houve diferença significativa de consumo médio entre os dois grupos. Na maior parte dos dias os consumos médios de água e ração seguiram um padrão, apenas em um dos dias houve um consumo maior de água por ambos os grupos, o que poderia ter sido ocasionado por alguma alteração ambiental ou condição desses animais nesse dia específico. Em relação à variação média de peso pelos diferentes grupos também não se pôde notar diferenças significativas durante o experimento.

No ensaio toxicológico de administração reiterada, não houve nenhuma morte animal durante os 28 dias de experimento. Foram avaliados parâmetros bioquímicos e hematológicos e a análise histológica está em andamento. Nos testes bioquímicos houve diferença significativa, em relação ao controle, na concentração sérica de albumina, ALT (Alanina aminotransferase) e GGT (Gama-glutamil transferase) em fêmeas que receberam diariamente 1200mg/kg de extrato bruto de *P.setacea*. Em machos do grupo que recebeu 800mg/kg houve diferença significativa apenas, em relação ao controle, nos níveis de creatinina e GGT. Nos grupos de machos que receberam 400 e 1200mg/kg houve apenas diferença significativa, em relação ao controle, nas dosagens séricas de GGT. Apesar de ter havido diferença significativa entre o controle e grupos tratados em relação a alguns parâmetros, os valores que se apresentaram com diferenças significativas encontram-se dentro dos padrões normais segundo MATSUDA e colaboradores (2000) e TACONIC FARMS (2005), para ratos wistar na idade de 10 a 18 semanas, faixa etária dos animais empregados no experimento. Na análise hematológica do sangue coletado no mesmo experimento de administração reiterada por 28 dias, se repetiu a mesma situação da análise bioquímica. Houve parâmetros diferentes significativamente, do controle, porém dentro dos padrões segundo MATSUDA e colaboradores (2000) e TACONIC FARMS (2005) para ratos wistar na mesma faixa etária dos animais utilizados no experimento.

Em relação ao ensaio de avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *P.setacea*, não se observou nenhum indício de mutagenicidade nas linhagens de *S. typhimurium* utilizadas. Segundo Mc GEORGE et al., 1985 e VALENTE, 1990; uma amostra é considerada positiva para mutagenicidade quando a razão de mutagenicidade é maior ou igual a 2, em pelo menos, uma das doses do ensaio,

com diferença significativa entre, pelo menos, uma dose testada e o controle, sendo que essa situação não foi observada para o teste empregando extrato bruto de *P.setacea*.

A utilização de produtos naturais na terapêutica contra doenças causadas por microrganismos tais como *Helicobacter pylori* apresenta vantagens sobre as drogas derivadas de fonte sintéticas. Isto é devido aos inúmeros e recorrentes efeitos colaterais gerados pelas drogas sintéticas. Devido à menor toxicidade e menos efeitos colaterais, áreas como a gastroenterologia e bacteriologia tem mostrado interesse no emprego de produtos naturais no tratamento de infecções bacterianas e notadamente de *H.pylori*. (NEWMAN, 2007; AMARAL; BARA, 2005, DAS K; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Vários produtos naturais demonstraram atividade antimicrobiana contra *H. pylori* e, durante séculos, uma ampla gama de plantas e de derivados vegetais tem sido usados como fonte alternativa no tratamento de distúrbios gastrointestinais (COGO et al., 2010). Diversos estudos têm buscado elucidar o mecanismo de ação de flavonoides na atividade anti *H.pylori*. Vários estudos têm mostrado que compostos das classes de flavonoides e chalcona são capazes de inibir a enzima urease, que é secretada pelo *H.pylori* durante a infecção para garantir a sua sobrevivência em meio ao ácido e pH estomacal. Isto pode, de certa maneira explicar a atividade *in vivo* de quercetina contra *H.pylori* em cobaias, bem como a eficácia de sofalcona (derivado de chalcona) em vários medicamentos que compõe o tratamento da infecção por esse agente patogénico. (BONIFÁCIO et al., 2014). No entanto, outros mecanismos também pode explicar a atividade de flavonoides, tais como a neutralização de VacA (citotoxina vacuolar) do *H. pylori* e interferência com TLR4 (toll-like da sinalização do receptor 4). É igualmente possível que certos flavonoides podem exercer atividade direta contra *H. pylori* ou agir sinergicamente com antibióticos utilizados em terapia convencional. (TIM CUSHNIE; LAMB, 2011).

Na avaliação da atividade anti *H. pylori* do extrato bruto de *P.setacea*, a CIM (concentração inibitória mínima) foi de 250 µg/mL. Um valor bastante satisfatório e promissor para extratos vegetais (HACHEM et al.,1996; GADHI et al., 2001; ALIGIANNIS et al., 2001; WEBSTER et al. 2008). A atividade observada pode estar relacionada à presença de flavonoides no extrato bruto.

Este trabalho, através da comprovação da atividade antiúlcera aguda em ratos, indica um possível potencial terapêutico antiúlcera de *P.setacea*, espécie tradicionalmente utilizada na culinária pela população do centro-oeste do Brasil maiores investigações são necessárias para que se possa confirmar o mecanismo de ação do extrato como, por exemplo, através da avaliação da atividade antiúlcera subaguda e crônica, isolamento e verificação da atividade das frações ou dos compostos ativos.

CONCLUSÃO

8. Conclusão

Com a realização deste trabalho conclui-se:

- Há compostos polifenólicos tanto no extrato bruto de *P.setacea* bem como no de *P.tenuifila*, com presença de flavonoides e taninos em ambos extratos;
- Os flavonoides presentes nos extratos brutos e frações de *P.setacea* e *P.tenuifila* não correspondem a rutina e quercetina, comprovado através de CCD.
- *P.setacea* apresentou significativa proteção frente à formação de lesões ulcerativas, em modelo agudo (2,39%, 0,43% para as doses de 200 e 400mg/kg respectivamente), enquanto que *P.tenuifila* não apresentou resultados significativos em relação a essa atividade;
- *P.setacea* não apresentou indícios de toxicidade aguda em ratos mediante análise dos parâmetros estudados;
- *P.setacea* não apresentou indícios de toxicidade subcrônica em ratos, mediante análise dos parâmetros estudados. Apesar de ter havido diferença significativa, entre grupos tratados e controle, em alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos, não houve valores fora da faixa normal para ratos na faixa etária utilizada nos ensaios;
- Os valores de atividade antioxidante, teor de flavonoides e de compostos polifenólicos, presentes no extrato bruto de *P.setacea*, estão bem próximos dos observados em espécies do mesmo gênero e em outros extratos empregando a mesma espécie vegetal, mas obtidos a partir de órgãos e processos extrativos distintos.
- O extrato bruto de *P.setacea* mostrou um promissor potencial anti- *H.pylori*, (CE_{50} = 250 μ g/mL);
- Não se observou indícios de mutagenicidade, no modelo ensaiado, para o extrato bruto de *P.setacea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

- ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANCK, J.R.; KHAN, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants. II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.2, p.100-106, 2003.
- AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v.2, n.4, p.875-877, 2007.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.827-874.
- AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.26, n.5, p.363-367, 2001.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.5-8, 2005.
- AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on *Passiflora incarnata* dry extract. I. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.22, n.5, p.1008-1013, 1974.
- ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.1, p.72-80, 2008.
- ATAÍDE, E.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Flowering and fructification of wild passion fruit *Passiflora setacea* D.C. grown in Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.2, p.377-381, 2012.
- BABENKO, N.A.; SHAKHOVA, E.G. Effect of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells. **Lipids in Health and Disease**, v.7, n.1, p.1-11, 2008.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v.93, n.5, p.1464-1476, 1999.
- BABU, T.H.; MANJULATHA, K.; KUMAR, G.S.; HYMAVATHI, A.; TIWARI, A.K.; PUROHIT, M.; RAO, J.M.; BABU, K.S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.117-120, 2010.
- BALBACHAS, A. **As plantas curam**. 6.ed. São Paulo: Missionária, 1957. 432p.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p.431-441, 2005.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: LTC, 1978. v.1, 225p.

BASHA, S.K.C.; RAJ, D.B.; SWAMY, S.B.; REDDY, M.J.; GOUDA, T.S. Evaluation of analgesic activity of hydro alcoholic leaf extract of *Passiflora foetida*. **Indian Journal of Pharmacology**, v.40, n.2, p.S75, 2008.

BEKALO, T.H.; WOODMATAS, S.D.; WOLDEMARIAM, Z.A. An ethnobotanical study of medicinal plants used by local people in the lowlands of Konta Special Woreda, southern nations, nationalities and peoples regional state, Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.5, n.26, p.1-15, 2009.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILHO, J.; MARIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.12, p.4505-4515, 1997.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; COTTORINI, P.E. **Piante Medicinali chimica, farmacologia e terapia**. Milano: Inverni & Della Beffa, 1964. p.1080-1085.

BENINCA, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v.104, n.3, p.1097-1105, 2007.

BERAHOU, A.; AUHMANI, A.; FDIL, N.; BENHARREL, A.; JANA, M.; GADHI, C.A. Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.3, p.426-429, 2007.

BERALDO, J. **Estudo farmacognóstico de *Passiflora edulis* SIMS (*Passifloraceae*)**. São Paulo, 2008. 85p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S., eds. **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa: FAPESP, 2003. v.3, p.247-248.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PÍKE, M.C. An emeprical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. **Mutation Research**, v.97, n.4, p.267-281, 1982.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, suppl., p.631-637, 2006.

BIRK, C.D.; PROVENSI, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.14, p.2285-2291, 2005.

BLOTNICK, S.; PEOPLES, G.E.; FREEMAN, M.R.; EBERLEIN, T.J.; KLAGSBRUN, M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.8, p.2890-2894, 1994.

BOKSTALLER, S.; SCHMIDT, P.C. A comparative study on the content of passionflower flavonoids and sesquiterpenes from valerian root extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. **Pharmazie**, v.52, n.7, p.552-557, 1997.

BONIFÁCIO, B.V.; RAMOS, M.A.S.; SILVA, P.B.; BAUAB, T.M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.13, n.54, p.1-10, 2014.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effects on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition Research*, v.15, n.10, p.1477-1485, 1995.

BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: decrease in the peritoneal macrophages respiratory burst. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, n.1, p.51-60, 2001.

BORGATTI, G. Pharmacodynamic studies on *Passiflora incarnata* L. **Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**, v.14, p.203-205, 1939.

BORREGAARD, N.; LOLLIKE, K.; KJELDSSEN, L.; SENGELØV, H.; BASTHOLM, L.; NIELSEN, M.H.; BAINTON, D.F. Human neutrophils granules and secretory vesicles. **European Journal of Haematology**, v.51, n.4, p.187-198, 1993.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, n.8, p.581-591, 2000.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**, v.10, p.S104-S106, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidative activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995. [Review].

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry, medicinal plants**. 4.ed. Paris: Lavoisier Publishing, 2009. pt.2, cap.6, p.331-335.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.9, p.1025-1030, 2010.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **BMJ [British Medical Journal]**, v.323, p.980-983, 2001.

CAMINHOÁ, J.M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipografia Nacional, 1877. p.2166-2167.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.501-512, 2003.

CARRASCO, M.C.; VALLEJO, J.R.; PARDO-DE-SANTAYANA, M.; PERAL, D.; MARTIN, M.; ALTIMIRAS, J. Interaction of *Valeriana officinalis* L. and *Passiflora incarnata* L. in a patient treated with lorazepam. **Phytotherapy Research**, v.23, n.12, p.1795-1796, 2009.

CASTRO, G.A.; CARVALHO, J.E.; TINTO, S.V.; POSSENTI, A.; SGARBIERI, V.C. Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.1, p.83–90, 2010.

CAZARIN, C.B.B.; SILVA, J.K.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; VILELLA, C.A.; FERREIRA, A.L.; BOGUSZ Jr., S.; FUKUDA, K.; AUGUSTO, F.; MEIRELLES, L.R.; ZOLLNER, R.L.; MARÓSTICA Jr., M.R. *Passiflora edulis* peel intake and ulcerative colitis: approaches for prevention and treatment. **Experimental Biology and Medicine**, v.239, n.5, p.542–551, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORREA, R.X. Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **GMR, Genetics and Molecular Research**, v.11, n.1, p.731-738, 2012.

CHAUDHRY, H.R.; TAJ, R.; SAEED, N.; KHAN, N.H.; CHAUDARY, A.; LOONEN, A.J.M.; European College of Neuropsychopharmacology. Effectiveness of a combination of Hypericum and Passiflora for the treatment of depression with concomitant anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v.17, p.S394-S394, 2007.

CLARK, R.A.F.; HERSON, P.M., eds. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1988. p.281-319.

COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; CUNICO, M.M.; RIBEIRO, M.L.; CAMARGO, E.R.; KUSSEN, G.M.B.; NOGUEIRA, K.S.; COSTA, L.M.D. Anti-*helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.2, p.304-309, 2010.

COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C.B.B.; SCHUMACHER, N.S.G.; MARÓSTICA Jr., M.R.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant and anti-

diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v.18, n.1, p.106-115, 2014.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. v.5, p.108-129.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1117p. [v.3. Farmacognosia experimental].

MORRONE, M.S.; ASSIS, A.M.; ROCHA, R.F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTTI, S.M.; LEONARDO, H.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.45-51, 2013.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.2, p.104-111, 2010.

DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, H.N.; BRANCO, A.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V.; QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A.M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian caatinga plants. **Fitoterapia**, v.78, n.3, p.215-218, 2007.

DERMARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. **The review of natural products**. 7.ed. Saint Louis: Facts and Comparisons, 2002. 1882p.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.1, p.1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* Linn. in mice. **Phytotherapy Research**, v.17, n.4, p.401-403, 2003a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of the methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata*. **Phytotherapy Research**, v.17, n.7, p.821-822, 2003b.

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Antitussive activity of methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. **Fitoterapia**, v.73, n.5, p.397-399, 2002.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4, p.337-353, 1999.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.371-374, 2005.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. 870p.

DUKE, J.A. **The green pharmacy**: herbal remedies for common diseases and conditions from the world's foremost authority on healing herbs. London: Rodale Press, 1997. 507p.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOEBELER, M.; DEBUS, S.; BRÖCKER, E.B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Gro α , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **American Journal of Pathology**, v.153, n.6, p.1849-1860, 1998.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. Pag 448-449 (Código farmacêutico brasileiro, 1 e 2).

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA. Disponível em: <http://www.fbg.org.br/Textos.asp?Codigo=194>. Acesso em: 11 out. 2014.

FELLOWS, E.J.; SMITH, C.S. The chemistry of *Passiflora incarnata*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.27, n.7, p.565-573, 1938.

FISCHER, I.H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasítica***. Piracicaba, 2003. 48p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

FISHER, A.A.; PURCELL, P.; LE COUTER, D.G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Journal of Toxicology, Clinical Toxicology**, v.38, n.1, p.63-66, 2000.

FREITAS, M.S.M. **Flavonóides e nutrientes minerais em folhas de maracujazeiro amarelo e deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce**. Campos dos Goytacazes, 2006. 119p. Tese de Doutorado – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Universidade Estadual do Norte Fluminense.

GADHI, C.A.; BENHARREF, A.; JANA, M.; LOZNIEWSKI, A. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucineris* Pomel extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2/3, p.203–205, 2001.

GARCIA, A.A. **Fitoterapia**: vademécum de prescripción. 3.ed. Barcelona: Masson, 2000. 1148p.

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTREL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, n.4, p.581-589, 2007.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, v.6, n.3, p.825-831, 1992.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES Jr., H.; FERRER, A.L.S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.9-16, 2006.

GONÇALVES FILHO, A.; TORRES, O.J.M.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA FILHO, A.; ROCHA, L.C.A.; THIEDE, A.; LUNEDO, S.M.C.; BARBOA, R.E.A.; BERNHARDT, J.A.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.3-8, 2006.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C., orgs. **As bases farmacológicas da terapêutica Goodman & Gilman**. 12.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2012. p.869-882.

GOSSELL-WILLIAMS, M.; SIMON, O.R.; WEST, M.E. The past and present use of plants for medicines. **West Indian Medical Journal**, v.55, n.4, p.217-218, 2006.

GRACIOSO, J.D.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.4, p.487-491, 2002.

GRIEVE, M.; LEYEL, C.F., eds. **A modern herbal**: the medicinal, culinary, cosmetic, and economic properties, cultivation, and folklore of herbs, grasses, fungi, shrubs, and trees with all their modern scientific uses. New York: Dorset Press, 1994. 912p.

GRINNEL, F.; BILLINGHAM, R.E.; BURGESS, L. Distribution of fibronectin during wound healing *in vivo*. **Journal of Investigative Dermatology**, v.76, n.3, p.181-189, 1981.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts and superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.1, n.4, p.6-8, 1987.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.715-722.

HACHEM, C.Y.; CLARRIDGE, J.E.; REDDY, R.; FLAMM, R.; EVANS, D.G.; TANAKA, S.K.; GRAHAM, D.Y. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin and metronidazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.24, n.1, p.37-41, 1996.

HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R.W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo*. **FASEB Journal**, v.15, n.12, p.2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel: Stuttgart: Birkhäuser Verlag, 1990.

HERNANDES, L.S. **Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera**. São Paulo, 2010. 111p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneous hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.70, n.3, p.718-721, 2006.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.3, p.1181-1205, 2007.

JUDD, W.S. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.283-316.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência à doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. **Anais**. Jaboticabal: SBF, 2004. 1CD-ROM.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F., eds. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.81-108.

KANNAN, S.; PARIMALA DEVI, B.; JAYAKAR, B. Antibacterial activity of *Passiflora ligularis*. **International Journal of Chemical Sciences**, v.9, n.1, p.393-396, 2011a.

KANNAN, S.; PARIMALA DEVI, B.; JAYAKAR, B. Antibacterial evaluation of the methanolic extract of *Passiflora edulis*. **Hygeia**, v.3, n.1, p.46-49, 2011b.

KARAKOYUN, B.; YÜKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZİK, C.; YEGEN, B.C. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Inflammation**, v.32, n.1, p.37-46, 2009.

KATZUNG, B.G., ed. **Farmacologia: básica e clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.867-881.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15, suppl., p.D1-D6, 2000.

KESZTHELYI, D.; JANSEN, S.V.; SCHOUTEN, G.A.; KORT, S.; SCHOLTES, B.; ENGELS, L.G.J.B.; MASCLÉE, A.A. Proton pump inhibitor use is associated with an increased risk for microscopic colitis: a case-control study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.32, n.9, p.1124-1128, 2010.

KNIGHTON, D.R.; SILVER, I.A.; HUNT, T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, n.2, p.262-270, 1981.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A., eds. **Berne & Levy fisiologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.491-543.

KOHEN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-220, 2005.

KONTA, E.M.; ALMEIDA, M.R.; AMARAL, C.L.; DARIN, J.D.C.; ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Evaluation of the antihypertensive properties of yellow passion fruit pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in spontaneously hypertensive rats. **Phytotherapy Research**, v.28, n.1, p.28-32, 2014.

KRESS, W.J.; HEYER, W.R.; ACEVEDO, P.; CODDINGTON, J.; COLE, D.; ERWIN, T.L.; MEGGERS, B.J.; POGUE, M.; THORINGTON, R.W.; VARI, R.P.; WEITZMAN, M.J.; WEITZMAN, S.H. Amazonian biodiversity: assessing conservation priorities with taxonomic data. **Biodiversity & Conservation**, v.7, n.12, p.1577-1587, 1998.

KRUGER, A. **An illustrated guide to herbs: their medicine and magic**. London: Parkgate Books, 1992. 192p.

KUIPERS, E.J.; BLASER, M.J. Doença ácido-péptica: epidemiologia e fisiopatologia. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.1161-1162.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins, patologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.68-84; p.647-651.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N., eds. **Robbins e Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap.17, p 857-862.

KUSHIMA, H.; NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; RINALDO, D.; SASSA, M.F.; BAUAB, T.M.; STASI, L.C.; CARLOS, I.Z.; BRITO A.R.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-helicobacter pylori action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.430-438, 2009.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.53, n.1, p.39-50, 2002.

LADE, B.D.; PATIL, A.S.; PAIKRAO, H.M. Systematic optimization of thin-layer chromatography for wound-induced differential secondary metabolites in *Passiflora*

foetida. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v.27, n.5, p.385-391, 2014.

LEVY, M.N.; KOEPPEN, M.B.; STANTON, B.A., eds. **Berne e Levy fundamentos de fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.451-472.

LEWIS, B.J.; HERRLINGE, K.A.; CRAIG, T.A.; MEHRING-FRANKLIN, C.E.; DEFREITAS, Z.; HINOJOSA-LABORDEB, C. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, n.7, p.1359-1366, 2013.

LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L.; ZHAO, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.3, p.1085-1090, 2011.

LI, J.; LI, W.Z.M.; HUANG, W.; CHEUNG, A.W.H.; BI, C.W.C.; DUAN, R.; GUO, A.J.Y.; DONG, T.T.X.; TSIM, K.W.K. Quality evaluation of Rhizoma Belamcandae (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.11, p.2071-2078, 2009.

LIN, K.J.; GARCÍA RODRÍGUES, L.A.; HERNÁNDES-DÍAZ, S. Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: do studies without validation provide reliable estimates? **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v.20, n.7, p.718–728, 2011.

LUGATO, D.; SIMÃO, M.J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.118, n.2, p.339-346, 2014.

LUTOMSKI, J. Qualitative and quantitative chromatographic investigations of alkaloids of *Passiflora incarnata*. **Biuletyn Instytutu Roslin Leczniczych**, v.5, p.182-198, 1959.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, C.A.; VEIGA Jr., V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAHADY, G.B.; PENDLAND, S.L.; STOIA, A.; HAMILL, F.A.; FABRICANT, D.; DIETZ, B.M.; CHADWICK, L.R. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, v.19, n.11, p.988-991, 2005.

MAHMMOUD, Y.A. Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. **British Journal of Pharmacology**, v.150, n.2, p.200-208, 2007.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.; MCCOLL, K.E.L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v.374, n.9699, p.1449-1461, 2009.

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.262-266, 1991.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46, n.3, p.234-239, 1998.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, n.3/4, p173-215, 1983.

MARUKI-UCHIDA, H.; KURITA, I.; SUGIYAMA, K.; SAI, M.; MAEDA, K.; ITO, T. The protective effects of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds in UVB-irradiated keratinocytes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.5, p.845-849, 2013.

McGEORGE, L.J.; LOUIS, J.B.; ATHERHOLT, T.B.; McGARRITY, G.J. Mutagenicity analyses of industrial effluents: results and considerations for integration into water pollution control programs. In: WATERS, M.D. Short-term bioassay in the analysis of complex environmental mixtures: part IV. New York: Plenum Press, 1985. p.247-267.

McGUIRE, W.P. The story of taxol. **Science**, v.292, n.5519, p.1073-1074, 2001. (alterei o autor; alterar no texto)

MATSUDA, H.; RANAKA, A.; ITAKURA, A. Immunology and hematology. In: KRINKE, G.J.; KRINKE, G.J., ed. **The laboratory rat**. San Diego: London: Academic Press, 2000. cap.22, p.437-446. (The handbook of experimental animals).

MEDEIROS, J.S.; DINIZ, M.F.F.M.; SRUR, A.U.O.S.; PESSOA, M.B.; CARDOSO, M.A.A.; CARVALHO, D.F. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa) como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.394-399, 2009.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v.151, n.5, p.618-627, 2007.

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C.; MANICA, I., eds. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

MENEZES, J.M.T.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D.A. Avaliação da taxa de pagamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à "morte prematura de plantas". **Científica**, v.22, n.1, p.95-104, 1994.

MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P.L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L. ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.3, p.791–804, 2013.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, n.5, p.939-945, 1983.

MOLLÍNEDO, F.; BORREGAARD, N.; BOXER, L.A. Novel trends in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today**, v.20, n.12, p.537-539, 1999.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimation antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.2, p.281-288, 2007.

MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V.; CARVALHO, M.J.; ARAÚJO BOLETI, A.P.; TEIXEIRA, L.S.; MATOS, H.R.; LIMA, E.S. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, n.6, p.1367-1378, 2013.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, n.13, p.4894-4897, 1988.

MORAES, M.L.L. **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** São Carlos, 1995. 94p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B. Introduction: the Brazilian Atlantic forest. **Biotropica**, v.32, n.4, p.786-792, 2000.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.35, n.8, p.469-475, 2005. (alterei o primeiro autor; alterar no texto)

MOVAFEGH, A.; ALIZADEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study. **Anesthesia & Analgesia**, v.106, n.6, p.1728-1732, 2008.

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, n.2, p.399-403, 2005.

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTO, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts

against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v.21, n.10, p.970-974, 2007.

MUTHU, C.; AYYANAR, M.; RAJA, N.; IGNACIMUTHU, S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, n.43, p.1-10, 2006.

NASCIMENTO, D.F.; SANTANA, A.P.M.; LEITE, I.O.; VIANA, F.A.C.; LEITE, A.L.A.S.; MORAES, R.A.; JAMACARU, F.V.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1b, p.261-268, 2009.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnate* extracts in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.26, p.1-6, 2007.

NEUGEBAUER, H. Zur kenntnis der sedativ wirkenden inhaltstoffe von *Passiflora*. **Pharmazie**, v.4, n.4, p.176-178, 1949.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C.; MALHEIROS, E.B. Seedling production of yellow passion fruit by hypocotyledonary grafting on seven species on passifloras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.237-245, 2011.

OECD. **OECD Guideline for testing of chemicals**: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2008. 13p. (Text n.407). Disponível em: http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en#page1. Acesso em: 22 jun. 2014.

OECD. OECD guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). 2008. 27p. (Text n.425). Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd425.pdf>. Acesso em 22 jun. 2014.

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

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 2004, Jaboticabal. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p.291-310.

OLIVEIRA, J.C.; NAKAMURA, K.; CENTURION, M.A.P.C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F.R.; MAURO, A.O.; SACRAMENTO, C.K. Avaliação de passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Anais**. Salvador: SBF, 1994. v.3, res.347, p.827.

PECKOLT, TH. Heil und nutzpflanzen Brasiliensis. Passifloraceae. **Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft**, v.19, p.343-361, 1909.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F., eds. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap.18, p.457-463.

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

PERRY, N.B.; ALBERTSON, C.D.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; MUNRO, M.H.G.; WALKER, R.L. Antibiotic compounds from new-zealand plants 4-hydroxy-2-cyclopentenone: an anti-pseudomonas and cytotoxic component from *Passiflora tetrandra*. **Planta Medica**, v.57, n.2, p.129-131, 1991.

PETRY, R.D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J.B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Comparative pharmacological study on hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.162-164, 2001.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929. p.237.

PINELI, L.D.; RODRIGUES, J.S.Q.; COSTA, A.M.; LIMA, H.C.; CHIARELLO, M.D.; MELO, L. Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild *passiflora* from Brazilian savannah: potential as functional beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, n.7, p.1500-1506, 2015.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M.A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.9, p.727-740, 2005.

PLOTZE, R.O.; FALVO, M.; PADUA, J.G.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, G.C.X.; BRUNO, O.M. Leaf shape analysis by the multiscale minkowski fractal dimension, a new morphometric method: a study with *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Canadian Journal of Botany**, v.83, n.3, p.287-301, 2005.

PORTH, C.M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. v.1, p.384-405.

POZZI, A.C.S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. São Carlos, 2007. 73p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

PRABHAKAR, M.C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M.A.; KHAN, S.I. Pharmacological investigations on vitexin. **Planta Medica**, v.43, n.4, p.396-403, 1981.

PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v.74, n.3, p.302-304, 2003.

RAMAIYA, S.D.; BUJANG, J.S.; ZAKARIA, M.H. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. **Scientific World Journal**, v.2014, art.167309, p.1-10, 2014.

RAMAIYA, S.D.; BUJANG, J.S.; ZAKARIA, M.H.; KING, W.S.; SAHRIR, M.A.S. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.5, p.1198-1205, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J., eds. **Rang and Dale farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p.385-390.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v.80, p.223-230, 1997.

RAZIA, M.; BEULAH; SIVARAMAKRISHNAN, S. Phytochemical, GC-MS, FT-IR analysis and antibacterial activity of *Passiflora edulis* of kodaikanal region of Tamilnadu. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.9, p.435-441, 2014.

REHWALD, A. **Analytical investigation of Crataegus species and Passiflora incarnata L. by high performance liquid chromatography**. Zurich, 1995. Dissertação de Doutorado – Swiss Federal Institute of Technology.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.5, p.523-534, 2002.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.36, n.3, p.282-288, 2002.

RIPA, F.A.; HAQUE, M.; NAHAR, L.; ISLAM, M.M. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. **European Journal of Scientific Research**, v.31, n.4, p.592-598, 2009.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. p.92-121.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicines situations 2011: tradicional medicines: global situations, issues and challenges**. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12p. Disponível em: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. Acesso em: 23 de Out. de 2013.

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.R.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L.F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.G.; DE SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.4, p.455-461, 2011.

ROJAS ARMAS, J.; RONCEROS, S.; PALOMINO DE LA GALA, R.; TOMÁS, G.; CHENGUAYEN, J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracuyá), en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima**, v.67, n.3, p.206-213, 2006.

ROMMELSPACHER, H.; NANZ, C.; BORBE, H.O.; FEHSKE, K.J.; MÜLLER, W.E.; WOLLERT, U. 1-methyl-beta-carboline (harmane), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor-binding. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.314, n.1, p.97-100, 1980.

RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; PEREIRA, T.V.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p.719-724, 2007.

RUGGY, G.H.; SMITH, C.S. A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.29, n.6, p.245-249, 1940.

SACCO, J.C. Passifloráceas. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980. fasc.84, 132p.

SALOMÃO, T.A. Botânica do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**. Jaboticabal: FCAV, 1980. p.3-21.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogênica activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.1-6, 2005.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.3, p.306-309, 2005.

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves: a promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**, v.54, p.272-280, 2014a.

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

SCAVONE, O; PANIZZA, S. Aspectos botânicos e medicinais de plantas usadas como tranquilizante, destacando-se as nativas do Brasil. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v.18, p.185-197, 1978.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v.134, n.7, p.1842-1860, 2008.

SHI, C.C.; CHEN, S.Y.; WANG, G.J.; LIAO, J.F.; CHEN, C.F. Vasorelaxant effect of harman. **European Journal of Pharmacology**, v.390, n.3, p.319-325, 2000.

SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; BOGUSZ Jr., S.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA Jr., M. Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel increases colonic production of short-chain fatty acids in Wistar rats. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.2, pt.2, p.1252-1257, 2014b.

SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; BATISTA, A.G.; MARÓSTICA Jr., M.R. Effects of passion fruit (*Passiflora edulis*) byproduct intake in antioxidant status of Wistar rats tissues. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.2, pr.2, p.1213-1219, 2014a.

SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; MELLETI, L.M.M.; PASCHOAL, J.A.R.; BOGUSZ Jr., S.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA Jr., M.R.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *in vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v.53, n.2, p.882-890, 2013.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p.687-719.

SIMIRGIOTIS, M.J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E.J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid c-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v.18, n.2, p.1672-1692, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2006. 1102p.

SIRIWARDHENE, M.A.; ABEYSEKERA, A.M.; CHANDRIKA, U.G.; GOONETILLEKE, A.K.E. Antihyperglycemic effect and phytochemical screening of aqueous extract of *Passiflora foetida* (Linn.) on normal Wistar rat model. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.7, n.45, p.2892-2894, 2013.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.1, p.11-20, 1997.

SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* (maracujá)**. Porto Alegre, 1997. 156p. Dissertação de Mestrado – Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOUZA, K.C.B.; ORTEGA, G.G. Padronização e estudo preliminar da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá). **Caderno de Farmácia**, v.13, n.2, p.147-148, 1997.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v.54, n.6, p.488-491, 1988.

STRASSER, M. **Triagem fitoquímica e farmacológica e formulação de nanopartículas de produtos derivados de *Passiflora serratodigitata* L.** São Paulo, 2011. 89p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.29, n.9, p.938–946, 2009.

SUNITHA, M.; DEVAKI, K. Antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims leaves. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n.3, p.310-311, 2009.

TABACH, R.; RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product – CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L. and *Valeriana officinalis* L.). **Phytoterapy Research**, v.23, n.1, p.33-40, 2009.

TACONIC FARMS. **Wistar Hannover data and parameters**. Disponível em: <http://www.taconic.com/site-search?q=control+ data94>. Acesso em: 08 jan. 2015.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, suppl.1, p.S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art 2010. **Gastroenterologia Polska**, v.17, n.3, p.171-179, 2010.

TEIXEIRA, L.S.; LIMA, A.S.; BOLETI, A.P.A.; LIMA, A.A.; LIBÓRIO, S.T.; PAULA, L.; OLIVEIRA, M.I.B.; LIMA, E.F.; COSTA, G.M.; REGINATTO, F.H.; LIMA, E.S. Effects of *Passiflora nitida* Kunth leaf extract on digestive enzymes and high caloric diet in rats. **Journal of Natural Medicines**, v.68, n.2, p.316-325, 2014.

TERKELTAUB, R.A.; GINSBERG, M.H. Platelets and response to injury. In: CLARK, R.A.F.; HENSON, P.M., 2 eds. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1998. p.149-163.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.2, p.99-107, 2011.

VALENTE, G.U. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames**. Campinas, 1990. 134p. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia – Universidade de Campinas.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v.78, n.2, p.112-119, 2007.

VICENTINI, G.C.; COSTA, A.M.; MADALENA, J.O. Descritores morfológicos quantitativos de *Passiflora setacea* em cultivos orgânicos e convencionais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., Natal, 2010. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade. Natal: SBF, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag; New York: Springer, 1996. 384p.

WANG, C.; XU, F.Q.; SHANG, J.H.; XIAO, H.; FAN, W.W.; DONG, F.W.; HU, J.M.; ZHOU, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, n.3, p.812–817, 2013.

WASICKY, A. **Estudo farmacognóstico comparativo de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora nitida* (Passifloraceae)**: avaliação das atividades na antiúlcera e antioxidante de seus extratos. São Paulo, 2007. 105p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, n.1, p.140–146, 2008.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WHEATLEY, D. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Journal of Psychopharmacology**, v.19, n.4, p.414-421, 2005.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H. Possible anxiolytic effects of chrysin, as central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora caerulea*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.47, n.1, p.1-4, 1994.

WONDRACEK, D.C.; VIEIRA, R.F.; SILVA, D.B.; AGOSTINI-COSTA, T.D.; SANO, S.M.; FALEIRO, F.G. Saponification influence in carotenoid determination in cerrado passion fruit. **Química Nova**, v.35, n.1, p.180-184, 2012.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioural characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v.71, suppl.1, p.S117-S123, 2000.

ZAYACHKIVSKA, O.S.; KONTUREK, S.J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M.R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extract. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, suppl.1, p.219-231, 2005.

ZHANG, J.; KOIKE, R.; YAMAMOTO, A.; UKIYA, M.; FUKATSU, M.; BANNO, N.; MIURA, M.; MOTOHASHI, S.; TOKUDA, H.; AKIHISA, T. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Passiflora edulis*. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, n.10, p.1851-1865, 2013.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.Y.; TEHRANI, P.M.; ULREICH, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneous hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v.27, n.7, p.408-416, 2007.

ZUCOLOTTO, S.M.; GOULART, S.; MONTANHER, A.B.; REGINATTO, F.H.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, S.S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v.75, n.11, p.1221-1226, 2009.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 142013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto **"Avaliação de atividade antiúlcera e segurança do uso de Passiflora setacea e P.tenuifila"** (Protocolo CEUA/FCF/395), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Alberto Vetore Neto**, sob orientação/supervisão do(a) **Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Jolison de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Tabelas referentes ao ensaio de avaliação da toxicidade de administração reiterada durante 28 dias de extrato bruto de *P.setacea*.

Tabela 1: Concentração média de albumina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL de *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de albumina $\pm$ erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	4,38 $\pm$ 0,06
Machos 800mg/kg	4,16 $\pm$ 0,03
Machos 400mg/kg	4,40 $\pm$ 0,08
Machos controle	4,36 $\pm$ 0,06

Tabela 2: Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de ALT (Alanina aminotransferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Machos 1200mg/kg	73,80 $\pm$ 2,08
Machos 800mg/kg	79,33 $\pm$ 4,63
Machos 400mg/kg	70,20 $\pm$ 3,30
Machos controle	69,40 $\pm$ 3,80

Tabela 3: Concentração média de AST (Aspartato aminotransferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de AST (Aspartato aminotransferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Machos 1200mg/kg	120,40 $\pm$ 9,00
Machos 800mg/kg	124,00 $\pm$ 9,30
Machos 400mg/kg	103,60 $\pm$ 3,77
Machos controle	107,40 $\pm$ 7,74

Tabela 4: Concentração média de AST (Aspartato aminotransferase) (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de AST (Aspartato aminotransferase) $\pm$ erro padrão (U/L)
Fêmeas 1200mg/kg	141,30 $\pm$ 8,25
Fêmeas 800mg/kg	120,40 $\pm$ 4,32
Fêmeas 400mg/kg	113,8 $\pm$ 4,27
Fêmeas controle	104,6 $\pm$ 7,30

Tabela 5: Concentração média de colesterol total (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de colesterol total ± erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	57,40±2,76
Machos 800mg/kg	58,67±7,26
Machos 400mg/kg	64,40±3,50
Machos controle	57,80±3,90

Tabela 6: Concentração média de colesterol total (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de colesterol total ± erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	58,50±2,60
Fêmeas 800mg/kg	58,40±3,77
Fêmeas 400mg/kg	55,75±4,76
Fêmeas controle	62,20±1,11

Tabela 7: Concentração média de colesterol HDL (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de colesterol HDL ± erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	38,80±2,63
Machos 800mg/kg	32,33±2,60
Machos 400mg/kg	43,80±5,63
Machos controle	35,60±4,05

Tabela 8: Concentração média de colesterol HDL (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de colesterol HDL ± erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	43,25±4,71
Fêmeas 800mg/kg	48,60±0,50
Fêmeas 400mg/kg	37,75±5,08
Fêmeas controle	39,8±1,80

Tabela 9: Concentração média de creatinina (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de creatinina ± erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	1,26±0,02
Fêmeas 800mg/kg	1,28±0,06
Fêmeas 400mg/kg	1,30±0,04
Fêmeas controle	1,50±0,22

Tabela 10: Concentração média de fosfatase alcalina (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de fosfatase alcalina ± erro padrão (U/L)
Machos 1200mg/kg	13,2±0,73
Machos 800mg/kg	10,67±0,33
Machos 400mg/kg	11,80±1,60
Machos controle	10,40±0,68

Tabela 11: Concentração média de fosfatase alcalina (U/L) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de fosfatase alcalina ± erro padrão (U/L)
Fêmeas 1200mg/kg	13,00±1,41
Fêmeas 800mg/kg	10,40±0,24
Fêmeas 400mg/kg	12,00±1,73
Fêmeas controle	9,20±0,58

Tabela 12: Glicemia média (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Glicemia média ± erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	210,8±8,7
Fêmeas 800mg/kg	202,4±7,2
Fêmeas 400mg/kg	202,2±6,2
Fêmeas controle	214,2±3,3

Tabela 13: Glicemia média (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Glicemia média ± erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	85,4±2,2
Machos 800mg/kg	81,4±1,5
Machos 400mg/kg	83,4±4,1
Machos controle	86,2±2,7

Tabela 14: Concentração média de globulinas (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de globulinas ± erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	2,05±0,10
Machos 800mg/kg	1,79±0,15
Machos 400mg/kg	2,09±0,13
Machos controle	2,03±0,13

Tabela 15: Concentração média de globulinas (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de globulinas ± erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	1,77±0,15
Fêmeas 800mg/kg	1,87±0,12
Fêmeas 400mg/kg	1,98±0,09
Fêmeas controle	2,15±0,14

Tabela 16: Concentração média de triglicerídeos (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de triglicerídeos ± erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	164,00±14,17
Machos 800mg/kg	149,30±67,42
Machos 400mg/kg	131,60±34,13
Machos controle	168,80±09,16

Tabela 17: Concentração média de triglicerídeos (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de triglicerídeos ± erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	133,30±33,94
Fêmeas 800mg/kg	131,60±34,13
Fêmeas 400mg/kg	168,80±09,16
Fêmeas controle	230,60±34,71

Tabela 18: Concentração média de ureia (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de uréia ± erro padrão (mg/dL)
Machos 1200mg/kg	94,80±4,39
Machos 800mg/kg	83,33±6,29
Machos 400mg/kg	83,20±6,29
Machos controle	94,60±3,77

Tabela 19: Concentração média de uréia (mg/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de uréia $\pm$ erro padrão (mg/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	94,25 $\pm$ 04,44
Fêmeas 800mg/kg	86,60 $\pm$ 03,70
Fêmeas 400mg/kg	73,25 $\pm$ 20,02
Fêmeas controle	91,60 $\pm$ 06,24

Tabela 20: Concentração média de proteínas sanguíneas totais (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de proteínas sanguíneas totais $\pm$ erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	6,43 $\pm$ 0,16
Machos 800mg/kg	5,96 $\pm$ 0,18
Machos 400mg/kg	6,49 $\pm$ 0,21
Machos controle	6,39 $\pm$ 0,19

Tabela 21: Concentração média de proteínas sanguíneas totais (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Concentração média de proteínas sanguíneas totais $\pm$ erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	6,02 $\pm$ 0,18
Fêmeas 800mg/kg	6,41 $\pm$ 0,14
Fêmeas 400mg/kg	6,46 $\pm$ 0,07
Fêmeas controle	6,85 $\pm$ 0,25

Tabela 22: Número médio de eritrócitos por mm³ de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de eritrócitos $\times 10^6$ por mm ³ de sangue $\pm$ erro padrão (g/dL)
Machos 1200mg/kg	7,51 $\pm$ 0,15
Machos 800mg/kg	10,49 $\pm$ 10,49
Machos 400mg/kg	7,97 $\pm$ 0,26
Machos controle	8,10 $\pm$ 0,13

Tabela 23: Número médio de eritrócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de eritrócitos $\times 10^6$ por mm^3 de sangue $\pm$ erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	7,07 $\pm$ 0,22
Fêmeas 800mg/kg	7,15 $\pm$ 0,36
Fêmeas 400mg/kg	11,17 $\pm$ 4,20
Fêmeas controle	7,43 $\pm$ 0,29

Tabela 24: Hematócrito médio (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Hematócrito médio $\pm$ erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	40,55 $\pm$ 1,42
Fêmeas 800mg/kg	41,24 $\pm$ 1,86
Fêmeas 400mg/kg	40,33 $\pm$ 1,18
Fêmeas controle	43,20 $\pm$ 1,55

Tabela 25: Número médio de leucócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos $\times 10^3$ por mm^3 de sangue $\pm$ erro padrão
Machos 1200mg/kg	3,24 $\pm$ 0,24
Machos 800mg/kg	8,76 $\pm$ 2,44
Machos 400mg/kg	3,86 $\pm$ 0,18
Machos controle	4,04 $\pm$ 0,28

Tabela 26: Número médio de leucócitos por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos $\times 10^3$ por mm^3 de sangue $\pm$ erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	3,20 $\pm$ 0,96
Fêmeas 800mg/kg	2,86 $\pm$ 0,42
Fêmeas 400mg/kg	8,06 $\pm$ 5,00
Fêmeas controle	2,38 $\pm$ 0,22

Tabela 27: MCH médio (pg) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais ($n=5$) $\pm$ erro padrão.

Grupos	MCH médio $\pm$ erro padrão (pg)
Machos 1200mg/kg	19,92 $\pm$ 0,25
Machos 800mg/kg	21,00 $\pm$ 0,10
Machos 400mg/kg	19,30 $\pm$ 0,41
Machos controle	19,38 $\pm$ 0,07

Tabela 28: MCH médio (pg) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	MCH médio ± erro padrão (pg)
Fêmeas 1200mg/kg	20,38±0,34
Fêmeas 800mg/kg	20,54±0,50
Fêmeas 400mg/kg	20,55±0,39
Fêmeas controle	19,92±0,15

Tabela 29: MCHC médio (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	MCHC médio ± erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	35,65±0,50
Fêmeas 800mg/kg	35,50±0,52
Fêmeas 400mg/kg	35,48±0,28
Fêmeas controle	34,34±0,12

Tabela 30: MCV médio (μm^3) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	MCV médio ± erro padrão (μm^3)
Fêmeas 1200mg/kg	57,50±0,64
Fêmeas 800mg/kg	57,80±0,80
Fêmeas 400mg/kg	58,00±0,81
Fêmeas controle	58,20±0,37

Tabela 31: Concentração média de hemoglobina (g/dL) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Concentração média de hemoglobina ± erro padrão (g/dL)
Fêmeas 1200mg/kg	14,43±0,46
Fêmeas 800mg/kg	14,62±0,57
Fêmeas 400mg/kg	14,33±0,43
Fêmeas controle	14,80±0,52

Tabela 32: Número médio de plaquetas por mm^3 de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de plaquetas x 10^3 por mm^3 de sangue ± erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	687,80±114,8
Fêmeas 800mg/kg	876,60±89,01
Fêmeas 400mg/kg	779,50±56,82
Fêmeas controle	785,40±26,09

Tabela 33: Porcentagem média de leucócitos em anel (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de leucócitos em anel ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	0,60±0,24
Machos 800mg/kg	0±0
Machos 400mg/kg	0,20±0,20
Machos controle	0,16±0,16

Tabela 34: Porcentagem média de leucócitos em anel dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de leucócitos em anel ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0±0
Fêmeas 800mg/kg	0±0
Fêmeas 400mg/kg	0,33±0,33
Fêmeas controle	0,20±0,20

Tabela 35: Número médio de leucócitos em anel por mm³ de sangue dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos em anel por mm ³ de sangue ± erro padrão
Machos 1200mg/kg	18,00±7,59
Machos 800mg/kg	0±0
Machos 400mg/kg	7,20±7,20
Machos controle	6,50±6,50

Tabela 36: Número médio de leucócitos em anel por mm³ dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos em anel por mm ³ de sangue ± erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	2,50±2,50
Fêmeas 800mg/kg	0,00±0,00
Fêmeas 400mg/kg	11,00±11,00
Fêmeas controle	4,60±4,60

Tabela 37: Porcentagem média de eosinófilos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de eosinófilos ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	1,40±0,74
Machos 800mg/kg	0,50±0,00
Machos 400mg/kg	0,20±0,20
Machos controle	0,50±0,22

Tabela 38: Porcentagem média de eosinófilos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de eosinófilos ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,75±0,75
Fêmeas 800mg/kg	1,00±0,57
Fêmeas 400mg/kg	0,33±0,33
Fêmeas controle	0,20±0,20

Tabela 39: Número médio de eosinófilos por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de eosinófilos por mm ³ de sangue ± erro padrão
Machos 1200mg/kg	39,20±18,49
Machos 800mg/kg	13,00±07,50
Machos 400mg/kg	7,20±07,20
Machos controle	20,67±09,51

Tabela 40: Número médio de eosinófilos por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de eosinófilos por mm ³ de sangue ± erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	17,75±12,73
Fêmeas 800mg/kg	25,67±13,96
Fêmeas 400mg/kg	11,00±11,00
Fêmeas controle	3,40±3,40

Tabela 41: Porcentagem média de linfócitos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde a média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de linfócitos ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	85,5±3,47
Fêmeas 800mg/kg	81,67±8,33
Fêmeas 400mg/kg	82,00±7,76
Fêmeas controle	91,00±1,37

Tabela 42: Número médio de linfócitos por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de linfócitos por mm ³ de sangue ± erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	1921,3±185,8
Fêmeas 800mg/kg	2066,1±219,6
Fêmeas 400mg/kg	2521,7±227,4
Fêmeas controle	2190,4±203,7

Tabela 43: Porcentagem média de monócitos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de monócitos ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	1,20±0,37
Machos 800mg/kg	0,50±0,28
Machos 400mg/kg	0,50±0,28
Machos controle	0,80±0,37

Tabela 44: Porcentagem média de monócitos (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de monócitos ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,75±0,47
Fêmeas 800mg/kg	0,75±0,47
Fêmeas 400mg/kg	0,50±0,28
Fêmeas controle	0,40±0,24

Tabela 45: Número médio de monócitos por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de monócitos por mm ³ de sangue ± erro padrão
Machos 1200mg/kg	36,8±11,02
Machos 800mg/kg	16,00±09,23
Machos 400mg/kg	19,00±11,16
Machos controle	34,60±18,63

Tabela 46: Número médio de monócitos por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Número médio de monócitos por mm ³ de sangue ± erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	17,00±10,63
Fêmeas 800mg/kg	16,50±10,21
Fêmeas 400mg/kg	16,25±10,49
Fêmeas controle	10,60±6,58

Tabela 47: Porcentagem média de leucócitos segmentados (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Porcentagem média de leucócitos segmentados $\pm$ erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	13,00 $\pm$ 3,69
Fêmeas 800mg/kg	17,00 $\pm$ 7,50
Fêmeas 400mg/kg	17,33 $\pm$ 7,53
Fêmeas controle	8,20 $\pm$ 1,53

Tabela 48: Número médio de leucócitos segmentados por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos segmentados por mm ³ de sangue $\pm$ erro padrão
Machos 1200mg/kg	442,40 $\pm$ 47,88
Machos 800mg/kg	187,30 $\pm$ 2,90
Machos 400mg/kg	492,40 $\pm$ 132,00
Machos controle	298,20 $\pm$ 53,30

Tabela 49: Número médio de leucócitos segmentados por mm³ de sangue grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Número médio de leucócitos segmentados por mm ³ de sangue $\pm$ erro padrão
Fêmeas 1200mg/kg	294,50 $\pm$ 91,85
Fêmeas 800mg/kg	423,00 $\pm$ 172,60
Fêmeas 400mg/kg	670,70 $\pm$ 375,90
Fêmeas controle	193,40 $\pm$ 38,00

Tabela 50: Peso relativo médio de baço (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio do baço $\pm$ erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	0,24 $\pm$ 0,01
Machos 800mg/kg	0,23 $\pm$ 0,01
Machos 400mg/kg	0,21 $\pm$ 0,0012
Machos controle	0,23 $\pm$ 0,01

Tabela 51: Peso relativo médio de coração (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio do coração ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	0,38±0,05
Machos 800mg/kg	0,30±0,01
Machos 400mg/kg	0,33±0,01
Machos controle	0,30±0,01

Tabela 52: Peso relativo médio de coração (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio do coração ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,32±0,01
Fêmeas 800mg/kg	0,33±0,02
Fêmeas 400mg/kg	0,38±0,03
Fêmeas controle	0,34±0,000693

Tabela 53: Peso relativo médio de pulmões (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio dos pulmões ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	0,58±0,02
Machos 800mg/kg	0,60±0,08
Machos 400mg/kg	0,54±0,14
Machos controle	0,53±0,02

Tabela 54: Peso relativo médio de pulmões (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio dos pulmões ± erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,65±0,02
Fêmeas 800mg/kg	0,80±0,06
Fêmeas 400mg/kg	0,91±0,08
Fêmeas controle	0,70±0,70

Tabela 55: Peso relativo médio de rins (%) dos grupos controle e tratados, de ratos machos, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHDL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) ± erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio dos rins ± erro padrão (%)
Machos 1200mg/kg	0,84±0,03
Machos 800mg/kg	0,84±0,03
Machos 400mg/kg	0,84±0,03
Machos controle	0,80±0,02

Tabela 56: Peso relativo médio de rins (%) dos grupos controle e tratados, de ratos fêmeas, constituintes do ensaio de administração reiterada de EHEL *P.setacea* por 28 dias. Cada valor corresponde à média do número de animais (n=5) $\pm$ erro padrão.

Grupos	Peso relativo médio dos rins $\pm$ erro padrão (%)
Fêmeas 1200mg/kg	0,85 $\pm$ 0,02
Fêmeas 800mg/kg	0,77 $\pm$ 0,02
Fêmeas 400mg/kg	0,85 $\pm$ 0,04
Fêmeas controle	0,82 $\pm$ 0,02