BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos farmacêuticos

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Passiflora edulis*

Sims. (Passifloraceae)

Josseara Beraldo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato

São Paulo

2008

19803

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013939

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Beraldo, Josseara
B482e Estudo farmacognóstico de *Passiflora edulis* Sims. (Passifloraceae)
/ Josseara Beraldo. -- São Paulo, 2008.
85p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kato, Edna Tomiko Myiake

1. Passifloraceae : Farmacognosia 2. Antioxidante : Farmacognosia
3. Maracujá : Farmacognosia 4. Flavonóide : Produtos naturais
I. T. II. Kato, Edna Tomiko Myiake, orientador.

615.323456 CDD

Josseara Beraldo

Estudo Farmacognóstico de *Passiflora edulis* Sims.(Passifloraceae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato
orientador/presidente

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreni
1º. examinador

Profa. Dra. Adriana Lewita Meyer Albiero
2º. examinador

São Paulo, 01 de outubro de 2008.

“Não existe grandeza quando a simplicidade, a
bondade e a verdade estão ausentes.”

Léon Tolstói

Agradecimentos

À Professora Dra. Edna Tomiko Myiake Kato, pela orientação, pelo apoio e confiança para a realização deste trabalho, pela contribuição na minha formação científica e principalmente pelo carinho e amizade.

Aos professores Doutores Elfriede Marianne Bacchi, Dominique Hermine Ficher, Paulo Chanel Deodato de Freitas e Vicente de Oliveira Ferro, do Laboratório de Farmacognosia, pela atenção, incentivo e apoio.

À professora Dra. Maria Luiza Faria Salatino, pela sua inestimável ajuda, atenção e contribuição para este trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, por permitir que alguns ensaios fossem feitos em seu laboratório. Agradecendo também seus alunos em especial o amigo Diogo Pineda Rivelli, por toda atenção e auxílio.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, mestrandos, doutorandos e estagiários, por dividirem não só a bancada, mas os momentos alegres e tristes, em especial às amigas Fabiana Lima Silva, Maria Carolina Ederlyi e ao amigo André Wasicky.

Aos funcionários do Laboratório e da secretaria da Farmacognosia pela ajuda e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências, pela atenção e amizade e aprendizagem.

Ao amigo Antônio Carlos Franco Barbosa do Instituto de Pesquisas tecnológicas, pela realização dos cortes histológicos, mas principalmente por toda inestimável amizade.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, por toda a atenção, em especial a bibliotecária Leila Aparecida Bonadio pela paciência ao revisar as referências bibliográficas deste trabalho.

À minha família por toda ajuda, em especial meu pai José Beraldo dos Santos (*in memorian*) e minha mãe Dilma de Andrade Beraldo que sempre me incentivaram a estudar e acreditar em meus sonhos.

A Marcelo Campos Castro Nogueira e família, pelo apoio, ajuda, incentivo e por todo carinho. Agradeço também por ter me “ensinado” a meditar (MT), fato este importante para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos que nunca faltaram nos momentos de felicidade e de dificuldade, em especial aos irmãos Cruz, Paula e Lúcio, que jamais me deixaram desanimar.

Ao Universo comandado por Deus, por me ajudar a realizar os meus sonhos e a Jesus meu grande amigo.

RESUMO

Os extratos de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae), comumente empregados no tratamento de diversas doenças em regiões tropicais e subtropicais, têm se mostrado fonte em potencial de medicamentos. O uso popular de espécies vegetais pertencentes a esse gênero decorrente de suas propriedades sedativas consta a partir do século 17 na Europa. Após cerca de 200 anos, foram documentados os estudos farmacológicos iniciais com *P. incarnata*. No Brasil, uma espécie morfológicamente assemelhada a essa – *P. edulis* Sims. – tem encontrado uso como sedativo, ansiolítico, diurético e no tratamento de distúrbios gastrintestinais, embora esta espécie seja explorada comercialmente na produção de sucos concentrados. Pesquisadores têm avaliado a atividade de extratos de folhas de *P. edulis* no sistema nervoso central. Considerando o uso popular e a falta de trabalhos científicos avaliando a ação no sistema digestório, o extrato liofilizado preparado com as folhas e com os caules dessa espécie foi ensaiado em ratos, empregando-se solução de etanol acidificado como indutor de úlceras. A triagem fitoquímica e a avaliação da atividade antioxidante (DPPH, ORAC) foram realizadas para verificar o potencial uso dos metabólitos encontrados no extrato. O método espectrofotométrico foi empregado na análise do teor flavonoídico. As técnicas de Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria UV/visível foram utilizadas para analisar as frações flavonoídicas. A caracterização morfoanatômica das folhas e dos caules da espécie foi efetuada como auxiliar no controle de qualidade da droga vegetal. No modelo ensaiado, o extrato de *P. edulis* não mostrou atividade antiúlcera promissora. Nessa fase não se pode descartar seu uso no tratamento de úlceras gástricas. O extrato liofilizado apresentou teor flavonoídico de 1,2% e atividade antioxidante, demonstrada com os métodos empregando DPPH (EC_{50} de 160 μ g/mL) e ORAC ($775,35 \pm 36,12$ μ mol eq Trolox/g de extrato). Na análise preliminar das frações flavonoídica foi evidenciada a predominância de flavonas. Caracteres morfoanatômicos importantes na análise da droga vegetal foram documentados.

Abstract

The extracts of *Passiflora* spp. (Passifloraceae), commonly used in the treatment of several diseases from tropical and subtropical regions, have been proving to be a potential source for the preparation of medicines. Because of their sedating properties, popular use of vegetal species belonging to this genus has been found since the 17th century in Europe. Then, after 200 years, early pharmacologic studies with *P. incarnata* were documented. In Brazil, one species morphologically similar to this one – *P. edulis* Sims. – has been used as sedative, anxiolytic, diuretic and for the treatment of gastrointestinal diseases, although this species has been commercially explored in the production of concentrated juices. Researchers have been evaluating the effects of the extract of *P. edulis* leaves in the central nervous system. Considering its popular use and the lack of scientific research evaluating its effect in the digestive tract, the freeze-dried extract prepared with its leaves and stems was tested in rats. Acute gastric lesions were induced by acidified solution of ethanol. The phytochemical screening and the antioxidant effects evaluation (DPPH, ORAC) have been carried out in order to evaluate the potential use of metabolites found in the extract. The spectrophotometric method was applied in the analyses of flavonoids content. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and UV/visible methods were used to analyze the flavonoid fractions. Morphoanatomic characterization of leaves and stems of the species was done to applied in the quality control of the crude drug. In the tested model, *P. edulis* extract did not show its potential gastroprotective property. At this point we can not discard its use to treat gastric ulcers. The flavonoid content quantified in the extract were 1,2%. The freeze-dried extract presented antioxidant activity, demonstrated with DPPH (EC_{50} de 160µg/mL) and ORAC ($775,35 \pm 36,12$ µmol eq Trolox/g) methods. The chemical profile of flavonoid fractions showed predominant concentration of flavones. Important morphoanatomic characters of the crude drug were documented.

Lista de ilustrações

Figura 1. Ramos floridos e frutos de: A) <i>Passiflora edulis</i> Sims.; B) <i>P. alata</i> Curtis; C) <i>P. incarnata</i> L.	12
Figura 2. Principais flavonóides de <i>Passiflora edulis</i> , <i>P. alata</i> e <i>P. incarnata</i>	13
Figura 3. Alcalóides β -carbolínicos de espécies de <i>Passiflora</i>	14
Figura 4. Glicosídeos cianogênicos e maltol de espécies de <i>Passiflora</i>	15
Figura 5. Triterpenóides de <i>Passiflora edulis</i>	16
Figura 6. Triterpenóides e saponinas de <i>Passiflora edulis</i>	17
Figura 7. Saponinas de <i>Passiflora edulis</i>	18
Figura 8. <i>Passiflora edulis</i> Sims. Folha	37
Figura 9. <i>Passiflora edulis</i> Sims. Lâmina foliar.	38
Figura 10. <i>Passiflora edulis</i> Sims. Pecíolo	39
Figura 11. <i>Passiflora edulis</i> Sims. Caule.....	40
Figura 12. <i>Passiflora edulis</i> Sims. Caule secundário.	41
Figura 13. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) do extrato bruto liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	44
Figura 14. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 9.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	44
Figura 15. Espectros UV/Vis dos picos F ₁ , F ₂ , F ₃ e F ₄ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 9.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	45
Figura 16. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 9.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.	46
Figura 17. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 12.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	46
Figura 18. Espectros UV/Vis dos picos F ₁ , F ₂ e F ₃ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 12.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	47
Figura 19. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 12.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.	47
Figura 20. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 14.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	48

Figura 21. Espectros UV/Vis dos picos F ₁ , F ₂ e F ₃ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 14.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	48
Figura 22. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 14.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	49
Figura 23. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 14.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	49
Figura 24. Espectros UV/Vis dos picos F ₁ , F ₂ , F ₃ e F ₄ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 14.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	50
Figura 25. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 14.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	50
Figura 26. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 15.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.	51
Figura 27. Espectros UV/Vis dos picos F1 assinalado no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 15.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.	51
Figura 28. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 15.2 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	51
Figura 29. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 16.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims	52
Figura 30. Espectros UV/Vis dos picos F1 e F2 assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 16.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	52
Figura 31. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 16.1 do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	52
Figura 32. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais controle, tratados com água (10mL/kg), por via oral, no modelo de indução por etanol acidificado.	53
Figura 33. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais controle, tratados com lansoprazol na dose de 30mg/kg por via oral, no modelo de indução por etanol acidificado.	53
Figura 34. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims. na dose de 100mg/kg por via oral no modelo de indução por etanol acidificado	54
Figura 35. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims. na dose de 200mg/kg por via oral no modelo de indução por etanol acidificado.	54

Figura 36. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims. na dose de 400mg/kg por via oral pelo modelo de indução por etanol acidificado.....	55
Figura 37. Representação gráfica da Área total de lesão no ensaio antiúlcera agudo no modelo de indução por etanol acidifica.....	55
Figura 38. Representação gráfica da Área relativa de lesão no ensaio antiúlcera agudo no modelo de indução por etanol acidificado	56
Figura 39. Gráfico de atividade antioxidante (%) x Concentração µg/mL do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	58
Figura 40. Gráfico de atividade antioxidante (%) x Concentração µg/mL da substância de referência - Trolox.....	59
Figura 41. Gráfico da diferença de área sob a curva (net AUC) de decaimento de fluorescência em relação à concentração da amostra (<i>Passiflora edulis</i>).....	60

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais grupos fitoquímicos avaliados na droga vegetal e no extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims.....	42
Tabela 2. Tempos de retenção (T_R) das amostras autênticas obtidas por CLAE.....	43
Tabela 3 – Médias das áreas totais de lesão, área relativa de lesão em estômagos de ratos, após administração do extrato liofilizado de <i>Passiflora edulis</i> Sims. nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, lansoprazol (30mg/kg) e água (10mL/kg).....	57

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Principais passifloras medicinais	2
1.2.1. <i>Passiflora edulis</i> Sims.	3
1.2.2. <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	8
1.2.3. <i>Passiflora incarnata</i> L.	10
2. Objetivo/Justificativa.....	19
3. Material e métodos.....	20
3.1. Material vegetal	20
3.2. Estudo farmacobotânico.....	20
3.3. Preparo do extrato liofilizado	21
3.4. Triagem fitoquímica	22
3.4.1. Flavonóides	22
3.4.1.2. Extração	22
3.4.1.3. Sistema cromatográfico.....	22
3.4.2. Alcalóides	23
3.4.2.1. Extração	23
3.4.2.2. Sistema cromatográfico.....	23
3.4.3. Saponinas	23
3.4.3.1. Extração	23
3.4.3.2. Índice de espuma	24
3.5. Teor de flavonóides	24
3.5.1 Preparo de soluções.....	25
3.5.2. Solução A	25
3.5.3. Solução B.....	25
3.5.4. Solução mãe	25
3.5.5. Solução teste.....	25
3.5.6. Solução de compensação	26
3.5.7. Leitura	26
3.5.8. Cálculo	26
3.6. Extração e identificação de flavonóides	27
3.6.1. Purificação do extrato bruto.....	28
3.6.2. Análise cromatográfica (CLAE)	28
3.6.2.1. Sistema cromatográfico.....	29
3.7. Bioensaios.....	29
3.7.1 Atividade antiúlcera	29
3.7.1.1. Animais.....	29
3.7.1.2. Ensaio	29
3.7.1.3. Análise dos resultados	31
3.8. Atividade antioxidante	31
3.8.1. Ensaio com radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	31
3.8.1.2. Ensaio	31
3.8.1.3. Cálculo	32
3.8.2. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> - ensaio de ORAC.....	32
3.8.2.1. Ensaio	33
3.8.2.2. Cálculo	33
4. Resultados	35

4.1. Estudo farmacobotânico.....	35
4.1.1. Descrição macroscópica	35
4.1.2. Descrição microscópica.....	35
4.1.2.1. Lâmina foliar.....	35
4.1.2.2. Caule	36
4.2. Triagem fitoquímica.....	42
4.3. Teor de flavonóides.....	42
4.4. Extração e identificação de flavonóides	42
4.5. Atividade antiúlcera	53
4.6. Atividade antioxidante	58
4.6.1. Ensaio com radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	58
4.6.2. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i> . Ensaio de ORAC.....	59
5. Discussão.....	61
5.1. Morfoanatomia de folhas e de caules de <i>P. edulis</i>	61
5.2. Perfil fitoquímico do extrato de <i>P. edulis</i>	64
5.3. Atividade antiúlcera	66
6. Conclusões.....	69
7. Referências bibliográficas	70
Anexo obrigatório	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

O uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças é conhecido desde a remota antiguidade. Os registros mais antigos surgiram na China (2.700 aC.) e no Egito (1.500 aC.), bem como na Bíblia escrita pelos Hebreus. Dentre os nomes mais famosos da história, encontra-se Hipócrates, pai da medicina moderna, que catalogou e utilizou centenas de drogas de origem vegetal. Teofrasto (225 aC.) e Dioscórides (20 dC.), foram autores de valiosas obras que por mais de 1.500 anos influenciaram o uso de plantas medicinais para a cura de doenças (PINTO *et al.*, 2002; CARVALHO, 2004).

Em todo o mundo, a fitoterapia foi peça essencial do arsenal terapêutico até o início do século XIX, cedendo espaço aos produtos sintéticos dotados de efeito farmacológico mais específico, mas muitas vezes tendo como protótipo, moléculas isoladas de espécies vegetais. Assim, as plantas medicinais passaram a ter uso apenas como terapia alternativa no Brasil e em países em desenvolvimento, onde 80% da população não têm acesso à saúde básica (CALIXTO, 2003; CARVALHO, 2004).

Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS), destacou a importância do uso da medicina tradicional em populações que não tem acesso à saúde. No mesmo documento, incentivou o uso de terapias tradicionais de eficácia comprovada, reduzindo os gastos com medicamentos e, reforçando que dentre os produtos naturais, as plantas medicinais, poderiam fornecer novas substâncias terapêuticas.

Entre 2002 e 2005, a OMS reforçou sua estratégia mundial de incentivo às terapias tradicionais, enfatizando a importância de inseri-las no sistema oficial de saúde de seus 191 estados-membros.

O Brasil implanta, em 2006, a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), onde entre as práticas tradicionais, encontra-se a Medicina Chinesa e a Fitoterapia (BRASIL, 2006).

Dentre os países no mundo, o Brasil possui a maior biodiversidade, estimada em 20% do número total de espécies do planeta. Esse patrimônio genético tem

grande valor econômico e estratégico, principalmente no desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2003; SCHENKEL *et al.*, 2004).

Embora as plantas medicinais tenham essa essencial importância no restabelecimento da saúde da população, o controle de qualidade desses fitoterápicos não tem recebido dos órgãos responsáveis, a atenção necessária ao seu desenvolvimento. A melhor forma de efetuar o controle de qualidade é assegurar uma correta seqüência de operações, desde o plantio até o produto final que chega ao usuário (LORENZI, MATOS, 2002).

Dentro do âmbito de controle de qualidade de fitoterápicos, *Passiflora*, gênero a que pertencê a espécie tema desta dissertação, não fica aquém desse problema. A população leiga desconhecendo a espécie de *Passiflora* oficial (*P. alata*), muitas vezes emprega *P. edulis*, sejam frutos como folhas, no tratamento de insônia. Pesquisadores, muitas vezes brasileiros, têm se dedicado ao estudo fitoquímico e farmacológico de extratos preparados com as folhas de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, por vezes comparativamente. A seguir, são relacionados os estudos realizados com as folhas das principais passifloras medicinais.

1.2. Principais passifloras medicinais

No Brasil, os “maracujás”, plantas pertencentes ao gênero *Passiflora* (Passifloraceae), são indistintamente utilizadas como ansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (OGA *et al.*, 1984). Diversas passifloras, silvestres ou cultivadas, são tradicionalmente conhecidas no âmbito da medicina popular em vários países (LORENZI, MATOS, 2002).

P. caerulea, nativa do Brasil e introduzida na Grã Bretanha no século XVII, é utilizada tradicionalmente como sedativo e ansiolítico. A infusão das folhas de *P. foetida* é usada para histeria e insônia na Nigéria. *P. quadrangularis* é utilizada no Caribe como sedativo e para dores de cabeça (DHAWAN *et al* 2004). *P. ligularis* é usado para diarreia, disenteria, dores de estômago e indigestão na Guatemala (CACERES *et al.*, 1990).

Dentre as passifloras, *P. incarnata* é a espécie mais estudada, e inscrita em diversas farmacopéias estrangeiras. A Farmacopéia Brasileira, nas três primeiras

edições, elegeu como oficial *P. alata*, apesar desta ser comparativamente pouco estudada (OGA *et al.*, 1984).

Embora flavonóides, terpenóides, alcalóides β -carbolínicos e derivados de pironas sejam componentes isolados de espécies de *Passiflora*, as substâncias responsáveis pelas atividades sedativa e ansiolítica não estão determinadas. Alguns autores apontam os flavonóides como os principais responsáveis por esta atividade (PEREIRA, VILEGAS, 2000; CARLINI, 2003; DHAWAN *et al.*, 2004; COLETA *et al.*, 2006).

Dentre as passifloras, *P. edulis* apresenta elevado valor econômico para a produção de frutos usados *in natura* e para a obtenção de suco concentrado (BERNACCI, 2003; SILVA, 2005).

1.2.1. *Passiflora edulis* Sims.

P. edulis (figura 1A) é conhecida popularmente por maracujá-amarelo, maracujá-roxo, maracujá-azedo e maracujá-do-mato. Na literatura encontram-se referências mencionando *P. edulis* e *P. edulis* fo. *flavicarpa*. Esta última, considerada mutante, foi descrita por Degener em 1932, em função de seus frutos amarelos. Entretanto, Killip (1938) considerou a distinção em formas e variedades inconsistente para esta espécie. Bernacci (2003), observando a possível origem da espécie de frutos amarelos a partir de mutação, considera apropriado tratá-la como cultivar.

Constam como sinônimos de *P. edulis* as denominações seguintes: *P. diaden* Vell.; *P. edulis* var. *pomifera* (M. Roem.) Mast.; *P. edulis* var. *rubricaulis* (Jacq.) Mast.; *P. edulis* var. *verrucifera* (Lindl.) Mast.; *P. gratissima* A. St.-Hil.; *P. iodocarpa* Barb. Rodr.; *P. middletoniana* Paxton ; *P. minima* Blanco; *P. pallidiflora* Bertol.; *P. picroderma* Barb. Rodr.; *P. pomifera* M. Roem.; *P. rigidula* J. Jacq.; *P. rubricaulis* Jacq.; *P. vernicosa* Barb. Rodr.; *P. verrucifera* Lindl. (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2008).

Esta trepadeira ocorre em todo o Brasil, no Paraguai, Argentina, ilhas das Índias Ocidentais, na América Central, Venezuela e Equador (BERNACCI, 2003).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo (ITI Tropicals, 2008). O cultivo predomina na região nordeste, notadamente nos Estados da Bahia e de Sergipe, com cerca de 10 mil e 4 mil hectares respectivamente. Na região sudeste é cultivada em São Paulo (3,1 mil ha), Minas Gerais (2,6 mil ha) e Espírito Santo (2,3 mil ha). A área plantada mantém-se ao redor de 35 mil hectares. Apesar da liderança na produção destes frutos, as exportações brasileiras de frutos frescos representam 1,5% (ENDO *et al.*, 2007).

Na medicina popular, a espécie tem sido empregada no tratamento de ansiedade, insônia, enxaqueca, bronquite, asma e problemas gastrintestinais (MALUF *et al.*, 1991; GUPTA, 1995). O uso tópico das folhas fragmentadas pode auxiliar no tratamento de hemorróidas (ALMEIDA, 1993). No Peru, o infuso das folhas é empregado como sedativo e relaxante muscular (BACK EGG, 1999).

Na América do Sul tem sido usada como sedativa, diurética, antihelmíntica, antidiarréica, estimulante, tônica, no tratamento da hipertensão e para os sintomas da menopausa e cólica infantil. Considerada também, um estimulante digestivo é utilizada no tratamento de carcinoma gástrico na Ilha da Madeira (DHAWAN *et al.*, 2004).

Em relação ao aspecto fitoquímico, flavonóides C-glicosídeos foram os componentes mais comuns em *P. edulis* (PEREIRA, VILEGAS, 2000). Neste grupo de substâncias, a parte glicosídica está ligada diretamente ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono nas posições 6 e 8 (figura 2). A glicose é o principal açúcar encontrado (MARKHAM, 1982).

Em seguida, são apresentados os trabalhos relatando os flavonóides encontrados em *P. edulis*.

No primeiro trabalho farmacognóstico comparativo de espécies de *Passiflora* (*P. alata*, *P. edulis*, *P. quadrangulares* e *P. incarnata*), Freitas, em 1985, detectou vitexina, isovitexina e orientina nas folhas de *P. edulis*.

Na década seguinte, foram isolados dois novos flavonóides C-glicosilados, a 6-C-quinovosil-luteolina e a 6-C-fucosil-luteolina (MARECK *et al.*, 1991).

Moraes e colaboradores (1997), ao compararem o método de extração por fluido supercrítico de folhas de *P. edulis* com o método tradicional, identificaram em suas folhas, os flavonóides vitexina e orientina.

Petry e colaboradores (2001), em estudo comparativo com *P. alata*, verificaram a presença dos flavonóides, vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, por análise cromatográfica de alta eficiência (CLAE) em folhas de *P. edulis*.

Pereira e colaboradores (2006), analisando extratos de folhas de passifloras (*P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. caerulea*) por CLAE, verificaram a presença de orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, nas 3 espécies; porém, em *P. alata* não foi observada a vitexina.

Ferreres e colaboradores (2007), caracterizaram por CLAE e espectrometria de massas, 16 derivados de apigenina ou luteolina, sendo estes mono-C-glicosilados, O-glicosil-C-glicosilados e O-glicosilados.

A seguir, são apresentados os trabalhos relatando os alcalóides encontrados em *P. edulis*.

Os alcalóides β -carbolínicos foram os mais citados para o gênero. Este grupo de substâncias apresenta estrutura indólica (TSUCHIYA, 1999). São representados no gênero pelos alcalóides harmana, harmina, harmol, harmalol, harmalina (figura 3) (LUTOMSKI, 1959; LUTOMSKI *et al.*, 1967). Esses alcalóides ocorrem em diversas famílias e a eles podem ser atribuídas atividades farmacológicas, tais como, antihipertensiva, inibidora da monoaminoxidase, alucinógena e estimulante no sistema nervoso central (ABOURASHED *et al.*, 2003).

O alcalóide harmana foi encontrado em teores reduzidos, da ordem de $\mu\text{g/g}$, em folhas e caules da espécie (SLAYTOR, McFARLANE, 1968).

Lutomski e Malek (1975) compararam o teor de alcalóides β -carbolínicos nos órgãos aéreos de *P. edulis* e verificaram que o mesmo ocorria em maior teor nas folhas. Freitas (1985), confirma a presença do alcalóide harmana nas folhas de *P. edulis* em estudo comparativo de quatro espécies de *Passiflora*.

Abourashed e colaboradores (2003) determinaram o perfil cromatográfico em CLAE de 104 espécies de *Passiflora*, detectando a presença dos alcalóides harmana e harmalina em folhas de *P. edulis*.

Além desses grupos de compostos químicos (alcalóides e flavonóides), glicosídeos cianogênicos, saponinas e triterpenóides foram relatados em algumas passifloras. Em *P. edulis* foram relatados esses constituintes como segue.

Glicosídeos cianogênicos como prunasina, sambunigrina (figura 4) e derivados (SPENCER, SEIGLER, 1983; SEIGLER *et al.*, 2002), assim como, passiedulina foram isolados de folhas de *P. edulis* (CHRISTENSEN, JAROSZEWSKI, 2001).

Triterpenóides como os ácidos ciclopassiflóicos A-D (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^a) (figura 5), ciclopassiflóicos E-G (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^b) e, saponinas como ciclopassiflosídeos I–VI (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^a) e ciclopassiflosídeos VII–XI (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^b) foram isolados das folhas e dos caules de *P. edulis* (figuras 6 e 7).

Passiflorina foi a primeira saponina isolada das folhas de *P. edulis* por Bombardelli e colaboradores, em 1975 (figura 6).

Embora uma grande variedade de substâncias tenha sido encontrada no gênero *Passiflora*, poucas pesquisas no âmbito farmacológico foram realizadas. A maioria dos trabalhos relatados mostra os efeitos depressores do sistema nervoso central (CARLINI, 2003; DHAWAN, 2004; COLETA *et al.*, 2006; REGINATTO *et al.*, 2006).

Os estudos farmacológicos relacionados em seguida utilizaram extratos hidroalcoólicos ou aquosos de folhas de *P. edulis*.

O extrato aquoso, preparado de forma semelhante ao chá utilizado popularmente, apresentou atividade depressora geral do sistema nervoso central em camundongos. Os animais apresentaram redução da temperatura corpórea, indução ao sono, potencialização da ação hipnótica do pentobarbital e de depressores como a morfina (VALE, LEITE, 1983).

Os efeitos sedativos e hipnóticos do extrato de folhas de *P. edulis* foram avaliados em voluntários sadios e em animais (ratos e camundongos). Foi observada a ação depressiva não específica no sistema nervoso central. Os voluntários tratados com as doses empregadas na medicina popular não apresentaram alterações significativas na indução, tempo e qualidade de sono. Os autores avaliaram adicionalmente a toxicidade do extrato das folhas em voluntários, utilizando o chá a 10% (m/v), semelhante ao usado popularmente. Parte dos voluntários apresentou indícios de lesão hepática ou indução enzimática; outros

voluntários mostraram disfunção hepatobiliar ou aumento no nível de ácido úrico (MALUF *et al*, 1991).

Petry e colaboradores (2001) avaliaram comparativamente os extratos hidroalcoólicos liofilizados de folhas de *P. alata* e de *P. edulis*, quanto a atividades no sistema nervoso central. A atividade ansiolítica de *P. edulis* foi observada na dose de 50mg/kg, metade da dose de *P. alata*. A atividade sedativa em doses de 50 e 100 mg/kg de *P. edulis* sugeriu efeito sedativo inferior ao diazepam. No mesmo ano, Dhawan e colaboradores, ao contrário, não observaram atividade ansiolítica em camundongos, empregando os extratos em éter de petróleo, clorofórmio, metanol e água preparados com os órgãos aéreos da planta. No ano seguinte, Bruschi e colaboradores (2002), empregando o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *P. edulis*, demonstraram ação depressora do sistema nervoso central em camundongos.

Estudo comparativo dos extratos hidroalcoólicos de *P. edulis* e de *P. alata* foi realizado por Rudnicki e colaboradores (2005). *P. alata* apresentou atividade antioxidante *in vitro* superior à de *P. edulis*, mas os autores consideraram as 2 espécies promissoras fontes de substâncias para a prevenção de patologias, tais como, diabetes e doenças neurodegenerativas.

Reginatto e colaboradores, em 2006, administrando o extrato seco de *P. edulis* em ratos, verificaram sua potencial atividade ansiolítica. No mesmo ano, Coleta e colaboradores confirmaram a atividade ansiolítica para o extrato aquoso liofilizado das folhas, administrado por gavagem a camundongos e, relacionaram a ação à presença de flavonóides.

Gonçalves Filho e colaboradores (2006), empregando o extrato hidroalcoólico, relataram a redução da inflamação, maior proliferação de fibroblastos, formação de colágeno e neoformação capilar na cicatrização de bexiga de ratos. Os dois trabalhos seguintes referem-se à complementação deste. Gomes e colaboradores (2006), utilizando extrato similar, descrevem a cicatrização de incisões na parede abdominal de ratos, sob o aspecto morfológico e tensiométrico. Silva e colaboradores (2006), acompanhando estes dois ensaios anteriores, mostraram a influência favorável do extrato na cicatrização de gastrorrafias em ratos, relacionado ao aumento na proliferação de fibroblastos.

Em 2007, Vargas e colaboradores verificaram atividade antiinflamatória em camundongos, empregando o extrato seco das folhas, no modelo de pleurisia.

Montanher e colaboradores (2007) sugerem que a atividade antiinflamatória deve-se a diversos mecanismos, incluindo a inibição de citocinas pro-inflamatórias, mieloperoxidase e, liberação e/ou inibição de mediadores (bradicinina, histamina, substância P, óxido nítrico).

Benincá e colaboradores (2007) investigando o mesmo efeito em ratos, utilizaram o extrato aquoso de folhas e confirmaram pronunciada atividade antiinflamatória, inibição de migração de células, citocinas pró-inflamatórias, enzimas e mediadores.

Muller e colaboradores (2007), em triagem de espécies sul americanas, evidenciaram atividade anti-herpética, *in vitro*, do extrato aquoso de raízes de *P. edulis*. Os autores sugerem que a atividade deve-se à presença de saponinas.

1.2.2. *Passiflora alata* Curtis

Passiflora alata (figura 1B), trepadeira provavelmente originária do Brasil, já foi atribuída a outros dois autores: Aiton e Dryander. A revisão taxonômica da espécie considera que o autor que deve prevalecer é Curtis (BERNACCI *et al.*, 2003). Assim, os sinônimos encontrados para a espécie são: *P. alata* Dryand, *P. alata* var. *latifolia* (DC) Mast., *P. latifolia* DC e *P. phoenicia* Lindl. (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2008).

Esta espécie ocorre no Brasil, Equador, Peru, Paraguai e Argentina. No país há registros no Pará, da Bahia ao Rio Grande do Sul e no Centro-Oeste. É uma das espécies de *Passiflora* de maior importância econômica pelo consumo dos frutos *in natura*, em sobremesas e, pelo uso do extrato das folhas em medicamentos fitoterápicos (BERNACCI, 2003).

A monografia da farmacopéia brasileira não descreve ensaios de determinação do teor de qualquer grupo de substâncias nessa droga vegetal. Assim, Freitas (1985) e Mezo (2005) revisaram os caracteres morfoanatômicos e determinaram o teor flavonoídico de suas folhas utilizando métodos cromatográficos.

A avaliação do teor desse grupo de substâncias também foi preocupação de outros autores (PETRY *et al.*, 1998; PARIS *et al.*, 2002).

Sob o aspecto fitoquímico, algumas substâncias foram evidenciadas em suas folhas. Ulubelen e colaboradores (1982) descreveram vitexina, 2"-xilosil-vitexina e orientina.

Freitas (1985), na análise cromatográfica em camada delgada do extrato de suas folhas, observou manchas coincidentes com orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, e harmana.

Sob o aspecto farmacológico, alguns pesquisadores brasileiros (OGA *et al.*, 1984, PETRY *et al.*, 2001) avaliaram o efeito do extrato de suas folhas, principalmente, no sistema nervoso central.

Oga e colaboradores (1984) verificaram que o extrato nas doses de 75 e 150 mg/kg, potencializou o sono induzido pelo pentobarbital em ratos, aumentou o tempo de latência na convulsão provocada por esticnina e diminuiu a atividade motora espontânea em ratos.

Petry e colaboradores (2001) comprovaram a atividade ansiolítica do extrato em animais de laboratório.

Doyama e colaboradores (2005) não observaram modificação significativa da concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mas alteração do metabolismo lipídico, com aumento no nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL), sem modificação da concentração de colesterol total. Também isolaram e identificaram as saponinas triterpênicas, quadrangulosídeo e ácido 3-soforosil-oleanólico e, os flavonóides 2"-O-ramnosil-vitexina, 2"-O-ramnosil-escoparina, 2"-O-ramnosil-orientina, isoorientina e isovitexina.

Sob o aspecto toxicológico, Oga e colaboradores (1984) constataram que o extrato de suas folhas causou depressão profunda e morte, em doses acima de 400 mg/kg em camundongos. Esses autores estimaram a DL50 em 456 mg/kg.

Giavina-Bianchi e colaboradores (1997) verificaram sensibilização *in vivo* e *in vitro* causada pelos extratos dessa planta, alertando para o risco de asma e rinite ocupacional em manipuladores de farmácia.

1.2.3. *Passiflora incarnata* L.

Passiflora incarnata L. (figura 1C) é uma trepadeira comum nos Estados Unidos da América e Caribe, que pode alcançar 10m. Suas delicadas flores variam de branco a arroxeado. Alguns autores (BRASSEUR, ANGENOT, 1984) consideram-na originária do Brasil. Como sinônimos da espécie constam: *P. edulis* var. *kerii* (Spreng.) Mast.; *P. incarnata* var. *integriloba* DC. e *P. kerii* Spreng. (MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2008).

Os órgãos aéreos dessa espécie são oficializados em farmacopéias estrangeiras, tais como, a Francesa (1965), a Suíça (1971), a Européia (2005) e a Britânica (2005), entre outras.

Flavonóides, principalmente C-glicosídeos de apigenina e luteolina (QIMIN *et al.*, 1991, RAFAELLI *et al.*, 1997, RAHMAN *et al.*, 1997, CHIMICHI *et al.*, 1998), como isovitexina, isoorientina e seus 2"-β-D-glicosídeos, chaftosídeo, isochaftosídeo, vicenina e esvertisina foram isolados de seus extratos.

Os alcalóides harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina foram inicialmente encontrados em *P. incarnata*, utilizando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (LUTOMSKI, 1959; LUTOMSKI, 1960).

Componentes, tais como, glicosídeos cianogênicos (ginocardina) (SPENCER, SEIGLER, 1984), óleo volátil (BUCHBAUER *et al.*, 1992) e alcalóides carbolínicos como harmana (REHWALD *et al.*, 1995) foram relatados ocasionalmente e, em teores reduzidos. Maltol (0,05%), isolado por Aoyagi e colaboradores (1974) foi considerado um artefato por Meier (1995).

Sob o aspecto farmacológico, grande parte dos estudos avaliou a atividade no sistema nervoso central.

Speroni e Minghetti (1988) administrando o extrato etanólico em ratos, por via intraperitoneal, observaram efeito analgésico, aumento do tempo de sono induzido por pentobarbital e redução da atividade locomotora. As atividades foram atribuídas a um composto lipofílico e a um outro, polar.

Dois anos depois, Sopranzi e colaboradores (1990) administrando um extrato hidroetanólico, por via oral, em ratos, por mais de 3 semanas, em doses

correspondentes a 5g/kg, observaram redução na atividade no modelo do labirinto em cruz elevado.

Soulimani e colaboradores (1997) administrando o extrato liofilizado, por via intraperitoneal, em camundongos, observaram efeito, que sugeriram como ansiolítico. A mistura de flavonóides e alcalóides com maltol não modificou os parâmetros comportamentais no modelo usado.

Alguns autores (BORELLI *et al.*, 1996) avaliaram a atividade antiinflamatória do extrato liofilizado, administrado por via oral, em ratos. Verificaram efeito dose-dependente.

Embora, a maior parte dos estudos direcionem o uso como ansiolítico, há autores apresentando resultados conflitantes (WEISCHER, OKPANYL, 1994) e permanecem indeterminadas as substâncias responsáveis pela atividade.

A Comissão E Alemã (BLUMENTHAL *et al.*, 1998), em sua monografia de *P. incarnata*, descreve como indicações terapêuticas os casos de insônia, tensão e irritabilidade. Nos itens relacionados a contra-indicações, efeitos colaterais e interação com fármacos, os efeitos não são conhecidos.

Figura 1. Ramos floridos e frutos de: A) *Passiflora edulis* Sims.; B) *P. alata* Curtis; C) *P. incarnata* L. (LORENZI e MATOS, 2002).

Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Apigenina	H	OH	H	OH	H	H
Chaftosídeo	Glc	OH	Ara	OH	H	H
Esvertisina	Glc	OCH ₃	H	OH	H	H
Isochaftosídeo	Ara	OH	Glc	OH	H	H
Isoorientina	Glc	OH	H	OH	OH	H
Isovitexina	Glc	OH	H	OH	H	H
Lucenina	Glc	OH	Glc	OH	OH	H
Luteolina	H	OH	H	OH	OH	H
Orientina	H	OH	Glc	OH	OH	H
Rutina	H	OH	H	OH	OH	O-Rha-Glc
Vicenina	Glc	OH	Glc	OH	H	H
Vitexina	H	OH	Glc	OH	H	H

Ara=α-L-arabinosil, Glc=glicosil, Rha=ramnosil.

Figura 2. Principais flavonóides de *Passiflora edulis*, *P. alata* e *P. incarnata*

Figura 3. Alcalóides β -carbolínicos de espécies de *Passiflora*.

maltol

ginocardina

Glicosídeo Cianogênico	R	R ₁	R ₂
Passiedulina	H	OH	H
Prunasina	H	H	OH
Sambunigrina	OH	OH	OH

Figura 4. Glicosídeos cianogênicos e maltol de espécies de *Passiflora*.

Ácido ciclopassiflóico: A $R_1=COOH$, $R_2=R_4=H$, $R_3=OH$

Ácido ciclopassiflóico: C $R_1=COOH$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$

Ácido ciclopassiflóico: B $R_1=R_2=R_3=R_4=H$

Ácido ciclopassiflóico D: $R=H$

Figura 5. Triterpenóides de *Passiflora edulis*.

Ácido ciclopassiflóico E: $R_1=R_4=H$, $R_2=\beta\text{-OH}$, $R_3=OH$

Ácido ciclopassiflóico F: $R_1=R_3=R_4=H$, $R_2=\beta\text{-OH}$

Ácido ciclopassiflóico G: $R_1=R_3=R_4=H$, $R_2=\alpha\text{-OH}$

Ciclopassiflosídeo I: $R_1=COOGlc$, $R_2=R_4=H$, $R_3=OH$

Ciclopassiflosídeo IV: $R_1=COOGlc$, $R_2=OH$, $R_3=R_4=H$

Ciclopassiflosídeo V: $R_1=COOGlc$, $R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=Glc$

Figura 6. Triterpenóides e saponinas de *Passiflora edulis*.

Ciclopassiflosídeo II : $R_1=R_3=R_4=H$, $R_2=Glc$

Ciclopassiflosídeo III : $R_1=R_4=H$, $R_2=R_3=Glc$

Ciclopassiflosídeo VI: $R=Glc$

Ciclopassiflosídeo VII = $R_1=Glc$, $R_2=\beta-OH$, $R_3=OH$, $R_4=H$

Ciclopassiflosídeo VIII = $R_1=Glc$, $R_2=\beta-OH$, $R_3=R_4=H$

Ciclopassiflosídeo IX = $R_1=R_4=Glc$, $R_2=\beta-OH$, $R_3=H$

Ciclopassiflosídeo X = $R_1=Glc$, $R_2=\alpha-OH$, $R_3=R_4=H$

Ciclopassiflosídeo XI = $R_1=R_4=Glc$, $R_2=\alpha-OH$, $R_3=H$

Figura 7. Saponinas de *Passiflora edulis*.

2. OBJETIVO/JUSTIFICATIVA

Passiflora edulis Sims., espécie empregada na medicina popular e amplamente cultivada no território nacional, faz parte do elenco de passifloras incluída no projeto intitulado “Passifloras nativas e cultivadas do Brasil. Avaliação farmacognóstica, fitoquímica e farmacológica orientada para a valorização do uso popular e o desenvolvimento de medicamentos autóctones”. Nesse temático, os ensaios farmacológicos estão direcionados à avaliação de atividades no sistema nervoso central e no digestório. Esta dissertação ateve-se ao ensaio antiúlcera, método já padronizado no laboratório de Farmacognosia.

Assim, visando ampliar o conhecimento da passiflora mais cultivada no país e buscar uma nova abordagem terapêutica, esta dissertação tem como objetivo:

- Caracterizar macro e microscopicamente a droga vegetal constituída de folhas e de caules;
- Avaliar a atividade antiúlcera do extrato liofilizado preparado com os seus órgãos aéreos;
- Avaliar a atividade antioxidante (DPPH, ORAC) do extrato liofilizado;
- Caracterizar os principais grupos de substâncias;
- Determinar o perfil cromatográfico da fração flavonoídica;
- Quantificar o provável grupo de substâncias ativas - flavonóides

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As folhas e os caules de *P. edulis* Sims. foram coletados em reserva do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizada em Monte Alegre do Sul (22°40'55" sul, 46°40'51" oeste), no Estado de São Paulo, em janeiro de 2006. A identificação da espécie foi feita pelo pesquisador do referido Instituto, Dr. Luis Carlos Bernacci. Exsicata, preparada com o ramo florido, encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF), sob a designação JB 001.

Os órgãos aéreos fragmentados em peças de tamanho conveniente foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar a 40-45 °C, por 3 dias. A seguir, foram reduzidos a pó semifino (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959) em moinho de facas e martelos (Thomas®). Os órgãos aéreos desidratados foram pulverizados e tamisados. O pó foi submetido à percolação, segundo método descrito na Farmacopéia Brasileira (1959).

3.2. Estudo farmacobotânico

No estudo da morfologia da droga vegetal constituída de folhas, foram utilizadas amostras de sete unidades, de acordo com método descrito por DIBBERN *et al.* (1987). Os caracteres analisados foram aspecto geral, forma e tamanho do limbo/pecíolo; nervação e indumento. A terminologia empregada na descrição das formas foliares, tipos de indumento e padrões de venação seguiu a sugerida por HICKEY (1979). A caracterização macroscópica foi efetuada à vista desarmada e com auxílio de lupa estereoscópica (Wild Heerbrugg®). A caracterização anatômica das folhas foi realizada em cortes preparados com a droga vegetal reidratada e/ou material fixado em FAA 50 (formol, ácido acético, etanol 50%) e conservado em etanol 70% (v/v) (BERLYN, MIKSCHE, 1976). Os cortes transversais e os longitudinais radiais foram efetuados com micrótomo de deslize (Ernest Leitz®) e, os cortes paradérmicos das folhas, a mão livre, com o auxílio de lâmina de barbear. Os cortes das folhas foram efetuados no terço mediano inferior da lâmina foliar plenamente desenvolvida. Os cortes do pecíolo foram efetuados na porção proximal,

mediana e distal à lâmina foliar. O caule foi seccionado na estrutura primária e na secundária.

Inicialmente, os cortes histológicos foram diafanizados com solução de hipoclorito de sódio a 50% (v/v). Após lavagem com água destilada, foram tratados com corantes e reativos adequados para cada tipo de estrutura. Na obtenção das preparações semipermanentes, os cortes foram corados com soluções de azul de astra (Sigma-Aldrich®) e safranina (Sigma-Aldrich®) (BUKATSCH, 1972) e, montados entre lâmina e lamínula, em glicerina-água (1:1) (OLIVEIRA, AKISUE, 2000).

Foi realizada a dissociação do caule secundário. O material foi aquecido a 60 °C em uma solução contendo volumes iguais de peróxido de hidrogênio a 20% e ácido acético glacial (Synth®) (FRANKLIN, 1945). O material obtido foi corado com uma solução de safranina e azul de Astra (BUKATSCH, 1972).

Nos testes histoquímicos foram empregados: floroglucina clorídrica para elementos lignificados (SASS, 1951), Sudam III (Sigma-Aldrich®) para substâncias lipofílicas (FOSTER, 1949), cloreto férrico 2% para compostos fenólicos e lugol (Sigma-Aldrich®) para amiloplastos (JOHANSEN, 1940).

Os cortes foram observados com auxílio de microscópio de luz (Olympus®) e as fotos foram obtidas com auxílio de fotomicroscópio (Leica ® DMLZ), munido de câmera digital, acoplada a microcomputador. A captura das imagens foi obtida pelo programa Leica® IM50. As escalas foram obtidas nas mesmas condições.

3.3. Preparo do extrato liofilizado

O material vegetal pulverizado (5kg) foi submetido à percolação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959) com etanol a 60 °GL. A solução foi concentrada em evaporador rotativo (Büchi®) a 40-45 °C, sob pressão reduzida para a eliminação do etanol e, em seguida, a água residual foi liofilizada em aparelho de marca Edwards®. O liofilizado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado em dessecador.

3.4. Triagem fitoquímica

A droga vegetal e o extrato liofilizado foram submetidos à triagem fitoquímica dos principais grupos de substâncias encontradas no gênero: flavonóides, alcalóides e saponinas.

3.4.1. Flavonóides

3.4.1.2. Extração

Um grama de droga vegetal pulverizada foi extraído com 10 mL de metanol por 5 minutos sob refluxo a 60 °C (WAGNER, BLADT, 1996). Cinco mililitros do extrato metanólico filtrado foram concentrados até cerca de 2 mL. A seguir, foram adicionados 1 mL de água e 10 mL de acetato de etila. O conjunto foi submetido à agitação em funil de separação. A fração acetato de etila foi separada e seu volume reduzido a 1 mL em evaporador rotativo. Na cromatoplaça foram aplicados 10 µL do extrato. O extrato liofilizado foi submetido ao mesmo procedimento.

3.4.1.3. Sistema cromatográfico

O sistema empregado na análise cromatográfica comparativa em camada delgada da fração flavonoídica da droga vegetal e do extrato liofilizado constituiu-se de:

Adsorvente: Sílica 60 GF₂₅₄ em placa de vidro; 0,25 mm

Ativação: por aquecimento a 105 - 110 °C por uma hora;

Desenvolvimento: simples, ascendente de 10 cm;

Fase móvel: Acetato de etila–ácido fórmico–ácido acético glacial–água na proporção de 100:11:11:26 (WAGNER, BLADT, 1996);

Substância de referência: rutina 0,05% em metanol (European Pharmacopoeia, 2005); quantidade aplicada: 10 µL.

Visualização: a cromatoplaça foi nebulizada com a solução de difenilborato 2-aminoetila a 1% em metanol – NP (*Natural products reagent*) e observada sob lâmpada de UV a 254 e 365 nm (WAGNER, BLADT, 1996).

3.4.2. Alcalóides

3.4.2.1. Extração

A 1 g de droga vegetal pulverizada foram adicionados 1 mL de hidróxido de amônio a 10% e 10 mL de metanol e, submetidos a aquecimento por 30 minutos, sob refluxo. O extrato metanólico filtrado foi concentrado em evaporador rotativo até secura. O resíduo foi retomado em 1 mL de metanol; 10 µL foram aplicados na cromatoplaça (WAGNER, BLADT, 1996). O extrato liofilizado foi submetido ao mesmo procedimento.

3.4.2.2. Sistema cromatográfico

O sistema empregado na análise cromatográfica comparativa em camada delgada da fração alcaloídica da droga vegetal e do extrato liofilizado constituiu-se de:

Adsorvente: Sílica 60 GF₂₅₄ em placa de vidro; 0,25 mm

Ativação: por aquecimento a 105 - 110 °C por uma hora;

Desenvolvimento: simples, ascendente de 10 cm

Fase móvel: Clorofórmio-metanol, na proporção de 9:1 (FREITAS, 1985);

Substância de referência: harmana 0,01% em metanol; quantidade aplicada: 10 µL

Visualização: a cromatoplaça foi observada sob luz UV, a 365 nm

3.4.3. Saponinas

3.4.3.1. Extração

A droga vegetal pulverizada, exatamente pesada (2,5 g), foi extraída com 20 mL de água destilada, sob aquecimento até a fervura, por 2 minutos.

O extrato aquoso foi, em seguida, decantado e filtrado para um balão volumétrico de 50 mL.

Utilizando igual procedimento foram realizadas novas extrações com porções de 10 mL de água destilada. Os extratos aquosos foram filtrados para balão volumétrico. O volume foi completado para 50 mL com água destilada.

O extrato liofilizado obtido da droga vegetal também foi utilizado, após ressuspensão em água, nas mesmas proporções.

3.4.3.2. Índice de espuma

A presença ou a ausência de saponinas foi avaliada, de forma preliminar, pela agitação em água, dos extratos preparados anteriormente. A amostra que apresentou espuma persistente foi empregada na determinação do índice de espuma.

Foram numerados 10 tubos de ensaio de dimensões semelhantes. Cinco mililitros de água destilada foram colocados em todos os tubos, exceto no primeiro. Cinco mililitros dos extratos foram adicionados no primeiro e no segundo tubos e o conteúdo foi homogeneizado.

Cinco mililitros da solução do segundo tubo foram transferidos para o terceiro tubo, misturando-se bem. O processo foi repetido, em seqüência, até o décimo tubo, empregando-se a mesma pipeta volumétrica. Os 5 mL da solução do último tubo foram desprezados.

Em seguida, todos os tubos foram agitados vigorosamente, no sentido longitudinal, durante 15 segundos. O conjunto permaneceu em repouso durante 15 minutos e foi observado qual dos tubos apresentava uma camada de espuma persistente de 1 cm (WHO, 1998).

3.5. Teor de flavonóides

Na avaliação do teor flavonoídico da droga vegetal e do extrato de *P. edulis* foi empregado o método da Farmacopéia Européia (2005). Esse ensaio espectrofotométrico é empregado na quantificação dos flavonóides C-glicosilados de *P. incarnata* L., espécie anteriormente considerada uma variedade de *P. edulis*. O teor é calculado como vitexina. O método envolve a complexação dos flavonóides com o reagente oxalo-bórico.

3.5.1 Preparo de soluções

3.5.2. Solução A

Em um balão volumétrico de 100 mL, foi preparada uma solução contendo 10 mL de metanol em ácido acético glacial (Synth®).

3.5.3. Solução B

Em um balão volumétrico de 100 mL, foi preparada uma solução contendo 0,25 g de ácido bórico (Merck®) e 0,2 g de ácido oxálico (Synth®) em ácido fórmico (Synth®).

3.5.4. Solução mãe

Em um balão de fundo redondo, 0,200 g da droga vegetal pulverizada e 40 mL de etanol 60% (v/v) foram aquecidos em banho-maria a 50-55 °C, sob refluxo por 30 minutos. Essa solução inicial foi filtrada em algodão e reservada. A droga vegetal, acrescida do algodão com a parte residual da filtração, foi submetida à nova extração com cerca de 40 mL da solução etanólica, nas mesmas condições. Essas soluções etanólicas foram reunidas, resfriadas e filtradas por papel de filtro para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado para 100 mL com o mesmo solvente.

O extrato liofilizado, obtido da droga vegetal, foi utilizado após dissolução em etanol 60%, nas mesmas condições.

3.5.5. Solução teste

Cinco mL da solução mãe foram evaporados até a secura a cerca de 55 °C em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Ao resíduo dissolvido com 10 mL da solução A, foram adicionados 10 mL da solução B. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com ácido acético glacial.

3.5.6. Solução de compensação

Cinco mL da solução mãe foram evaporados até a secar a 55 °C em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Ao resíduo dissolvido com 10 mL da solução A, foram adicionados 10 mL de ácido fórmico. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com ácido acético glacial.

3.5.7. Leitura

A absorbância da solução teste foi medida após 30 minutos, por comparação com a solução de compensação, em 401nm. As leituras foram realizadas em triplicata e três leituras foram realizadas em períodos distintos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV-VIS Incibrás MF 200).

3.5.8. Cálculo

O teor percentual de flavonóides, expresso como vitexina, foi calculado através da seguinte expressão:

$$\text{Teor de flavonóides} = \frac{A \times 0,8}{m}$$

A = absorbância da solução teste em 401 nm;

m = massa da droga vegetal ou do extrato liofilizado, em gramas.

3.6. Extração e identificação de flavonóides

Para a análise do perfil flavonoídico do extrato liofilizado de *P. edulis* foram utilizadas técnicas de fracionamento através de cromatografia em coluna e em papel. A caracterização de alguns flavonóides foi feita por espectrofotometria de UV/visível e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982).

O extrato liofilizado de *P.edulis* (30g) foi colocado em uma coluna (4cm x 46cm) de polivinilpolipirrolidona (147g; PVPP- Sigma-Aldrich®), tendo como eluente, metanol (Carlo Erba®). A visualização das faixas (púrpuras e amarelas), foi feita empregando-se lâmpada ultravioleta de ondas longas. Foram coletadas 19 frações que foram concentradas em evaporador rotativo. As 19 frações foram purificadas através de cromatografia em papel (Whatman®) 3 MM, tendo como fase móvel, ácido acético 15%. Depois de desenvolvido, o cromatograma em papel foi visualizado sob luz UV, sendo que os cromatogramas que apresentaram mais de uma faixa púrpura e amarela, foram separados para prosseguir-se o estudo. As faixas dos cromatogramas foram classificadas com acréscimo crescente de um algarismo arábico. As subfrações selecionadas foram as seguintes e denominadas de: 4, 5.1, 5.2, 6.1, 6.2, 7.1, 7.2, 8.1, 8.2, 9.1, 9.2, 10.1,10.2,10.3, 11.1, 11.2, 12.1, 12.2., 13.1, 13.2., 14.1, 14.1, , 14.2, 14.3, 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 16.1,16.2, 17.1, 17.2, 17.3. Essas subfrações foram recortadas, eluídas com metanol, concentradas em banho-maria e submetidas à análise cromatográfica em placa de celulose microcristalina (Merck®) com espessura de 0,25mm. Como fase móvel utilizou-se ácido acético 15% (MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982). As subfrações (7.1, 8.1, 9.1, 11.2, 12.2, 13.2, 14.1, 14.2, 15.1, 15.2, 16.1, 17.1, 17.2.) que apresentaram apenas uma mancha, quando visualizadas sob luz UV, foram analisadas em espectrofotometria UV/visível.

A análise espectrofotométrica em UV/visível foi realizada no aparelho Shimadzu 1650 PC, utilizando o programa UV Probe 2.20, no comprimento de onda entre 240 e 600 nm. Foram obtidos espectros das amostras em solução metanólica e em solução metanólica contendo reagente ionizante (hidróxido de potássio – KOH 2,5%) e complexantes (cloreto de alumínio - AlCl_3 5%, cloreto de alumínio/ácido clorídrico- AlCl_3 5% + HCl 50%), indicativos de grupos substituintes no esqueleto fundamental dos flavonóides (MABRY *et al.*, 1970).

As frações que se apresentaram semelhantes na leitura de UV/visível foram agrupadas como segue: grupo I (7.1, 8.1, 9.1) grupo II (11.2, 12.2), grupo III (13.2, 14.1) grupo IV (14.2,15.1) grupo V (15.2) e grupo VI (16.1,17.1,17.2), onde foram escolhidas as frações que melhor representavam cada grupo para análise em CLAE, sendo estas as frações : 9.1, 12.2, 14.1,14.2, 15.2, 16.1.

As amostras foram dissolvidas em 1 mL de metanol (Grau HPLC) e filtradas. Injetaram-se 25 µL da amostra em cromatógrafo líquido (HP® 1090 Series II). A detecção dos picos foi feita através do sensor DAD (diode array detector), no comprimento de onda 352 nm (MOTTA, 2007).

O extrato liofilizado de *P. edulis* foi também analisado em CLAE, depois de purificado (FURLAN, 2004), de acordo com o procedimento descrito a seguir.

3.6.1. Purificação do extrato bruto

O extrato liofilizado de *P. edulis* (25 mg) foi dissolvido com 2 mL de metanol, sob aquecimento. Em seguida, 0,5 mL desse extrato metanólico foi transferido para um microtubo de centrifuga e concentrado até a secura em banho-maria (Quimis®). Ao resíduo foi adicionado 1mL de tolueno P.A. (Merck®), colocado em banho-maria a cerca de 67 °C por 5 minutos sob agitação, e centrifugado (Fanem®) a 10.000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e descartado, sendo o processo repetido por mais duas vezes. O resíduo do microtubo foi seco em banho-maria e, posteriormente, dissolvido em 1 mL de metanol, grau CLAE (Merck®), aquecido até cerca de 67 °C em banho-maria, e centrifugado. O sobrenadante foi separado e o processo foi repetido por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em banho-maria até secura. O resíduo foi empregado na análise cromatográfica.

3.6.2. Análise cromatográfica (CLAE)

Para a realização da análise cromatográfica em CLAE, o resíduo do extrato metanólico (4.6.1) foi dissolvido em 1 mL de metanol (Grau CLAE). O ensaio foi realizado nas mesmas condições para as frações separadas por PVPP.

3.6.2.1. Sistema cromatográfico

- Sistema de solventes: (A) ácido acético (grau CLAE Vetec®) 0,1%; (B). acetonitrila (grau CLAE Vetec®).
- Coluna Zorbax (4,6x 250 nm, 5 µm) RP 18.
- Gradiente: 0-5 min 12% de B; 5-8 min 12-20% de B; 8-28 min 20% de B ; 28-38 min 20-50% de B ; 38-48 min 50-65% de B ; 48-50 min 65-100% de B ; 50-55 min 100% de B ; 55-60 min 12% de B.
- Fluxos : 0-40 min 0,5 mL/min ; 40-55 min 1 mL/min ; 55-56 0,5 mL/min ; 56-60 0,5mL/min.

3.7. Bioensaios

3.7.1 Atividade antiúlcera

O ensaio farmacológico foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), conforme protocolo de número 144.

3.7.1.1. Animais

No ensaio foram utilizados ratos Wistar Hannover fêmeas pesando entre 150 e 180g, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em ciclo de claro e escuro de 12/12hs, temperatura controlada (20-25 °C), com ração e água *ad libitum*.

3.7.1.2. Ensaio

A avaliação da atividade antiúlcera do extrato liofilizado de *P. edulis* foi efetuada através do modelo de indução com ácido clorídrico e etanol (MIZUI E DOTEUCHI, 1983)

Doze horas antes do ensaio, os ratos foram mantidos em jejum, com livre acesso à água. Em seguida, foi administrado o extrato liofilizado nas concentrações de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg em solução aquosa em um volume de 10 mL/kg, por via oral. Trinta minutos depois foi administrado, por via oral, HCl 0,3M em etanol 60% como agente ulcerogênico, na dose de 10mL/kg. Após uma hora, os animais foram mortos em câmara de CO₂. Seus estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e fixados entre placas de vidro para a análise das ulcerações. Para o grupo controle foi administrado o mesmo volume de água (10 mL/kg). Como controle positivo, o lansoprazol Hexal[®] foi utilizado por via oral na dose de 30mg/kg. Cada grupo (controle positivo, negativo e tratado) foi constituído por 8 animais.

A avaliação das ulcerações foi realizada através da Área Total de Lesão e da Área Relativa de Lesão.

A área total de lesão (ATL) foi calculada somando-se as áreas de todas as úlceras e foram expressas em mm². A área relativa de lesão expressa em porcentagem, foi calculada através da seguinte expressão:

$$ARL = \frac{ATL \times 100}{AT}$$

ARL = área relativa de lesão

ATL = área total de lesão (mm²)

AT = área total do estômago (mm²)

Para a medida das áreas foi utilizado o programa Image Pró Plus. Para a análise estatística, as áreas relativas de lesão foram transformadas através da função arco seno.

3.7.1.3. Análise dos resultados

A significância estatística dos resultados foi determinada utilizando-se análise de variância seguida de teste de Tukey para dados paramétricos. Os dados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3.8. Atividade antioxidante

3.8.1. Ensaio com radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (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 (MENSOR *et al.*, 2001; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003).

3.8.1.2. Ensaio

Em microplaca (Sarstedt®) com poços de 200 μL , foram adicionados 142,86 μL de soluções etanólicas do extrato liofilizado de *P. edulis*, nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$. A essas foram adicionados 57,14 μL da solução 0,3 mM de DPPH (Sigma-Aldrich®) em etanol (Carlo Erba®). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas a 518 nm em Leitor de Placas (Multi-Detection microplate reader Synergy – BIOTEK®) utilizando-se etanol para calibração do aparelho (MENSOR *et al.*, 2001).

As soluções usadas como branco foram obtidas adicionando-se 57,14 μL de etanol a 142,86 μL da solução de extrato nas diferentes concentrações (50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$). A solução controle foi obtida através da adição de 57,14 μL da solução de DPPH 0,3mM a 142,86 μL de etanol (MENSOR *et al.*, 2001). O Trolox® (2-carboxi-2,5,7,8-tetrametil-6-cromanol) foi a substância referência utilizada no ensaio.

3.8.1.3. Cálculo

A atividade antioxidante (AA%) foi calculada para cinco concentrações do extrato liofilizado a partir de uma média de 3 leituras, realizadas em triplicata em horários distintos. O cálculo foi realizado em porcentagem relativa a controles aos quais não se adiciona o extrato.

A concentração média efetiva (CE₅₀) é definida como a concentração suficiente para obtenção de 50% de atividade de um efeito máximo estimado em 100%. Os valores da CE₅₀ foram obtidos por regressão linear e expressos como a média das leituras ± desvio padrão.

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

AA = Atividade antioxidante

Abs_{amostra} = Absorbância da amostra

Abs_{branco} = Absorbância do branco

Abs_{controle} = Absorbância do controle

3.8.2. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* - ensaio de ORAC

O método de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), baseia-se na inibição do decaimento da intensidade de fluorescência de uma amostra, quando na presença de uma substância antioxidante. Neste ensaio, a fluoresceína (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como agente fluorescente, onde a mesma é adicionada a amostras contendo diluições em diferentes concentrações do extrato liofilizado de *P. edulis* (30 µg/mL; 40 µg/mL; 50 µg/mL; 60 µg/mL; 70 µg/mL; 80 µg/mL) e ao Trolox® (2-carboxi-2,5,7,8-tetrametil-6-cromanol) (Sigma-Aldrich®). A essas soluções foi adicionada uma solução de AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dicloridrato] (Sigma-Aldrich®), gerador de radical livre que reage com a fluoresceína consumindo-a. Através da medida de intensidade de fluorescência obtêm-se a capacidade antioxidante da amostra (OU, HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

3.8.2.1. Ensaio

Em uma microplaca (Sarstedt®) foram colocados 25µL de amostra contendo o extrato liofilizado de *P. edulis* em diferentes concentrações (30 µg/mL; 40 µg/mL; 50 µg/mL, 60 µg/mL; 70 µg/mL; 80 µg/mL) e, em placas distintas a estas a substância de referência Trolox® (100 µmol/L; 50 µmol/L, 25 µmol/L; 12,5 µmol/L; 6,25 µmol/L), ambos diluídos em tampão fosfato (75mmol/L; pH 7,0) e 150 µL de fluoresceína (40 nmol/L no mesmo tampão). No controle positivo, a amostra foi substituída pelo tampão.

Após a incubação a 37 °C por 30 min., foram adicionados aos poços 25 µL de AAPH (153 mmol/L em tampão fosfato pH 7,0 75mmol/L), e a placa foi agitada no próprio aparelho (Multi - Detection microplate reader Synergy - BIOTEK®) em intensidade alta durante 10 segundos. As leituras foram efetuadas a cada minuto durante uma hora. O branco consistia de 200 µL de tampão fosfato 75mmol/L pH 7,0.

3.8.2.2. Cálculo

O valor final é calculado através da equação de regressão entre a concentração de Trolox® e a área sob a curva de decaimento de fluorescência (AUC- Area Under the Fluorescence Decay Curve). O resultado é expresso em micromols equivalentes de Trolox®/ g da amostra. A área sob a curva foi calculada conforme a equação.

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_n/f_0$$

AUC: Área under the fluorescence decay curve

f_0 : leitura de fluorescência inicial t= 0 minutos

f_n : leitura de fluorescência de cada amostra no t= n minutos

O valor relativo de ORAC foi calculado conforme a equação:

$$\text{ORAC} = \frac{(\text{AUC}_{\text{amostra}} - \text{AUC}_{\text{branco}})}{(\text{AUC}_{\text{trolox}^{\text{®}}} - \text{AUC}_{\text{branco}})} \times \frac{\text{molaridade Trolox}^{\text{®}}}{\text{concentração amostra}}$$

4. RESULTADOS

4.1. Estudo farmacobotânico

4.1.1. Descrição macroscópica

As folhas de *P. edulis* (figura 8-a) são simples, trilobadas ou com menor freqüência, inteiras ou bilobadas, de base cordada, ápice acuminado, margem serrilhada. Adicionalmente, nos bordos encontram-se glândulas oval-elípticas. As folhas apresentam as três nervações mais desenvolvidas partindo da região basal da lâmina. O tamanho da folha varia de 7 a 12 cm de comprimento por 11 a 13 cm de largura. A folha desidratada apresenta aspecto amarrotado, coloração acastanhada, consistência subcoriácea, superfície lisa e glabra. O pecíolo, de 2 a 3 cm de comprimento e cerca de 1 mm de diâmetro, mostra-se torcido próximo ao caule e provido de um par de nectários côncavos localizado próximo à base da lâmina foliar. O caule em estrutura secundária apresenta estrias finas dispostas longitudinalmente e, gavinhas são observadas na região de inserção das folhas (figura 8-b). Estípulas triangular-subuladas são evidentes.

4.1.2. Descrição microscópica

4.1.2.1. Lâmina foliar

Em vista frontal, a face adaxial recoberta por cutícula lisa, possui células epidérmicas de formato predominantemente poligonal e paredes espessadas (figura 9-a); os campos primários de pontuação são evidentes (figura 9-c). As células da face abaxial (figura 9-b) apresentam contorno ligeiramente sinuoso. A folha hipoestomática mostra estômatos ladeados por duas a quatro células, predominando os estômatos anomocíticos (Figura 9-b).

A secção transversal da lâmina foliar apresenta epiderme uniestratificada, de células tabulares, ligeiramente alongadas no sentido periclinal. O mesofilo dorsiventral (Figura 9-d) apresenta uma camada de células paliçádicas, ocupando aproximadamente 1/3 da espessura do mesofilo. Células coletoras são evidentes. O parênquima lacunoso é constituído de seis a sete camadas de células braciiformes.

Na nervura mediana biconvexa, observam-se tricomas tectores unicelulares (figura 9-f). O colênquima, predominantemente angular, mostra três a quatro

camadas de células, seguido do parênquima fundamental constituído de células arredondadas delimitando meatos. O sistema vascular na nervura mediana é representado por quatro feixes vasculares colaterais dispostos em círculo (figura 9–e). A região cambial é evidente. Drusas são encontradas no mesofilo, principalmente no parênquima lacunoso e na região floemática (figura 9–e).

A sequência de tecidos nas secções transversais das regiões proximal, mediana e distal do pecíolo apresentou-se semelhante. Às células epidérmicas, aproximadamente quadrangulares, seguem-se 3 a 6 camadas de células colenquimáticas com espessamento angular. O parênquima cortical é formado por cinco a seis camadas de células arredondadas delimitando meatos. O sistema vascular encontra-se disposto em dois conjuntos; o primeiro, formado por cinco ou seis feixes vasculares dispostos de forma aproximadamente circular e, o segundo grupo, por dois feixes menores, cada um localizado em um lobo do pecíolo (figuras 10-c, 10-d). Tricomas tectores unicelulares são encontrados com maior frequência entre os lobos do pecíolo (figura 10-b).

4.1.2.2. Caule

Na secção transversal do caule, em sua formação primária e secundária, foi observado o formato predominantemente pentagonal (figuras 11-a, 11-c). A epiderme mostra a forma aproximadamente quadrangular e tricomas tectores unicelulares. O colênquima é composto por cinco a sete camadas de células com espessamento angular. O parênquima cortical é formado por células arredondadas. Externo à região vascular encontra-se bainha amilífera conspícua e, externo a cada feixe vascular observa-se grupo de fibras. Os vasos xilemáticos estão dispostos em fileiras radiais notadamente nos feixes vasculares de maior porte, localizados nas arestas (figura 11-b, 11-d). O parênquima medular é bem desenvolvido com células de tamanhos variados. Com o aumento do diâmetro do caule evidencia-se a formação de fístula. Drusas são observadas na região cortical, medular e floemática (figura 11-a, 11-c).

Na secção longitudinal radial e no material dissociado do caule secundário, foram evidenciados cristais prismáticos na região xilemática (figuras 12-e, 12-f).

Figura 8. *Passiflora edulis* Sims. Folha: (a) folha trilobada com nectários extraflorais (Nc); (b) detalhe de caule com gavinha (Gv).

Figura 9. *Passiflora edulis* Sims. Lâmina foliar. Vista frontal (a-c). (a) Face adaxial. (b) Face abaxial. (c) Face adaxial destacando os campos primários de pontuação (CP). Secção transversal (d-f). (d) Detalhe do mesofilo e células coletoras (CC). (e) Drusas (Dr), na região floemática (FI). (f) Tricomas tectores (Tr) na nervura mediana. Es – Estômatos. Xi - Xilema.

Figura 10. *Passiflora edulis* Sims. Pecíolo. Secções transversais. (a) Região proximal, aspecto geral do pecíolo e disposição dos feixes vasculares (FV). (b) Região proximal, tricomas (Tr) unicelulares entre os lobos do pecíolo. (c) Região mediana do pecíolo. (d) Região distal do pecíolo.

Figura 11. *Passiflora edulis* Sims. Caule. Secções transversais. (a) aspecto geral do caule em estrutura primária. (b) Detalhe evidenciando a seqüência de tecidos do caule primário. (c) aspecto geral do caule em estrutura secundária. (d) Detalhe evidenciando a seqüência de tecidos do caule em estrutura secundária. (e) Tricoma unicelular encontrado no caule primário. (f) Tricoma unicelular encontrado no caule secundário. FP- Fibras perivasculares.

Figura 12. *Passiflora edulis* Sims. Caule secundário. Secções longitudinais radiais (a-b): (a) Cristais prismáticos (CP) na região xilemática e drusas na região floemática (Dr). (b) Cristal prismático (CP). (c-d) Secções transversais: (c) Substâncias fenólicas (SF). (d) Drusas (Dr) na região floemática. Material dissociado (e-g). (e) Detalhe dos cristais prismáticos (Cp). (f) Célula contendo cristais prismáticos e drusas. (g) Drusa sob luz polarizada.

4.2. Triagem fitoquímica

Os resultados obtidos na triagem fitoquímica da droga vegetal e do extrato liofilizado (rendimento = 6,27%; coloração verde-acastanhado) estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Principais grupos fitoquímicos avaliados na droga vegetal e no extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

Grupos fitoquímicos	Resultados	
	Droga vegetal	Extrato liofilizado
Flavonóides	Positivo	Positivo
Alcalóides	Negativo	Negativo
Saponinas	Positivo (IE= 40)	Negativo

IE = índice de espuma

4.3. Teor de flavonóides

O teor percentual de flavonóides expresso como vitexina foi de $1,21\% \pm 0,13$ para o extrato liofilizado e de $0,41\% \pm 0,007$ para a droga vegetal.

4.4. Extração e identificação de flavonóides

A tabela 2 apresenta os tempos de retenção (T_R) das amostras autênticas incluídos no banco de dados do equipamento (CLAE), que foram utilizados na avaliação dos sinais observados nos cromatogramas obtidos.

Tabela 2. Tempos de retenção (T_R) das amostras autênticas obtidas por CLAE.

Tempo de Retenção [Minutos]	Flavonóide
18,25	Isoorientina (6-C-glicosil-luteolina)
19,57	Orientina (8-C-glicosil-luteolina)
22,17	Rutina
22,48	7-O-glicosil-luteolina
22,98	6-C-glicosil-apigenina
23,16	Vitexina
23,26	6-C-glicosil-apigenina
29,46	7-O-diglicosil-apigenina
43,42	Luteolina
45,12	Apigenina
45,54	Crisoeriol

A análise por CLAE do extrato bruto encontra-se na figura 13. O resultado da análise preliminar das frações obtidas por separação em coluna de PVPP, e posteriormente purificadas por cromatografia em papel, e avaliadas por UV/visível e CLAE encontram-se nas figuras de 14 a 31. Essa análise evidencia a presença de flavonas nas frações denominadas 9.1, 12.2, 14.1, 14.2, 15.2 e 16.1.

Figura 13. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) do extrato bruto liofilizado de *Passiflora edulis* Sims em $\lambda = 352$ nm.

A figura 14 apresenta o cromatograma da fração 9.1., destacando em F₁, F₂, F₃ e F₄ os picos relacionados a flavonóides, devido aos espectros no ultravioleta obtidos (figura 15).

Figura 14. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 9.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims em $\lambda = 352$ nm. F₁, F₂, F₃ e F₄: picos identificados como flavonóides.

Os espectros UV de flavonas e de flavonóis apresentam 2 picos de absorção na região de 240-400 nm. Estes picos são denominados de banda I (300-380 nm) e de banda II (240-280 nm). A banda I é associada com a absorção do anel B (sistema cinamoila) e a banda II ao anel A (sistema benzoila). A posição da banda I, particularmente, permite relacionar o padrão de oxigenação do flavonóide. Geralmente, nas flavonas a banda I ocorre na faixa de 304-350 nm e, nos flavonóis em 352-385 nm (MABRY *et al.*, 1970).

Figura 15. Espectros UV/Vis dos picos F₁, F₂, F₃ e F₄ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 9.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A adição da solução de hidróxido de potássio à solução metanólica da fração em análise, promove a ionização das hidroxilas fenólicas, levando a deslocamentos batocrômicos. As flavonas e os flavonóis com hidroxilas vicinais, em presença de cloreto de alumínio formam complexos. Os que se formam entre o cloreto de alumínio e os *orto*-hidroxigrupos, nos anéis A e B, geralmente, decompõem-se em presença de ácido (MABRY *et al.*, 1970).

A figura 16 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl_3 e AlCl_3/HCl à solução metanólica da fração 9.1.

Figura 16. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 9.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (----), MeOH + AlCl_3 (—) e MeOH + AlCl_3 + HCl (----).

A figura 17 apresenta o cromatograma da fração 12.2, destacando em F1, F2 e F3 os picos relacionados a flavonóides, devido aos espectros no UV obtidos (figura 18).

Figura 17. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 12.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims em $\lambda = 352$ nm. F1, F2 e F3: picos identificados como flavonóides.

Figura 18. Espectros UV/Vis dos picos F₁, F₂ e F₃ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 12.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A figura 19 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl₃ e AlCl₃/HCl à solução metanólica da fração 12.2.

Figura 19. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 12.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (---), MeOH + AlCl₃ (—) e MeOH + AlCl₃ + HCl (----).

A figura 20 apresenta o cromatograma da fração 14.1, destacando em F1, F2 e F3 os picos relacionados a flavonóides, devido aos espectros no UV obtidos (figura 21).

Figura 20. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 14.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims em $\lambda = 352$ nm. . F1, F2 e F3: picos identificados como flavonóides.

Figura 21. Espectros UV/Vis dos picos F₁, F₂ e F₃ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 14.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A figura 22 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl_3 e AlCl_3/HCl à solução metanólica da fração 14.1.

Figura 22. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 14.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (----), MeOH + AlCl_3 (—) e MeOH + AlCl_3 + HCl (----).

A figura 23 apresenta o cromatograma da fração 14.2, destacando em F_1 , F_2 e F_3 os picos relacionados a flavonóides, devido aos espectros no UV obtidos (figura 24).

Figura 23. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 14.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims em $\lambda = 352$ nm. . F_1 , F_2 e F_3 : picos identificados como flavonóides.

Figura 24. Espectros UV/Vis dos picos F₁, F₂, F₃ e F₄ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 14.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A figura 25 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl₃ e AlCl₃/HCl à solução metanólica da fração 14.2.

Figura 25. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 14.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (----), MeOH + AlCl₃ (—) e MeOH + AlCl₃ + HCl (----).

A figura 26 apresenta o cromatograma da fração 15.2, destacando em F₁ o pico relacionado a flavonóide, devido ao espectro no UV obtido (figura 25).

Figura 26. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 15.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em $\lambda = 352$ nm. F₁: pico identificado como flavonóide.

Figura 27. Espectros UV/Vis dos picos F1 assinalado no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 15.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A figura 28 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl₃ e AlCl₃/HCl à solução metanólica da fração 15.2.

Figura 28. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 15.2 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (----), MeOH + AlCl₃ (—) e MeOH + AlCl₃ + HCl (----).

A figura 29 apresenta o cromatograma da fração 16.1, destacando em F₁ e F₂ os picos relacionados a flavonóides, devido aos espectros no UV obtidos (figura 30).

Figura 29. Perfil cromatográfico (CLAE-UV/DAD) da fração 16.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em $\lambda = 352$ nm. F₁ e F₂: picos identificados como flavonóides.

Figura 30. Espectros UV/Vis dos picos F₁ e F₂ assinalados no cromatograma (CLAE-UV/DAD) da fração 16.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims.

A figura 31 mostra o resultado da adição das soluções de KOH, AlCl₃ e AlCl₃/HCl à solução metanólica da fração 16.1.

Figura 31. Espectros de absorção de UV/Visível entre 240-600nm da fração 16.1 do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. em: MeOH (—), MeOH + KOH (----), MeOH + AlCl₃ (—) e MeOH + AlCl₃ + HCl (----).

4.5. Atividade antiúlcera

Os resultados do ensaio antiúlcera do extrato liofilizado de *P. edulis*, induzido por etanol acidificado estão representados nas figuras 32 a 36.

Figura 32. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais controle, tratados com água (10mL/kg), por via oral, no modelo de indução por etanol acidificado. As áreas escuras representam as lesões ulcerativas. n= 8.

Figura 33. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais controle, tratados com lansoprazol na dose de 30mg/kg por via oral, no modelo de indução por etanol acidificado. As áreas escuras representam as lesões ulcerativas. n= 8.

Figura 34. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. na dose de 100mg/kg por via oral no modelo de indução por etanol acidificado. As áreas escuras representam as lesões ulcerativas. n= 8.

Figura 35. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. na dose de 200mg/kg por via oral no modelo de indução por etanol acidificado. As áreas escuras representam as lesões ulcerativas. n= 8.

Figura 36. Ensaio antiúlcera agudo. Imagens dos estômagos dos animais tratados com o extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. na dose de 400mg/kg por via oral pelo modelo de indução por etanol acidificado. As áreas escuras representam as lesões ulcerativas. n= 8

O resultado da avaliação da atividade antiúlcera gástrica do extrato liofilizado de *P. edulis* encontra-se representado nas figuras 37 e 38.

Figura 37. Representação gráfica da Área total de lesão no ensaio antiúlcera agudo no modelo de indução por etanol acidificado, após a administração de água 10mL/kg por via oral, lansoprazol (30mg/Kg), extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. (100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg). Os valores estão expressos como a média $\pm$ erro padrão. n=8. (a) comparação em relação ao controle, (b) comparação em relação ao lansoprazol, ** p<0,01.

Figura 38. Representação gráfica da Área relativa de lesão no ensaio antiúlcera agudo no modelo de indução por etanol acidificado, após a administração de água (10mL/kg), por via oral, lansoprazol (30mg/Kg) e extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. (100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg). Os valores estão expressos como a média $\pm$ erro padrão. n=8. (a) comparação em relação ao controle, (b) comparação em relação ao 100mg/kg (c) comparação em relação ao lansoprazol, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$.

A tabela 3 apresenta a média da área total de lesão e área relativa de lesão e seus respectivos erros-padrão, no ensaio antiúlcera agudo.

Tabela 3 – Médias das áreas totais de lesão, área relativa de lesão em estômagos de ratos, após administração do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, lansoprazol (30mg/kg) e água (10mL/kg).

Doses administradas	Área Total de Lesão mm ²	Área Relativa de Lesão (%) x10 ⁻¹
100 mg/kg	219,86 ± 43,21	2,45±0,48
200mg/kg	160,08±40,95	1,46±0,26
400mg/kg	116,12±23,90	0,87±0,23
Lansoprazol 30mg/kg	43,75±9,14	0,36±0,09
Controle (água 10mL/kg)	218,98±36,29	1,86±0,34

4.6. Atividade antioxidante

4.6.1. Ensaio com radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A figura 39 relacionando a atividade antioxidante (%) e a concentração do extrato de *P. edulis*, evidenciou coeficiente de linearidade de 0,991.

Figura 39. Gráfico de atividade antioxidante (%) x Concentração µg/mL do extrato liofilizado de *Passiflora edulis* Sims. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão das leituras. Cada leitura foi realizada em triplicata.

A figura 40 relacionando a atividade antioxidante (%) e a concentração do Trolox®, evidenciou coeficiente de linearidade de 0,991.

Figura 40. Gráfico de atividade antioxidante (%) x Concentração µg/mL da substância de referência - Trolox. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão das leituras. Cada leitura foi realizada em triplicata.

Assim, no ensaio de atividade antioxidante empregando DPPH, o extrato liofilizado apresentou CE_{50} de $160,33 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ e o controle positivo, Trolox® CE_{50} de $5,216 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$.

4.6.2. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*. Ensaio de ORAC

A relação entre o decaimento da fluorescência e a concentração de antioxidante é dada pela figura 41. O extrato liofilizado de *P. edulis* apresentou atividade antioxidante de $775,35 \pm 36,12 \mu\text{mol eq Trolox/g}$ de extrato (Trolox = $4000 \mu\text{mol/g}$).

Figura 41. Gráfico da diferença de área sob a curva (net AUC) de decaimento de fluorescência em relação à concentração da amostra (*Passiflora edulis*).

5. DISCUSSÃO

5.1. Morfoanatomia de folhas e de caules de *P. edulis*

A identificação exata e a qualidade de matérias-primas vegetais que compõem a formulação de medicamentos fitoterápicos, cosméticos e chás são imprescindíveis para assegurar a eficácia e a segurança aos seus consumidores. Diversos são os exemplos de matérias primas adulteradas com produtos de menor valor ou substituídas por espécies morfoanatomicamente semelhantes ou não (ZHANG *et al.*, 2007, BRUNETON, 1999, GATTUSO *et al.*, 1996, TREASE, EVANS, 1996), e ainda assim, usadas na elaboração de produtos terapêuticos. Devem ser considerados ainda fatores adicionais de contaminação, como a microbiana, por agrotóxicos, metais pesados e radioativos (WHO, 1998).

Pittler e Ernst (2003) alertam para casos de hepatotoxicidade, algumas vezes fatal, observada após o consumo de produtos de origem vegetal. A toxicidade pode ser associada à identificação equivocada da matéria-prima, contaminação e adulteração, entre outros.

Os nomes comuns ou populares, como são conhecidos, podem também contribuir na confusão entre espécies vegetais, usando uma em lugar de outra (WU *et al.*, 2004). Por exemplo, no país, a designação popular ‘maracujá’ inclui diversas espécies do gênero *Passiflora*, embora a Farmacopéia Brasileira tenha preconizado para uso nas suas três primeiras edições, apenas as folhas de *P. alata* sob esta designação. Já algumas Farmacopéias estrangeiras, como a européia e a francesa oficializaram os órgãos aéreos de *P. incarnata* (‘passionflower’).

Considerando que o Brasil é o maior produtor mundial de *P. edulis* (ITI Tropicals, 2008) e a crença da população que o maracujá apresenta propriedade calmante, não é surpresa encontrar esta espécie entre as plantas empregadas como adulterantes da droga vegetal oficial, *P. alata* (MORAES, VILEGAS, LANÇAS, 1997).

Assim sendo, Pereira e colaboradores (2004), analisando 11 fitoterápicos adquiridos em farmácias brasileiras constataram que *P. edulis* foi o principal adulterante da espécie oficial.

Além desse fato, considerando-se que a eficácia de um tratamento com produtos fitoterápicos depende também do uso dos derivados das drogas vegetais, como os seus extratos e tinturas, é de extrema importância a identificação correta das drogas vegetais utilizadas na elaboração destes medicamentos. O conhecimento pormenorizado de sua composição química pode permitir estudar e iniciar pesquisas no sentido de utilizar alternativamente espécies vegetais mais próximas quanto à fitoquímica. Exemplo marcante disto é o uso de algumas plantas sob a designação de 'jaborandi' (*Pilocarpus jaborandi* Holmes, *Pilocarpus microphyllus* Staf e *Pilocarpus pennatifolius* Lem.) e de 'sene' (*Cassia acutifolia* Delile, *Cassia angustifolia* Vahl.) pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1959).

Com esse propósito pode-se notar que o extrato, preparado por nosso grupo com as folhas e com os caules de *P. edulis*, provenientes do mesmo local e período de coleta, apresentou atividade no sistema nervoso central (DUARTE *et al.*, 2006), confirmando a ação verificada por outros autores que avaliaram extratos de suas folhas (VALE, LEITE, 1983; PETRY *et al.*, 2001; REGINATTO *et al.*, 2006; COLETA *et al.*, 2006). Considerando esses fatos, abre-se a perspectiva de que *P. edulis* possa ser incluída na Farmacopéia Brasileira. E neste sentido a descrição morfoanatômica apresentada na presente dissertação pode oferecer importante contribuição para elaboração da monografia da droga vegetal constituída de seus órgãos aéreos.

Por outro lado, é sabido que os órgãos vegetais, expostos a fatores ambientais, podem sofrer modificações morfológicas e anatômicas. Estas alterações têm sido interpretadas como adaptações ao ambiente em que se desenvolvem (KLICH, 2000, JURIK, CHABOT, 1982).

As folhas de *P. edulis* obtidas em campo experimental do IAC, apresentaram características comuns a espécies de *Passiflora*, como folhas inteiras ou lobadas, estípulas, nectários peciolares, gavinhas axilares, feixes vasculares colaterais e cristais de oxalato de cálcio (METCALFE, CHALK, 1950; BERNACCI, 2003).

Entretanto, no presente estudo foi encontrado grande número de cristais prismáticos no caule, fato não mencionado anteriormente por Freitas (1985) e Mezo (2005), mas relatado para espécies de *Passiflora* (METCALFE, CHALK, 1950) e por Wasicky (2007) em caules de *P. alata*.

Embora, a literatura (KILLIP, 1938; DEGINANI, 2001; BERNACCI, 2003) descreva variabilidade morfológica nos órgãos vegetativos e florais das passifloras, as drogas vegetais preparadas com as folhas inteiras e com os caules pouco fragmentados de *P. edulis* e de *P. alata*, apresentam caracteres diferenciais evidentes. As folhas de *P. edulis* são geralmente trilobadas, providas de margens serrilhadas, glândulas nos bordos das margens e dois nectários extraflorais côncavos no pecíolo, próximos à base do limbo. Por sua vez, as folhas de *P. alata* são inteiras, de margens inteiras ou raramente denticuladas e com um a dois pares de nectários extraflorais estipado-crateriformes no pecíolo, sem ocorrência de glândulas nos bordos das margens (BERNACCI, 2003).

Embora Deginani (2001) descreva as folhas de *P. edulis* com margem crenada, foi observada margem serrilhada nas amostras coletadas no IAC, dado em acordo com o apresentado por Freitas (1985).

A Farmacopéia Brasileira (1977), descreve as células epidérmicas de *P. alata*, em vista frontal, com paredes levemente onduladas na face adaxial e sinuosas na face abaxial. Em *P. edulis* foi observada apenas com uma leve sinuosidade na face abaxial. Da mesma forma, pode ser realizada a comparação em relação à nervura mediana em corte transversal de *P. alata* e *P. edulis*. A Farmacopéia Brasileira (1977) descreve *P. alata* com nervura mediana biconvexa de evidente aspecto agudo na face abaxial e, ausência de tricomas. *P. edulis* apresentou a nervura mediana biconvexa, de forma arredondada na face abaxial e tricomas tectores unicelulares dispostos principalmente na nervura.

Dentre as características mais marcantes de diferenciação do caule de *P. alata* e *P. edulis*, encontram-se o formato e o aspecto da superfície externa. A primeira possui forma alado-quadrangular com um a quatro grupos de fibras em cada ala e epiderme glabra (Freitas, 1985). No caule de *P. edulis* observou-se formato pentagonal e a presença de tricomas tectores unicelulares.

Passiflora incarnata possui como um de seus sinônimos, *Passiflora edulis* var. *kerii* (Spreng.). Este fato pode promover confusão em sua identificação. Bruneton (2001), ao escrever sobre a fitoquímica de plantas medicinais, menciona que as folhas e os caules de *P. edulis* são utilizadas como adulterante de *P. incarnata*.

A Farmacopéia Européia (2005) descreve as folhas de *P. incarnata* como pubescentes, com margens denteadas, com células epidérmicas sinuosas, tricomas tectores formados por 1 a 3 células, sendo os mesmos retos, algumas vezes levemente curvados, ou em forma de gancho. *P. edulis* apresentou folhas providas de tricomas tectores unicelulares curtos e retos quase exclusivamente nas nervuras medianas, as margens serrilhadas e células epidérmicas de paredes ligeiramente sinuosas na face adaxial.

5.2. Perfil fitoquímico do extrato de *P. edulis*

O perfil cromatográfico (CLAE) do extrato bruto (figura 13) apresentou composição complexa com vários picos, sendo selecionados nessa dissertação as frações referentes aos tempos de retenção entre 15-42 min. Os espectros UV/visível dessas frações evidenciaram dois picos de absorção entre 240 e 400nm.

O perfil flavonoídico da fração 9.1 obtido por CLAE (figura 14), apresenta em F₁, F₂, F₃ e F₄ C-glicosídeos, sendo que F₁ (T_R=17,9 min.) e F₂ (T_R=18,7 min.) podem ser identificados como possíveis derivados glicosilados de luteolina ou crisoeriol, como pode ser evidenciado pelos seus espectros UV (figura 15). Entretanto, F₂ poderia ser atribuído a isoorientina, pois o seu tempo de retenção está muito próximo ao da amostra autêntica (tabela 2). Em F₃ (T_R= 29,0 min.) encontra-se um possível diglicosídeo de apigenina, pois o tempo de retenção aproxima-se ao da 7-O-diglicosil apigenina (tabela 2). O espectro apresentado para F₄ (T_R= 41,0 min.) denota a presença de apenas um oxigênio no anel B. Pelo seu tempo de retenção esse flavonóide é uma aglicona. Entretanto, existem dúvidas de que seja a apigenina, pois uma amostra autêntica de apigenina teve um tempo de retenção de 45 minutos, enquanto a nossa amostra saiu em 41 minutos. Um espectro semelhante a este foi obtido quando a amostra foi analisada através de espectrofotômetro UV/visível com adição das soluções de KOH, AlCl₃, AlCl₃/ HCl (figura 16).

Na fração 12.2 foram encontrados também C-glicosídeos, como F₁ (T_R= 16,2 min.) e F₂ (T_R= 17,5 min.) (figura 17). Esses picos podem ser atribuídos a possíveis

derivados glicosilados de apigenina como pode-se notar pelos espectros apresentados nas figuras 18 e 19. F_3 (T_R = 23,8 min.) pode ser atribuído à vitexina (tabela 2), pois o tempo de retenção de uma amostra autêntica deste flavonóide é de 23,2 min.

No cromatograma da fração 14.1 (figura 20), os flavonóides encontrados podem ser C-glicosídeos como O-glicosídeos. F_1 pode ser atribuído a 7-O-glicosil luteolina, uma vez que seu espectro (figura 21) e o tempo de retenção (tabela 2) são muito semelhantes àqueles de uma amostra autêntica. F_2 (T_R = 41,1 min.), aparentemente é o mesmo composto F_4 da fração 9.1. Os espectros de absorção da fração 14.1 (figura 22) denotam duas hidroxilas no anel B, devido à predominância de O-glicosil luteolina na amostra.

No cromatograma da fração 14.2 (figura 23), as substâncias com tempos de retenção 16,2 min.; 16,7 min.; 17,5 min., foram designadas como F_1 e a com tempo de retenção 18,3 min. designada como F_2 . Essas substâncias podem ser derivadas de apigenina, como demonstra seus espectros de absorção (figura 24). F_3 , pelo seu tempo de retenção (T_R = 23,9 min.) assemelha-se à apigenina C-glicosilada (tabela 2). Os espectros de absorção da fração 14.2 mostram a existência de apenas um oxigênio no anel B, podendo, portanto, os flavonóides desta fração serem todos derivados de apigenina (figura 25).

O cromatograma da fração 15.2 (figura 26) mostra dois blocos de flavonóides. O primeiro, onde se encontra F_1 (o único pico que se pode identificar pelo banco de dados) é glicosilado. O segundo bloco (em muito menor quantidade) pode ser constituído de agliconas. F_1 (T_R = 18,3 min.) pode ser identificado possivelmente como isoorientina (6-C-glicosil luteolina), pois o tempo de retenção assemelha-se a amostra autêntica deste flavonóide (Tabela 2). Os espectros de absorção da fração 15.2 no UV/visível (figura 28) mostram a presença de duas hidroxilas no anel B. Dessa maneira, pode-se sugerir que os flavonóides pertencentes ao primeiro bloco podem ser na sua maior parte, derivados de luteolina.

No cromatograma da fração 16.1, F_1 (T_R = 15,5 min.) e F_2 (T_R = 39,3 min.) (figura 29) correspondem aos flavonóides mais abundantes. Seus espectros de absorção (figura 30) poderiam ser derivados da luteolina ou do crisoeriol. Entretanto, os espectros obtidos através de espectrofotômetro UV/visível (figura 31) mostram

que existem duas hidroxilas no anel B. Assim, F₁ pode ser um derivado glicosilado de luteolina, enquanto F₂ pode corresponder a uma aglicona com duas hidroxilas.

A triagem da fração flavonoídica apresentada na dissertação encontra suporte nos resultados de Ferreres e colaboradores (2007). Estes autores analisando o extrato de folhas de *P. edulis* por CLAE e espectrometria de massas evidenciaram derivados glicosilados de apigenina e de luteolina.

Para a identificação dos componentes das subfrações analisadas por CLAE UV/DAD e UV são necessárias análises espectrométricas (RMN ¹H, de ¹³C e de massas) adicionais que estão sendo realizadas.

5.3. Atividade antiúlcera

As úlceras pépticas são distúrbios nos quais o ácido gástrico e a pepsina constituem fatores patogênicos necessários para sua formação, porém habitualmente não são suficientes. Embora cáusticos quando no estômago, normalmente não provocam lesão nem sintomas, devido à existência de mecanismos de defesa intrínsecos de proteção da mucosa gástrica. Isto ocorre pela formação de muco e pelo bicarbonato. Esses mecanismos de proteção são promovidos pela formação local de prostaglandinas. O agente infeccioso *Helicobacter pylori*, também está envolvido na gênese de úlceras pépticas (GOODMAN *et al.*, 2007).

Dentre os fármacos utilizados para inibir ou neutralizar a secreção de ácido gástrico encontram-se os antagonistas dos receptores H₂ de histamina. Esses agentes inibem a secreção do ácido estimulada pela histamina, gastrina e acetilcolina e da pepsina. São representados por fármacos como a cimetidina, ranitidina, nizatidina e famotidina (RANG *et al.*, 2003).

Outro grupo de fármacos são os inibidores da bomba de prótons, cuja principal ação resume-se na inibição irreversível da H⁺/K⁺-ATPase (a bomba de prótons), que constitui a etapa terminal na via de secreção ácida, sendo estes fármacos representados pelo omeprazol, lansoprasol, pantoprazol e rabeprazol (RANG *et al.*, 2003).

Os antiácidos também são empregados como agentes antiulcerogênicos, neste caso atuam ao neutralizar o ácido gástrico, ocorrendo como consequência a elevação do pH gástrico, cuja atividade péptica é inibida em pH 5. Estes fármacos são representados pelo hidróxido de magnésio, trissilicato de magnésio, gel de hidróxido de alumínio, bicarbonato de sódio e alginatos (RANG *et al.*, 2003).

Outra classe importante são os fármacos responsáveis pela proteção da mucosa gástrica. Dentre estes, encontram-se agentes que atuam potencializando a proteção gástrica e/ou proporcionando uma barreira física sobre a úlcera, sendo representados pelo quelato de bismuto, sulcrafato, carbenosolona e misoprostol (RANG *et al.*, 2003).

Schmeda-Hirschmann e Yesilada (2005) compilando diversos estudos de extratos vegetais com ação antiúlcera verificaram o uso de concentrações variando de 25 até 800mg/kg. Porém, sugeriram o estudo de dose-resposta com doses entre 100 e 300 mg/kg.

Assim, no ensaio antiúlcera utilizando o extrato liofilizado de *P. edulis*, foram empregadas doses de 100 mg/kg, 300 mg/kg e 400 mg/kg. Embora não se observe diferença significativa entre o controle e as três doses de extrato, houve uma relação dose resposta. Portanto, sugere-se que neste caso devem ser utilizadas doses maiores para avaliar o efeito antiúlcera.

Embora o extrato não se mostre um promissor agente gastroprotetor neste modelo, o efeito observado pode estar relacionado à presença de flavonóides, saponinas, ou à ação antioxidante mostrada pelo extrato.

Os flavonóides possuem ação farmacológica, principalmente como antiinflamatório e possuem ação antiúlcera gástrica contra uma variedade de agentes ulcerogênicos (GRACIOSO, 2002).

O efeito gastroprotetor pode estar associado a diferentes mecanismos (SCHMEDA-HIRSCHMANN, YESILADA; 2005). Dentre os mecanismos propostos para explicar a ação antiúlcera dos flavonóides estão relacionados o aumento da produção de prostaglandinas e a redução da secreção de histamina, além de serem conhecidos como seqüestradores de radicais livres. Estes radicais apresentam papel importante na indução de lesões ulcerativas do sistema digestório (BORRELLI,

IZZU, 2000). Assim, a presença de compostos antioxidantes, poderia auxiliar a explicar, pelo menos em parte, a atividade antiúlcera do extrato.

O extrato liofilizado de *P. edulis* apresentou teor de flavonóides em 1,21%, e a atividade antioxidante pelo método com DPPH, resultou na concentração efetiva (CE₅₀) de 160,33 µg/mL. Esta concentração efetiva foi aproximadamente 30 vezes maior que a da substância de referência Trolox®. Em estudo similar utilizando a metodologia com DPPH, Ferreres e colaboradores (2007) utilizando folhas de *P. edulis* encontraram também atividade antioxidante.

Mensor e colaboradores (2001) compararam a atividade antioxidante (DPPH) de extratos vegetais de 16 espécies pertencentes a 5 famílias; os valores de concentração efetiva (CE₅₀) variaram entre 11,56 µg/mL e 184 µg/mL. Nosso resultado, obtido em condições semelhantes, evidencia que o extrato de *P. edulis*, embora apresente ação antioxidante, a mesma não se mostrou tão efetiva comparada a estas espécies.

Pelo método de ORAC, o extrato liofilizado de *P. edulis* apresentou atividade antioxidante (775,35 ± 36,12 µmol eq Trolox/g de extrato). A comparação entre os dois métodos (DPPH e ORAC) demonstra que ambos possuem forte correlação qualitativa, embora os mesmos envolvam mecanismos diferentes para promover a reação entre os antioxidantes presentes na amostra e o radical livre utilizado. No método do ORAC ocorre a transferência de átomo de hidrogênio e no método do DPPH envolve a transferência de elétrons (HUANG, OU, PRIOR; 2005).

Outro grupo de substâncias de origem vegetal a que se pode relacionar a atividade antiúlcera é o das saponinas. A correlação entre saponinas e a ação gastroprotetora foi observada por Yoshikawa e colaboradores (2005), utilizando frações obtidas de sementes de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. As lesões produzidas na mucosa gástrica de ratos foram promovidas pela administração de etanol e indometacina. A proteção da mucosa gástrica observada com o extrato foi mais efetiva que a substância de referência, o omeprazol.

Em *P. edulis* já foram isoladas algumas saponinas, como a passiflorina (BOMBARDELLI *et al.*, 1975) e ciclopassiflosídeos I–VI (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^a) e ciclopassiflosídeos VII–XI (YOSHIKAWA *et al.*, 2000^b).

Na avaliação da presença de saponinas na droga vegetal e no extrato liofilizado, esse grupo de substâncias foi detectado apenas na droga vegetal (IE=40). O ensaio da avaliação de formação de espuma persistente é simples, mas pode levar a resultados falso negativos devido à presença de substâncias interferentes.

6. CONCLUSÕES

Embora *P. alata* seja a única espécie indexada na Farmacopéia Brasileira e denominada oficialmente de maracujá, diversas plantas do gênero são indistintamente conhecidas por esta denominação. Assim, a observação minuciosa de detalhes morfoanatômicos apresentados para *P. edulis* contribuem para sua morfodiagnose e principalmente para a sua distinção das passifloras oficiais - *P. alata* e *P. incarnata*.

Na avaliação da atividade antiúlcera agudo, embora o ensaio não tenha apresentado resultado promissor para a produção de um medicamento fitoterápico com esta ação, evidenciou-se preliminarmente a falta de correlação entre o uso popular como gastroprotetor e a base científica. Modelos adicionais devem ser analisados.

Ao empregar os métodos de DPPH e ORAC para a avaliação da atividade antioxidante, o extrato liofilizado apresentou atividade em ambos os métodos.

Na triagem fitoquímica do extrato liofilizado foi evidenciada a presença de flavonóides, cujo teor foi determinado em 1,21%. Seu perfil cromatográfico (CLAE/UV/DAD) e espectrofotométrico (UV/visível) evidenciou principalmente a presença de derivados de luteolina e de apigenina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.; KHA, I.A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants. I. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, p.100-106, 2003.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993. 341p.

AOYAGI, N.; KIMURA, R.; MURATA, T. Studies on dry extract. Isolation of maltol and pharmacological action of maltol and ethyl maltol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.22, p.1008-1013, 1974.

BACK EGG, A. **Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Peru**. Cuzco: PNUD, 1999. p.368-374.

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

BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326p.

BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPARD, G.J.; GUILIETTI, A.M.; MELHEM, T.S., coords. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, FAPESP, 2003. v.3, p.247-257.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, T.; HALL, T.; RIGGINS, C.W.; RISTER, R.S., eds. **The complete German Commission E monographs**: therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council. 1998. 685p.

BOMBARDELLI, E.; BONATI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E.; MUSTICH, G. Passiflorine: a new glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v.14, p.2661-2665, 1975.

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

BORELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* in rats. **Phytotherapy Research**, v.10., p.S104-106, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS**: atitude de ampliação de acesso. Brasília: Ministério da Saúde, PNPI-C-SUS, 2006. 92p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Contribution à l'étude pharmacognostique de la Passiflore. **Journal of Pharmacie de Belgique**, v.39, p.15-22, 1984.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Stationary Office, 2005. v.2, p.1517.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2.ed. Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, 1999. 1119p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, phytochimie, Plantes medicinales**. 3.ed. Zaragoza: Lavoisier; Secaucus: Acribia, 2001. p. 329.

BRUSCHI, M.L.; CARDOSO, M.L.C.; MILANI, H. Avaliação farmacológica de um extrato de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.23, n.2, p.263-276, 2002.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Volatile constituents of the essential oil of *Passiflora incarnata*. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, p.329-334, 1992.

BUKATSCH, F. Bermerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.30, n.1, p.55-73, 1990.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamento. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

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

CARVALHO, J.C.T., org. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004. p.29-41.

CHIMICHI, S.; MERCATI, V.; MONETI, G.; RAFAELLI, A.; TOJA, E. Isolation and characterization of an unknown flavonoid in dry extracts from *Passiflora incarnata*. **Natural Product Letters**, v.11, p.225-232, 1998.

CHRISTENSEN, J.; JAROSZEWSKI, J.W. Natural glycosides containing allopyranose from the passion fruit and circular dichroism of benzaldehyde cyanohydrin glycosides. **Organic Letters**, v.3, n.14, p.2193-2195, 2001.

COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, D.; LIMA, T.C.M.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v.20, n.12, p.1067-1073, 2006.

DEGENER, O. Família 250: *Passiflora edulis*. In: _____. **Flora Hawaiiensis**: or the new illustrated flora of the Hawaiian islands. Honolulu, 1932.

DEGINANI, N.B. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana**, v.39, n.1/2, p.43-129, 2001.

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

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v.72, n.6, p.698-702, 2001.

DIBBERN, M.; KELMANSKY, D.; ROMERO, E. Minimal sample for foliar morphology: empirical method and its application in Myrtaceae. **Phytomorphology**, v.37, n.1, p.87-93, 1987.

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

DUARTE, F.S.; CARVALHO, R.S.M.; LACH, G.; CALIXTO, A.V.; FOPPA, A.A.; PILATTI, F.K.; NUNES, I.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. *et al.* Avaliação neuropsicofarmacológica de extratos de passifloras nativas e cultivadas (maracujá) em camundongos. **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006.

ENDO, E.; BORGES, S.V.; DAIUTO, E.R.; CEREDA, M.P.; AMORIM, E. Shelf life evaluation of dehydrated passion fruit juice (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.382-386, 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005. v.2, p.2192-2193. (European treaty series, n.50).

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organizações Andrei, 1977. pt.2, p.839-840.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.561.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1929. p.574-575.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10187-10193, 2007.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. 2.ed. Princeton, New York: Van Nostrand, 1949. 228p.

FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites and a new macerating method for wood. **Nature**, v.55, p.51, 1945.

FREITAS, P.C.D. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero Passiflora 1**. São Paulo, 1985. 133p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

FURLAN, C.M. **Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de Tibouchina pulchra (Cham.) Cogn. e Psidium guajava L.** São Paulo, 2004. 117p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

GATTUSO, S.; DI SAPIO, O.; CARGO, J.M.C.; GATTUSO, M. *Passiflora caerulea* and its adulterator *Cucurbitella asperata*. **Fitoterapia**, v.67, n.6, p.535-544, 1996.

GIAVINA-BIANCHI, P.F.; CASTRO, F.F.; MACHADO, M.L.; DUARTE, A.J. Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 79, p. 449-454, 1997.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.; TORRES, O.J.; VASCONCELOS, P.R.; MOREIRA, A.T.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES Jr., H.; FERRER, A.L. *Passiflora edulis* extract and the healing of abdominal wall of rats: morphological and tensiometric study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.9-16, 2006.

GONÇALVES FILHO, A.; TORRES, O.J.; CAMPOS, A.C.; TÂMBARA FILHO, R.; ROCHA, L.C.; THIEDE, A.; LUNEDO, S.M.; BARBOSA, R.E.; BERNHARDT, J.A.;

VANCONCELOS, P.R. Effect of *Passiflora edulis* extract on rats' bladder wound healing: morphological study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.1-8, 2006.

GOODMAN, J.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. p.869.

GRACIOSO, J.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R.M. 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, p.487-491, 2002.

GUPTA, M.P. **270 plantas medicinales iberoamericanas**. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnologia para El Desarrollo, Presencia, 1995. p.422-426.

HICKEY, L.J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: systematic anatomy of leaf and stem. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1979. cap.4, p.25-39.

HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**: coletânea de 114 aulas primeiramente publicadas no "Estado de São Paulo" de 1934-38. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado, 1939. 355p.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

ITI TROPICALS. Passion Fruit Juice. <http://www.passionfruitjuice.com/>. Acesso em: 21 jul. 08.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, London: McGraw-Hill, 1940. 523p. (McGraw-Hill publications in the botanical sciences).

JUDD, W.S. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.351.

JURIK, T.W.; CHABOT, F.J. Effects of light and nutrients on leaf size, CO₂ exchange and anatomy in wild strawberry (*Fragaria virginiana*). **Plant Physiology**, v.70, p.1044-1048, 1982.

KILLIP, E.P. **American species of Passifloraceae**. Chicago: Field Museum of Natural History, 1938. 613p. (Botanical Series, v.19).

KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, p.171-183, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p.371.

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

LUTOMSKI, J.; WROCINSKI, T. Pharmacodynamic properties of *P. incarnata* preparations. The effect of alkaloid and flavonoid components on pharmacodynamic properties of raw materials. **Biuletyn Instytutu Roslin Leczniczych**, v.6, p. 176-184, 1960.

LUTOMSKI, J.; KOWALEWSKI, Z.; DROST, K.; SCHMIDT, K. Simple carboline alkaloids. I. Thin-layer chromatography of harman alkaloids occurring in plant material and in preparations. **Herba Polonica**, v.13, n.1/2, p.44-52, 1967.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacochemical investigations on raw materials of the genus *Passiflora*. **Planta Medica**, v.27, p.381-384, 1975.

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

MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. **Phytotherapy Research**, v.5, p.262-266, 1991.

MARECK, U.; HERRMANN, K.; GALENSA, R.; WRAY, V. The 6-C-chinovoside and 6-C- fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v.30, p.3486-3487, 1991.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London, New York: Academic Press, 1982. 113p. (Biological techniques series).

MEIER, B. *Passiflorae herba* – pharmazeutische qualität. **Zeitschrift für Phytotherapie**, v.16, p.90-99, 1995.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950. v.1, p.674-680.

MEZO, V.M.M. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies medicinais de *Passiflora* L: *P. alata* Curtis; *P. caerulea* L., *P. edulis* Sims. Forma *flavicarpa* Degener; *P. incarnata* L. e *P. quadrangularis* L.** São Paulo, 2005. 120p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Research. Tropicos. *Passiflora alata*. Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Passiflora+alata>. Acesso em: 5 ago. 2008.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Research. Tropicos. *Passiflora alata*. Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Passiflora+incarnata>. Acesso em: 5 ago. 2008.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Research. Tropicos. *Passiflora edulis*. Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Passiflora+edulis>. Acesso em: 5 ago. 2008.

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.

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

MORAES, M.M.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v.8, p.257-260, 1997.

MOTTA, L.B. **Aspectos químicos e moleculares ligados à filogenia de câmara (Malpighiaceae)**. São Paulo, 2007. 134p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTO, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, 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, p.970-974, 2007.

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

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Conselho executivo. Medicina Tradicional y asistencia sanitaria moderna. *Foro Mundial de la Salud*. **Revista Internacional de Desarrollo Sanitario**, v.12, n.1, p.120, 1991.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra: OMS, 2002. 67p.

OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., PROOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G.G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacological study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.1, p.5-8, 2002.

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

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.; ANGENOT, M.T.L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v.15., 241-248, 2004.

PEREIRA, C.A.M.; YARIWAKE, J.H.; McCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.5, p.295-301, 2006.

PETRY, R.D.; DE SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.; ORTEGA, G.G. Total flavonoid content determination in aerial parts of *Passiflora alata* Dryander (maracuja). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.79, n.2, p.7-10, 1998.

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

PHARMACOPÉE Française. 8.ed. Paris: Commission Permanente de la Pharmacopée par l'Ordre National des Pharmaciens, 1965. p.772.

PHARMACOPOEA Helvetica. 6.ed. Berne: Office Central Federal dès imprimes et du Matériel, 1971. p.693.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p. 45-61, 2002.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.18, n.5, p.451-471, 2003.

QIMIN, L.; VAN DEN HEUVEL, H.; DELORENZO, O.; CORTHOUT, J.; PIETERS, L.A.C.; VLIETINCK, A.J.; CLAEYS, M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography**, v.562, p.435-446, 1991.

RAFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCATI, V.; TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography, A**, v.777, p.223-231, 1997.

RAHMAN, K.L.; KREN, B.; KOPP, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, K.K.; KUBELKA, W. Isoscaparin-2'-O-glucoside from *Passiflora incarnata*. **Phytochemistry**, v.45, n.5, p.1093-1094, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 2003. p.419-425.

REGINATTO, F.H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G.G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two South Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v.20, n.5, p.348-351, 2006.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.6, p.96-100, 1995.

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, p.719-724, 2005.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., org. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2004. cap.15, p.371-400.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; ASTUDILLO, S.L.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Free radical scavengers and antioxidant from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Research**, v.37, p.447-452, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Tradicional medicine and gastroprotective crude drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.61-66, 2005.

SEIGLER, D.S.; PAULI, G.F.; NAHRSTEDT, A.; LEEN, R. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. **Phytochemistry**, v.60, p.873-882, 2002.

SEIGLER, D.S.; SPENCER, K.C. Corrected structures of passicoriacin, epipassicoriacin and epitetraphyllin B and their distribution in the Flacourtiaceae and Passifloraceae. **Phytochemistry**, v.28, p.931-932, 1989.

SILVA, J.R.; CAMPOS, A.C.; FERREIRA, L.M.; ARANHA Jr., A.A.; THIEDE A.; ZAGO FILHO, L.A.; BERTOLI, L.C.; FERREIRA, M.; TRUBIAN, P.S.; FREITAS, A.C. Extract of *Passiflora edulis* in the healing process of gastric sutures in rats: a morphological and tensiometric study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl.2, p.52-60, 2006.

SILVA, T.V.; RESENDE, E.D.; VIANA, A.P.; ROSAS, R.C.C.; PEREIRA, S.M.F.P.; CARLOS, L.A. VITORAZI, L. Influência dos estádios de maturação na qualidade do

suco de maracujá-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.272-275, 2005.

SLAYTOR, M.; McFARLAN, I.J. The biosynthesis and metabolism of harman in *Passiflora edulis*. 1. Biosynthesis of Harman. **Phytochemistry**, v.7, n.4, p.605-611, 1968.

SOPRANZI, N.; FEO, G.; MASSANTI, G.; TOLU, L. Biological and electroencephalographic parameters in rats in relation to *Passiflora incarnata* L. **Clinica Terapeutica**, v.132, n.5, p.329-333, 1990.

SOULIMANI, R.C.; YOUNOS, S.; JARMOUNI, D.; BOUSTA, R.; 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.

SPENCER, C.K.; SEIGLER, D.S. Cyanogenesis of *Passiflora edulis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, p.794-796, 1983.

SPENCER, K.C.; SEIGLER, D.S. Gynocardin from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v.50, p.356-357, 1984).

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, v.54, n.6, p.488-91, 1988.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 14.ed. London: W.B. Saunders, 1996. 612p.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Quantitative analysis of all types of b-carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. **Phytochemical Analysis**, v.10, p.247-253, 1999.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T.J. C-glucosylflavonoids from *Passiflora alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**, v.45, p.783, 1982.

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

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSI, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *P. edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v.78, p.112-11, 2007.

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

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

WEISCHER, M.L.; OKPANYL, S.N. Pharmakologie eines pflanzlichen Schlafmittels. **Zeitschrift für Phytotherapie**, v.15, p.257-262, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO Library, 1998. p.41-43.

WU, K.M.; FARRELLY, J.; BIRNCRANT, D.; CHEN, S.; DOU, J.; ATRAKCHI, A.; BIGGER, A.; CHEN, C.; CHEN, Z.; FREED, L.; GHANTOUS, H.; GOHEER, A.; HAUSNER, E.; OSTERBERG, R.; RHEE, H.; ZHANG, K. Regulatory toxicology perspectives on the development of botanical drug products in the United States. **American Journal of Therapeutics**, v.11, n.3, p.213–217, 2004.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1229-1234, 2000a.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1377-1380, 2000b.

YOSHIKAWA, M.; MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGATOMO, A.; LI, X.; MATSUDA, H. Bioactive saponins and glycosides. XXIII. Triterpene saponins with gastroprotective effect from the seeds of *Camellia sinensis*-theasaponins E3, E4, E5, E6, and E7. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.53, p.1559-1164, 2005.

ZHANG, Y.-B.; SHAW, P.-C.; SZE, C.-W.; WANG, Z.-T.; TONG, Y. Molecular authentication of Chinese herbal materials. **Yaowu Shipin Fenxi**, v.15, n.1, p.1-9, 2007.

Anexo obrigatório

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Senhor(a) Presidente da Banca

Antes do início da apresentação do(a) candidato(a) transmitir as seguintes instruções aos demais membros da Comissão Julgadora e ao candidato:

DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

Instruções

1. O aluno disporá de 30 minutos para fazer sua apresentação do trabalho.
2. A arguição será realizada em sessão pública, que não deverá exceder o prazo de três horas, para o caso de mestrado, e de cinco horas, para o caso do doutorado.
 - 2.1 Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. O relatório deve ser assinado por todos os examinadores e o resultado deve ser preenchido como aprovado ou reprovado. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
 - 3.1 Se algum membro optar pela reprovação, a Comissão Julgadora emitirá (obrigatoriamente) um parecer no campo indicado. Havendo necessidade, o verso do formulário também poderá ser utilizado.
4. O intervalo, quando necessário, deve se restringir a atividades não relativas à defesa. Deve ser breve e sua duração não será computada no tempo total da arguição.
5. Cabe ao presidente da sessão de defesa zelar para que a mesma ocorra dentro das normas legais e do decoro acadêmico.
6. Após a realização da defesa, as duas vias do relatório devem ser encaminhadas para a homologação pela Comissão de Pós-Graduação.
 - 6.1 Não é permitida a cópia da ata antes da homologação pela CPG.

São Paulo, 21 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

Lembrete: Segue em anexo os certificados de participação e duas vias da ata de defesa (relatório de defesa). Constatando alguma incorreção nos documentos, favor comunicar imediatamente a Secretaria de Pós-Graduação, para as devidas correções.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 58 /2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Estudo farmacognóstico de Passiflora edulis Sims (passifloraceae)” (Protocolo CEEA nº144), sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Josseara Beraldo** sob a orientação do Prof(a). Edna Tomiko Myiake Kato, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/05/2007.*

São Paulo, 12 de novembro de 2007.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

AVISO DE
RECEBIMENTO
AVIS CN07

AR

RA 1 5 5 3 1 2 5 5 8 BR

DATA DE POSTAGEM / DATE DE DÉPÔT

08/07/08

UNIDADE DE POSTAGEM / BUREAU DE DÉPÔT

TENTATIVAS DE ENTREGA / TENTATIVES DE LIVRAISON

:

h

:

h

:

h

PREENCHER COM LETRA DE FORMA

ENDEREÇO PARA
DEVOLUÇÃO
RETOUR

NOME OU RAZÃO SOCIAL DO REMETENTE / NOM OU RAISON SOCIALE DE L'EXPÉDITEUR

SOSSEANA PERALDO

ENDEREÇO PARA DEVOLUÇÃO / ADRESSE

RUA VALDEMAR FERREIRA Nº 4

AP 03, BUTANTÃ

CIDADE / LOCALITÉ

SÃO PAULO

UF

SP

BRASIL

05501-000

PREENCHER COM LETRA DE FORMA

AR

DESTINATÁRIO DO OBJETO / DESTINATAIRE

NOME OU RAZÃO SOCIAL DO DESTINATÁRIO DO OBJETO / NOM OU RAISON SOCIALE DU DESTINATAIRE

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOLOGIA

ENDEREÇO / ADRESSE

5072

CEP / CODE POSTAL

58051-970

CIDADE / LOCALITÉ

JOÃO PESSOA

UF

PAÍS / PAYS

PB

DECLARAÇÃO DE CONTEÚDO (SUJEITO À VERIFICAÇÃO) / DISCRIMINATION

1

NATUREZA DO ENVIO / NATURE DE L'ENVOI

☐ PRIORITÁRIA / PRIORITAIRE

☐ EMS

☐ SEGURADO / VALEUR DÉCLARÉ

ASSINATURA DO RECEBEDOR / SIGNATURE DU RÉCEPTEUR

NOME LEGÍVEL DO RECEBEDOR / NOM LISIBLE DU RÉCEPTEUR

Nº DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO DO
RECEBEDOR / ÓRGÃO EXPEDIDOR

RUBRICA E MAT. DO EMPREGADO /
SIGNATURE DE L'AGENT

ENDEREÇO PARA DEVOLUÇÃO NO VERSO / ADRESSE DE RETOUR DANS LE VERS

75240203-0

FC0463 / 16

114 x 186 mm