

Lyca Ribeiro da Fonseca

Desenvolvimento de solução oral a base de *Passiflora incarnata*

Rio de Janeiro

2013

Lyca Ribeiro da Fonseca

Desenvolvimento de solução oral a base de *Passiflora incarnata*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Fernandes Amaral

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos / Farmanguinhos / FIOCRUZ – RJ

F676d

Fonseca, Lyca Ribeiro da

Desenvolvimento de solução oral a base de *Passiflora incarnata*. /
Lyca Ribeiro da Fonseca. – Rio de Janeiro, 2013.

xviii, 70f.: il. 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Fernandes Amaral

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos –
Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e
Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 71-78

1. *Passiflora incarnata*. 2. Flavonóides. 3. Vitexina. 4. Formulações.
5. Cromatografia. I. Título.

CDD 581.634

Lyca Ribeiro da Fonseca

Desenvolvimento de solução oral a base de *Passiflora incarnata*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em de de 2013.

Banca Examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Ana Cláudia Fernandes Amaral (Presidente da Banca)
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ / RJ

Prof.^a. Dr.^a. Wanise Borges Gouvea Barroso
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ / RJ

Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Regina Brandão Gomes
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ / RJ

Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva
Departamento de Química - UFAM / AM

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

A Deus, que criou a todas as coisas e as deixou para que a Humanidade pudesse conhecê-las e delas fazer uso para o bem.

A Giuliana, minha filha, pelo seu amor, paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dr^a Ana Cláudia Fernandes Amaral por sua orientação, ajuda e otimismo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr José Luis Pinto Ferreira por sua ajuda na análise morfológica das espécies vegetais.

Ao herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, IFAM, por ter remetido as amostras das espécies de *Passiflora* cultivadas no *campus* da instituição.

Ao Licínio de Almeida Fontoura, técnico do laboratório de Plantas Medicinais e Derivados, por seu auxílio na realização das análises na cromatografia líquida.

A minha pequena filha, Giuliana, por sua compreensão e companheirismo durante as longas horas de estudo e trabalho.

Ao meu pai, Lory, que durante toda sua vida sempre me incentivou a estudar e continuar estudando sempre (*in memorium*).

A minha mãe Corina, por ter sido a primeira professora na minha vida.

A minha família e amigos pela compreensão e apoio sempre presentes.

Sr. Joaquim Lopes Gomes por ter gentilmente cedido os dias para a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva a realização deste trabalho.

Recria tua vida, sempre, sempre. Remove pedras e planta roseiras e faz doces.
Recomeça.

Cora Coralina

RESUMO

FONSECA, L.R. *Desenvolvimento de solução oral a base de Passiflora incarnata*. 2013. 70f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

As espécies do gênero *Passiflora* são ricas em flavonóides que apresentam atividade ansiolítica, dentre outras. *P. incarnata* L. é a espécie mais estudada tanto por sua composição química quanto por seus efeitos farmacológicos. Contudo, atividades biológicas semelhantes às de *P. incarnata* tem sido relatadas para espécies brasileiras deste gênero botânico, constituindo uma fonte alternativa para a formulação de fitoterápicos. Um estudo preliminar comparativo dos aspectos macroscópicos e microscópicos de quatro espécies nativas, *P. pedata* L., *P. nitida* Kunth e *P. quadriglandulosa* Rodschied, associado à morfologia da folha de *P. edulis* Sims descrita na Farmacopéia Brasileira, foi realizado para a avaliação de possíveis problemas na identificação da espécie de interesse, ou mesmo pela adulteração da droga vegetal proveniente de *P. incarnata*. Os resultados demonstraram grande diversidade morfológica entre *P. pedata*, *P. nitida* e *P. quadriglandulosa*, entretanto foi observada semelhança entre as folhas de *P. edulis* e *P. incarnata*, pois ambas apresentaram limbo trilobado. Não obstante, elas foram diferenciadas pela análise de suas principais características anatômicas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação fitoterápica contendo como ingrediente ativo extrato de *P. incarnata* e identificar o marcador da espécie, vitexina, segundo a legislação vigente. Amostras de extratos desta espécie, obtidas de fornecedores comerciais, foram analisadas por espectrofotometria e cromatografia a fim de identificar e quantificar o marcador. Concomitantemente, foram preparadas formulações farmacêuticas isentas de sacarose a partir destes extratos. As amostras de extratos e formulações foram processadas e analisadas por cromatografia em camada delgada. O cromatograma, após a revelação com reagente químico característico, apresentou manchas relacionadas à vitexina e outras bandas características de flavonóides. As análises obtidas por cromatografia líquida de alta e ultra eficiência (CLAE e CLUE) mostraram diferenças significativas no que tange a quantidade de amostra, sensibilidade, rapidez, delineamento dos sinais e dos respectivos espectros UV. Por meio da CLUE foi possível verificar a presença do principal marcador (vitexina, M^{-1} de 431 daltons) no produto contendo extratos de *Passiflora* e uma amostra padrão deste flavonóide.

Palavras-chave: *Passiflora incarnata*, Flavonóides, Vitexina, Formulações, Cromatografia.

ABSTRACT

FONSECA, L.R. *Development of an oral solution based on Passiflora incarnata*. 2013. 70f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

Species of *Passiflora* are rich in flavonoids which have anxiolytic activity, among other activities. *P. incarnata* L. is the most studied species by its chemical composition and its pharmacological effects. However, biological activities similar to those described for *P. incarnata* have been reported to other Brazilian species of the same genus, providing an alternative source for the formulation of herbal medicines. A comparative preliminary study on macroscopic and microscopic aspects about four native species, *P. pedata* L., *P. nitida* Kunth and *P. quadriglandulosa* Rodeschield, associated to the leaf morphology of *P. edulis* Sims described in the Brazilian Pharmacopoeia, was performed to evaluate possible difficulties in the identification of the species of interest, or even adulteration of the vegetal drug *P. incarnata*. Results showed important morphological differences among *P. pedata*, *P. nitida* and *P. quadriglandulosa*, however there was similarity in the trilobed lamina of *P. incarnata* and *P. edulis* leaves. On the other hand, both species can be distinguished by the analysis of its main anatomical characteristics. The aim of this work was to develop an herbal formulation containing extract of *P. incarnata* as active ingredient, and to identify the marker of the species, vitexin, according to actual law of Brazil. Sample extracts of *P. incarnata* obtained from commercial suppliers were analyzed in order to identify and quantify the marker. Concomitantly, pharmaceutical formulations free of sucrose were prepared with these extracts. Extracts and formulations were processed and analyzed by thin layer chromatography. The chromatogram, revealed by characteristic chemical reagent, showed bands of vitexin and other flavonoids. The high and ultra performance liquid chromatography (HPLC and UPLC) analysis presented significative differences about the sample amount, sensibility, quickness, peaks delineation and respective UV spectra. Using UPLC, it was possible to verify the presence of the main marker (vitexin, M^{-1} of 431 daltons) in the product obtained with the extracts of *P. incarnata* and vitexin standard.

Keywords: *Passiflora incarnata*, Vitexin, Formulations, Flavonoids, Chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Foto da folha de <i>P. incarnata</i> L. Fonte: http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_RCR555&res=640	5
Figura 2 –	Gravura das partes aéreas de <i>P. incarnata</i> L. Detalhe do fruto e folha trilobada. Fonte: http://www.swsbm.com/NGSImages/Passiflora_incarnata.jpg	5
Figura 3 –	Foto da flor. Fonte: Britton, N.L., and A. Brown. 1913. <i>An illustrated flora of the northern United States, Canada and the British Possessions. 3 vols.</i> Charles Scribner's Sons, New York. Vol. 2: 565. Courtesy of Kentucky Native Plant Society. Scanned by Omnitek Inc. Usage Requirements.....	6
Figura 4 –	Foto do fruto maduro em secção transversal mostrando sementes revestidas com a polpa. Fonte: http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com/plantas-medicinai-maracuja.html	7
Figura 5 –	Principais flavonóides de <i>P. incarnata</i> L.....	10
Figura 6 –	Principais alcalóides indólicos de <i>P. incarnata</i>	11
Figura 7 –	Número de medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA que empregam espécies de <i>Passiflora</i>	12
Figura 8 –	Fitoterápicos a base de <i>Passiflora</i> comercializados no Brasil.....	13
Figura 9 –	Principais especialidades farmacêuticas de fitoterápicos a base de <i>Passiflora</i>	13
Figura 10 –	Equação do teor da perda por dessecação.....	19
Figura 11 –	Foto das folhas em face adaxial de <i>P. edulis</i> Sims (A), <i>P. nitida</i> Kunth (B), <i>P. pedata</i> L. (C) e <i>P. quadriglandulosa</i> Rodschied (D). Fonte: Arquivo pessoal.....	23
Figura 12 –	Foto de <i>P. incarnata</i> L. em secção transversal da nervura central apresentando idioblastos (Id), feixes vasculares (Fc), tricomas tectores multisseriados (Tc).....	25
Figura 13 –	Foto de <i>P. incarnata</i> L. em secção longitudinal da nervura central com estômatos anomocítico (Es) e células epidérmicas de paredes sinuosas (Ep).....	25
Figura 14 –	Foto de <i>P. edulis</i> Sims em secção transversal da nervura central com	

	tricomas tectores unicelulares (Tc) e feixes vasculares (Fv).....	26
Figura 15 –	Foto de <i>P. edulis</i> Sims em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes ondeadas e estômatos anomocíticos (Esa) e paracíticos (Esp).....	26
Figura 16 –	Foto de <i>P. pedata</i> L em secção transversal da nervura central com tricomas tectores unicelulares (Tc), feixes vasculares colaterais (Fv), drusas (Dr) e idioblastos taníferos (Id).	27
Figura 17 –	Foto de <i>P. pedata</i> L em secção paradérmica região da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas e estômatos paracíticos (Esp).....	28
Figura 18 –	Foto de <i>P. pedata</i> L em secção paradérmica da nervura central indicando numerosas drusas (Dr) ao longo de feixe vascular.....	28
Figura 19 –	Foto de <i>P. quadriglandulosa</i> Rodschied em secção transversal da nervura central com tricomas tectores pluricelulares longos (Tc), periciclo fibroso e descontínuo (Pe), feixes vasculares colaterais (Fc) e numerosas drusas de oxalato de cálcio (Dr).....	29
Figura 20 –	Foto de <i>P. quadriglandulosa</i> Rodschied em secção transversal da nervura central com tricomas tectores pluricelulares.....	29
Figura 21 –	Foto de <i>P. quadriglandulosa</i> Rodschied em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas, estômatos paracíticos (Esp) e anomocíticos (Esa), e tricomas (Tc).....	29
Figura 22 –	Foto de <i>P. nitida</i> Kunth em secção transversal da nervura central apresentando idioblastos (Id), periciclo (Pe) e feixes vasculares (Fc).....	30
Figura 23 –	Foto de <i>P. nitida</i> Kunth em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas, estômatos anomocíticos (Esa) e numerosas drusas (Dr) de oxalato de cálcio ao longo da nervura foliar (Ne).....	31
Figura 24 –	Foto comparativa dos extratos fluidos S e CF e do extrato seco H.....	33
Figura 25 –	Cromatograma com o padrão vitexina e amostras dos extratos. Revelador solução NP/PEG e posterior visualização em lâmpada UV a 366 nm. Percurso de 5 cm.....	36
Figura 26 –	Cromatograma das amostras obtido após a eluição com clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (8,0:2,0:0,025). Visualização em lâmpada de UV a 366 nm.....	37
Figura 27 –	Cromatograma acima revelado com solução de Dragendorff.....	37
Figura 28 –	Estrutura geral dos flavonóides com indicação dos anéis aromáticos, numeração dos carbonos e indicação das bandas I e II.....	38

Figura 29 –	Representação estrutural do complexo formado entre H ₃ BO ₃ e flavonóide. Adaptado de MARTINEZ, A. M., 2005.....	39
Figura 30 –	Representação estrutural do complexo formado entre AlCl ₃ e flavonóide. Adaptado de MARTINEZ, 2005.....	40
Figura 31 –	Fluxograma da preparação das amostras para reação de complexação AlCl ₃ e os flavonóides das amostras.....	41
Figura 32 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na amostra Ext. S. — - banda I (334,5 nm; Abs = 1,8541) e banda II (271 nm; Abs = 1,3423); — - banda I (344,0 nm; Abs = 1,2544) e banda II (279,5 nm; Abs = 1,8044).....	41
Figura 33 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides no extrato CF. — - banda I (340,5 nm; Abs = 0,0502) e banda II (274,5 nm; Abs = 0,0658); — - banda I (343,0 nm; Abs = 0,0481) e banda II (277 nm; Abs = 0,0647).....	42
Figura 34 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides no extrato H. — - banda I (332,5 nm; Abs = 0,3439) e banda II (271 nm; Abs = 0,4153); — - banda I (335,0 nm; Abs = 0,3291) e banda II (279,0 nm; Abs = 0,4105).....	42
Figura 35 –	Curva de calibração elaborada com o padrão rutina.....	43
Figura 36 –	Concentração de flavonóides totais presentes nos extratos. ■ - Ext. CF; ◆ - Ext. H; ▲ - Ext. S.....	43
Figura 37 –	Cromatograma obtido por CLAE (254 nm) da fração aquosa do extrato S e os espectros UV característico dos flavonóides.....	46
Figura 38 –	Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) da fração aquosa do extrato S.....	46
Figura 39 –	Cromatograma obtido por CLAE (254 nm) do extrato CF e os espectros UV característico dos flavonóides.	47
Figura 40 –	Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) do extrato bruto CF.....	47
Figura 41 –	Cromatograma da CLAE (254 nm) da fração MeOH:H ₂ O do extrato H....	47
Figura 42 –	Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) da fração MeOH:H ₂ O do extrato H e espectros UV característicos de flavonóides na amostra.....	48
Figura 43 –	Cromatograma de CLUE-EM do íon selecionado 431daltons do padrão vitexina.....	49
Figura 44 –	Cromatograma obtido por CLUE e respectivo espectro UV do padrão vitexina (t _R = 4,77 min).....	49

Figura 45 –	Cromatograma obtidos por CLUE do Ext. S em 360 nm com destaque do espectro UV do sinal da vitexina e espectros UV dos demais sinais associados as substâncias flavonoídicas do extrato.....	50
Figura 46 –	Cromatograma de massas do Ext. S com monitoramento seletivo do íon 431 daltons relacionado a vitexina.....	51
Figura 47 –	Cromatograma da CLUE da fração aquosa de Ext. S com destaque do espectro UV relacionado ao sinal da vitexina e os espectros UV dos sinais dos demais flavonóides.....	51
Figura 48 –	Cromatograma de massas da fração aquosa do Ext. S associado a seleção monitorada do íon 431 daltons.....	51
Figura 49 –	Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H ₂ O do Ext. S com destaque para o espectro UV do sinal relacionado ao t _R da vitexina e os demais sinais com espectros UV característicos de flavonóides.....	52
Figura 50 –	Cromatograma de massas da fração MeOH/H ₂ O do Ext. S associado a seleção monitorada do íon 431 daltons.....	52
Figura 51 –	Cromatograma da CLUE do Ext. CF com destaque do espectro UV e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os demais sinais associados aos flavonóides do extrato.....	53
Figura 52 –	Cromatograma da CLUE da fração aquosa do Ext. CF com destaque do espectro UV e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os demais sinais associados aos flavonóides do extrato.....	54
Figura 53 –	Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H ₂ O de Ext. CF e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides do extrato, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.....	54
Figura 54 –	Cromatograma da CLUE de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides do extrato, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.....	55
Figura 55 –	Cromatograma da CLUE da fração aquosa de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides da fração, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.....	55
Figura 56 –	Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H ₂ O de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides da fração, sendo o em 4,8 min relacionado a	

	vitexina.....	56
Figura 57 –	Foto ilustrativa das formulações. ED.S, ED.CF e ED.H.....	59
Figura 58 –	Fluxograma da preparação das amostras das formulações para reação de complexação entre o AlCl ₃ e os flavonóides.....	60
Figura 59 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.S sem e com AlCl ₃ . ■ – banda I (344,5 nm; Abs = 0,30638) e banda II (275 nm; Abs = 3,999); ■ - banda I (347,0 nm; Abs = 1,9618) e banda II (276,0 nm; Abs = 3,2665).....	60
Figura 60 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.CF sem e com AlCl ₃ . ■ – banda I (337,0 nm; Abs = 0,3629) e banda II (260 nm; Abs = 1,1016); ■ - banda I (337,0 nm; Abs = 0,3521) e banda II (261,0 nm; Abs = 1,067).....	61
Figura 61 –	Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.H sem e com AlCl ₃ . ■ – banda I (330,5 nm; Abs = 1,9131) e banda II (275 nm; Abs = 3,2665); ■ - banda I (333,0 nm; Abs = 1,725) e banda II (277,0 nm; Abs = 2,5240).....	61
Figura 62 –	Teor de flavonóides totais expressos em rutina nas formulações. ■ - ED. CF; ◆ - ED. H; ▲ - ED. S.....	62
Figura 63 –	Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.S e respectivos espectros UV dos sinais visualizados.....	64
Figura 64 –	Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.CF.....	64
Figura 65 –	Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.H.....	65
Figura 66 –	Cromatograma do Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED.S com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min, pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.....	66
Figura 67 –	Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED.CF com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.....	67
Figura 68 –	Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED.H com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min, pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação de patentes depositadas no País.....	15
Tabela 2 –	Comparação dos valores de pH das soluções S, CF e H.....	34
Tabela 3 –	Comparação dos valores de densidade dos extratos.....	34
Tabela 4 –	Comparação dos valores de perda por dessecação dos extratos.....	35
Tabela 5 –	Teor alcoólico dos extratos.....	35
Tabela 6 –	Identificação das amostras.....	36
Tabela 7 –	Teor de flavonóides totais expressos em rutina e vitexina.....	44
Tabela 8 –	Comparação dos valores de pH das formulações.....	58
Tabela 9 –	Comparação dos valores de densidade das formulações.....	58
Tabela 10 –	Teor alcoólico das formulações.....	58
Tabela 11 –	Teor de flavonóides totais expressos em rutina.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBPFC	Certificação de Boas Práticas de Fabricação e Controle
CCD -	Cromatografia em camada delgada
CL	Cromatografia Líquida
CLAE / DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
FARM. BRAS	Farmacopéia Brasileira
CLUE / EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas
DF	Distrito Federal
DOU	Diário Oficial da União
IN	Instrução Normativa
OMC	Organização Mundial do Comércio
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
SB	Solução Branco
SE	Solução Estoque
ST	Solução Teste
TFT	Teor de flavonóides totais
t_R	Tempo de retenção
TRIPS	Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (sigla em inglês)
UF	Unidade Federativa do Brasil
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	1
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1.1	Características Morfológicas.....	4
1.1.1.	<u>Descrição Macroscópica.....</u>	4
1.1.2.	<u>Descrição Microscópica.....</u>	7
1.2	Constituintes Químicos.....	8
1.3.	Produtos Registrados.....	11
1.4.	Produtos Comercializados no Brasil.....	12
1.5.	Propriedade Intelectual e Patentes no Brasil.....	14
2	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivo Geral.....	15
2.2.	Objetivos Específicos.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1.	Experimental.....	16
3.1.1.	<u>Equipamentos.....</u>	16
3.1.2.	<u>Padrões, Soluções e Reagentes.....</u>	17
3.1.3.	<u>Matéria-Prima e Material Vegetal.....</u>	18
3.1.4.	<u>Coadjuvantes Farmacotécnicos.....</u>	18
3.1.5.	<u>Determinação da perda por dessecação.....</u>	18
3.1.6.	<u>Determinação da densidade relativa.....</u>	19
3.1.7.	<u>Determinação do teor alcoólico.....</u>	19
3.1.8.	<u>Preparo de frações a partir dos extratos brutos e produtos para CCD.....</u>	20
3.1.8.1.	Extratos brutos.....	20
3.1.8.2.	Produtos.....	21
3.1.9.	<u>Análises no espectrofotômetro UV/VIS.....</u>	21
3.1.9.1.	Extratos.....	21
3.1.9.2.	Produtos.....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1	Matéria-Prima Vegetal.....	22
4.1.1.	<u>Descrição Macroscópica.....</u>	22
4.1.2.	<u>Descrição Microscópica.....</u>	24

4.2	<u>Especificações dos Extratos</u>	32
4.2.1.	<u>Determinação de pH</u>	33
4.2.2	<u>Determinação da densidade relativa</u>	34
4.2.3.	<u>Determinação da perda por dessecação</u>	34
4.2.4.	<u>Determinação do teor alcoólico</u>	35
4.2.5.	<u>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u>	35
4.2.6.	<u>Espectrofotometria Ultravioleta / Visível (UV / VIS)</u>	38
4.2.7.	<u>Análise por CLAE / DAD</u>	44
4.2.8.	<u>Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Associada a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas (CLUE - DAD – EM)</u>	48
4.3.	Produto a base de <i>Passiflora</i>	57
4.3.1.	<u>Análises Físico-químicas do Produto</u>	57
4.3.2.	<u>Análise por CCD dos produtos</u>	59
4.3.3.	<u>Análise por Espectrofotometria UV / VIS dos produtos</u>	59
4.3.4.	<u>Análise dos produtos por CLAE / DAD</u>	63
4.3.5.	<u>Análise dos produtos por CLUE – DAD – EM</u>	65
4.3.6.	<u>Patenteamento: Uma Possibilidade?</u>	68
5.	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	79

INTRODUÇÃO

A fitoterapia é uma prática terapêutica milenar, presente em todas as sociedades humanas. Ao longo de séculos, vem sendo utilizada e documentada por seu valioso conhecimento tradicional e popular decorrente de sua rica diversidade étnica e cultural. Esses conhecimentos são fontes estratégicas de informações preliminares de eficácia ou toxicidade das plantas medicinais, inspirando muitos estudos científicos sobre essas propriedades terapêuticas e, em muitos casos, resultando em preparações medicamentosas. No entanto, para que essas preparações possam ser classificadas como fitoterápicos, é necessário que esse medicamento seja obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações técnico-científicas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010a).

No Brasil, o controle sanitário desses medicamentos é exercido através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde, que tem como papel garantir a segurança sanitária de produtos e serviços (BRASIL, 1999). Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos à venda para utilização pela população.

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos, a RDC nº 14, de 2010, determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e evidências de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas (BRASIL, 2010a). Contudo, caso a espécie vegetal esteja contemplada na Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado (BRASIL, 2008a), as informações acerca da segurança e eficácia já estarão comprovadas por meio da literatura técnico-científica, sendo necessário apenas indicar qual a literatura utilizada (BRASIL, 2010b). Caso o fitoterápico não esteja contemplado nesta listagem, devem ser atendidas as etapas de estudos de toxicidade pré-clínica e de pesquisa clínica (BRASIL, 2004a; 2008b).

O desenvolvimento de um medicamento, incluindo o fitoterápico, abrange os estudos de estabilidade (BRASIL, 2005), o qual é precedido pela notificação da produção de lotes-piloto (BRASIL, 2009a). Além dessas regulamentações, os fitoterápicos estão submetidos às regras de rotulagem, padronização de bulas e alterações pós-registro (BRASIL, 2009b; 2009c, 2004b), além das demais regulamentações, como a certificação de Boas Práticas de

Fabricação e Controle (CBPFC) (BRASIL, 2010c). Além da resolução de padronização de bulas, a ANVISA emitiu a RDC nº 95, de 11 de dezembro de 2008, que regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos, os quais estão elencados em seu anexo, nomeando-os de fitoterápicos com bulas-padrão (BRASIL, 2008c). Desta forma, as medidas regulatórias para o fitoterápico abrangem desde seu fornecedor de insumos ativos até seu produto final, elaborado sob as rígidas normas sanitárias.

Por outro lado, a ANVISA procurou disciplinar o uso de plantas medicinais utilizadas popularmente, editando a resolução RDC nº 10, de 9 de março de 2010, dispondo sobre a notificação de drogas vegetais junto a esta Agência (BRASIL, 2010d). Nessa resolução, a definição de droga vegetal é a planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas, que estejam relacionadas em seu anexo (BRASIL, 2010d). Estas são isentas de prescrição médica, devem apresentar definição do uso tradicional e não podem estar em associação com outras substâncias, vegetais ou não. Como se destinam ao uso episódico, oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças relacionadas em seu anexo, essas drogas vegetais devem ser disponibilizadas exclusivamente na forma de droga vegetal para o preparo de infusões, decocções e macerações, os quais são conhecidos tradicionalmente como chás. Não podem ser notificadas em qualquer outra forma (cápsula, tintura, comprimido, extrato, xarope, entre outros) (BRASIL, 2010d).

Desta forma, indubitavelmente uma preparação medicamentosa caseira foi separada (BRASIL, 2010d) daquela cientificamente elaborada por um fabricante de medicamentos (BRASIL, 2010a). Com o respaldo técnico e legal vigente no País, é possível desenvolver um medicamento fitoterápico, de notificação simplificada, e que seja inovador, procurando-se uma necessidade até então não suprida no mercado consumidor.

A presente dissertação é o resultado da necessidade de uma indústria farmacêutica de pequeno porte, nacional, em aumentar seu portfólio de produtos. Sendo seu principal produto pertencente à classe de medicamentos fitoterápicos, buscou-se junto à Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado (BRASIL, 2008a), uma relação de possíveis fitoterápicos de interesse. Inicialmente foram avaliadas as metodologias analíticas, a forma farmacêutica de apresentação e a inserção do novo produto no mercado consumidor, sendo escolhidas as partes aéreas de *Passiflora incarnata* L. para esse experimento (BRASIL, 2008a).

De acordo com Muschner e colaboradores (2003), a família Passifloraceae está dividida em duas tribos: Paropsieae, com seis gêneros, todos encontrados na Europa, África e Madagascar, e Passifloraceae com 14 gêneros, sendo cinco deles encontrados nas Américas e nove na Europa (MUSCHNER *et al*, 2003). O gênero *Passiflora*, pertencente à família Passifloraceae, abriga de 400 a mais de 600 espécies (PEREIRA e VILEGAS, 2000; MUSCHNER *et al*, 2003; SOUZA, PEREIRA e VIEIRA, 2008). São conhecidas popularmente no Brasil como maracujazeiros (OLIVEIRA e RIGGIERO, 2005; GOSMANN *et al*, 2011) e estão amplamente distribuídas nos trópicos, especialmente da América e África (BERNACCI *et al*, 2005).

Apesar das diferentes espécies de *Passiflora* existentes, apenas duas são relatadas na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010e), *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis, sendo comercializados no Brasil os medicamentos fitoterápicos das espécies: *P. alata* e *P. incarnata*, sendo essa última a mais estudada do ponto de vista farmacológico (GOSMANN *et al*, 2011). *P. incarnata* está inscrita em códigos farmacêuticos oficiais de diferentes países, como *British Herbal Pharmacopoeia* (1983), *United States Homoeopathic Pharmacopoeia* (1981), *Homoeopathic Pharmacopoeia of India* (1974), *Pharmacopoeia Helvetica* (1987), Farmacopéias Egípcia, Francesa, Alemã e Suíça, *British Herbal Compendium* (1992) (Dhawan *et al* (2004); Gosmann *et al* (2011)).

Dentre as espécies estudadas nesse trabalho, *P. edulis* e *P. alata* apresentam numerosos estudos taxonômicos, farmacológicos, toxicológicos, dentre outros, porém outras espécies nativas do Brasil, apesar de catalogadas há bastante tempo, ainda carecem de estudos quanto a seu potencial para uso alimentício, cosmético e farmacêutico (CERVI & RODRIGUES, 2010). Trabalhos recentes sobre *P. nitida* Kunth reportam para o extrato das folhas dessa espécie importantes atividades farmacológicas, tais como atividade anticoagulante e/ou coagulante moderada (CARVALHO *et al*, 2010) e efeito hipoglicemiante (LIMA *et al*, 2012). As espécies *P. pedata* L. e *P. quadriglandulosa* Rodschied possuem publicações científicas antigas e referentes basicamente à taxonomia (CERVI, 1997; CERVI & JUNIOR, 2004).

Diferentes atividades são relatadas para *P. incarnata*, principalmente no âmbito farmacêutico como capaz de atuar no sistema nervoso central para o tratamento de distúrbios da ansiedade. As substâncias mais abundantes existentes nas folhas dessa espécie pertencem à classe dos flavonóides, principalmente os C-glicosilados, que podem estar diretamente relacionados à atividade farmacológica da planta (PEREIRA e VILEGAS, 2000).

Uma forma farmacêutica líquida com o extrato fluido de *P. incarnata* bastante aceita pelos consumidores é comercializada como xarope, o qual é definido como uma solução aquosa de alta viscosidade, que apresenta não menos que 45% (p/p) de sacarose ou outros açúcares na sua composição, e geralmente contem agentes flavorizantes (BRASIL, 2010e).

Comercialmente, a base do xarope simples pode ser obtida pronta, porém as quantidades comercializadas podem inviabilizar sua aquisição por indústrias farmacêuticas interessadas em uma produção industrial de pequena escala. Do ponto de vista econômico é interessante para pequenas indústrias evitar a produção *in loco*, uma vez que o processo envolve aquecimento, com o rígido controle de temperatura e tempo a fim de se evitar a formação de açúcares invertidos, os quais conferem sabor amargo e escurecimento ao xarope.

Alternativa para uma apresentação cujo veículo seja semelhante ao xarope, contudo sem a necessidade de aquisição de grandes volumes deste ou de sua preparação a quente, pode ser a elaboração de preparações farmacêuticas, nas quais a sacarose é substituída por outro edulcorante não glicogênico. Adicionalmente, essas preparações farmacêuticas apresentam algumas vantagens sobre o xarope simples, por não serem cariogênicas, e podendo ser utilizadas por diabéticos.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Características Morfológicas

1.1.1. Descrição Macroscópica

Passiflora incarnata L. é uma planta perene, rasteira e trepadeira, de 6 a 10 metros de comprimento, com caule lignificado e muito ramificado, verde, verde-acinzentado ou acastanhado, geralmente inferior a 5 cm de diâmetro, arredondado, estriado longitudinalmente e geralmente oco (Figura 1). Possui folhas simples e alternadas, muitas vezes, com pecíolos torcidos, de 8 cm, possuindo dois nectários extra-florais no ápice; verdes ou marrom-esverdeadas, espalmadas com três a cinco lobos lanceolados, profundamente divididas, com

nervuras centrais de 6 a 15 cm de comprimento e nervuras laterais de 5 a 12 cm de comprimento, glabras ou finamente pilosas na superfície inferior, com margem serrilhada. Possui gavinhas nas axilas das folhas, redondas, lisas e terminando em espirais cilíndricas, com as quais se utiliza para se prender e subir em outras plantas (CERVI, 1997; FIALLO *et al*, 2000) (Figura 2).



Figura 1: Foto da folha de *P. incarnata* L.
Fonte: http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_RCR555&res=640

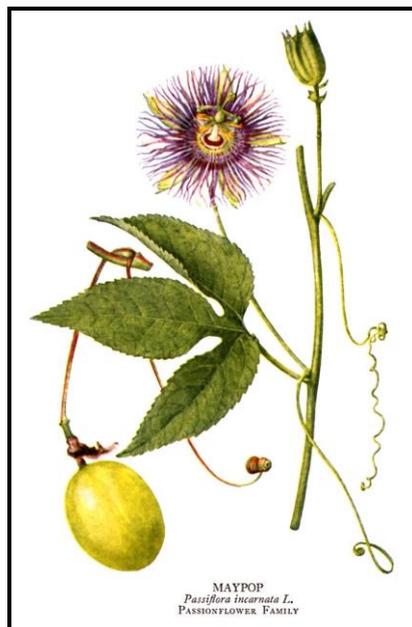


Figura 2: Gravura das partes aéreas de *P. incarnata* L. Detalhe do fruto e folha trilobada.
Fonte: http://www.swsbm.com/NGSImages/Passiflora_incarnata.jpg

As flores são grandes e solitárias, com pedúnculos longos, esbranquiçados, com uma tríplice coroa em roxo e rósea. Possuem de 5 a 9 centímetros de diâmetro, com pedúnculo até 8 cm de comprimento, provenientes das axilas das folhas; brácteas oblongas, de margem papilosa, com duas glândulas na base, de 4 a 8 cm de comprimento e de 2,5 a 4 mm de largura; cinco pétalas brancas, alongadas; cálice de cinco sépalas oblongo-lanceoladas, de 3 cm de comprimento, de coloração interna branca ou lilás, e verde externamente; cinco estames grandes e unidos por suas bases, formando uma membrana aderente ao androginóforo junto à inserção do ovário, verde-acinzentado, o qual está acima dos estames e é sempre unilocular com três placentas parietais. Os filamentos dos estames são dorsifixos e as anteras são biloculares. Apresentam três estiletos cilíndricos ou clavados, que se iniciam do centro do extremo superior do ovário; estigmas capitados, orbiculares ou reniformes. (CERVI, 1997; FIALLO *et al*, 2000; HERBA PASSIFLORAE, 2007) (Figura 3).



Figura 3: Foto da flor.

Fonte: Britton, N.L., and A. Brown. 1913. *An illustrated flora of the northern United States, Canada and the British Possessions*. 3 vols. Charles Scribner's Sons, New York. Vol. 2: 565. Courtesy of Kentucky Native Plant Society. Scanned by Omnitek Inc. Usage Requirements.

Os frutos são bagas ovais de 4 a 6 cm de diâmetro, achatados, amarelo-esverdeados na maturação; contendo numerosas sementes de 4 a 6 mm de comprimento, com 3 a 4 mm de largura e 2 mm de espessura, envolvidas por polpa de coloração amarelada ou acastanhada (FIALLO *et al*, 2000; HERBA PASSIFLORAE, 2007) (Figura 4).



Figura 4: Foto do fruto maduro em secção transversal mostrando sementes revestidas com a polpa.

Fonte: <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/plantas-mediciniais-maracuja.html>

1.1.2. Descrição Microscópica

Os aspectos microscópicos de *Passiflora* foram descritos primeiro por Solereder (1908 *apud* DHAWAN, 2004). Em seu trabalho, foi observado que há uma ausência de características anatômicas distintas do gênero. Em muitas espécies de *Passiflora*, a epiderme da folha e do caule é caracterizada por cutículas protuberantes, enquanto em outras espécies, essas estruturas são apenas de ocorrência isolada, por exemplo, em *Passiflora spinosa* Mastro.

As folhas da maioria dos membros do gênero *Passiflora* são dorsiventrais e apresentam estômatos anomocíticos, geralmente no lado inferior da folha.

Os feixes vasculares das nervuras menores são normalmente colaterais. Eles podem ou não ser acompanhadas de esclerênquima. Cristais de oxalato de cálcio estão presentes no tecido da folha e eixo, na forma de prismas ou agrupamentos de cristais, formando drusas. A folha tem células taníferas, que em certas espécies de *Passiflora* são desenvolvidas como vesículas secretoras de tanino; as quais em sua maioria apresentam um lúmen desenvolvido, com paredes espessas e consideravelmente alongadas na direção vertical (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996; DHAWAN *et al*, 2004).

Nas espécies de *Passiflora*, duas formas de tricomas podem estar presentes, com paredes de espessura variável. Os tricomas podem ser glandulares ou tectores, possuindo uma haste multi-seriada, de tamanho variável e, quando muito, às vezes contém um feixe vascular. A cabeça glandular consiste em núcleos multi-seriados de células alongadas, o que, por assim dizer, constitui a continuação da haste, e de uma camada epidérmica secretora.

Os tricomas também podem ser pequenas glândulas puntiformes. Em uma secção transversal, células epidérmicas alongadas radialmente são observadas na periferia dos tricomas puntiformes; próximas do centro são ligados por células, cujas paredes se espessam progressivamente e tornando seu lúmen mais estreito, de modo que o tricoma é cercado por uma barreira de células de paredes espessas. Estas células em seguida, passam para o tecido secretor, cujas células têm contorno poligonal visto na superfície, mas em uma secção transversal da folha são vistas moderadamente alongadas (DHAWAN *et al*, 2004).

Várias camadas dessas células prismáticas se sobrepõem umas acima das outras e, finalmente, no interior da folha, as camadas se fundem em um pequeno tecido celular preenchido com grupos de cristais. As glândulas sésseis grandes ou os pequenos pedúnculos que ocorrem, com tanta frequência sobre os pecíolos, são apenas uma modificação destes tricomas puntiformes (BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 1996).

A formação do cortex no caule geralmente ocorre superficialmente, na epiderme ou nas camadas celulares subepidérmicas. A transformação da camada mais externa das células corticais em cortex ocorre na maioria das espécies de *Passiflora*. As células corticais têm paredes finas. O cortex esponjoso de *Passiflora suberosa* Linn. é constituído por células, que são bastante alongadas radialmente e não são suberizadas. O córtex primário frequentemente contém tecido colenquimatoso. O periciclo inclui grupos isolados de fibras liberianas, ou um anel esclerenquimático. Grupos isolados de fibras liberianas ocorrem em espécies de *Passiflora*.

O caule de espécies de *Passiflora* é caracterizado por uma amplitude variável de raios medulares. Amplos raios medulares ocorrem tanto em espécies trepadeiras quanto naquelas arbustivas (*Passiflora arborea* Spruce). Em espécies que sobem por meio de gavinhas, por exemplo, em *Passiflora spicata* Mart., o diâmetro dos vasos atinge 0,22 mm. A estrutura da parede do vaso, onde ela está em contato com o parênquima da medula radicular, é variável.

O parênquima é escassamente desenvolvido, o prosênquima pode ser distintamente limitado ou formar pequenas fossas. Estas são ocasionalmente septadas, por meio de divisão de paredes muito finas (DHAWAN *et al*, 2004).

1.2. Constituintes Químicos

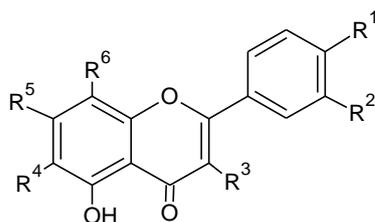
Na pesquisa fitoquímica em busca dos componentes a que podem ser atribuídas as relatadas atividades farmacológicas, alguns autores descrevem que os flavonóides podem estar relacionados com as propriedades ansiolíticas. Maltol e alcalóides derivados do harmano podem também estar envolvidos com efeitos depressores no sistema nervoso central (DE-PARIS *et al*, 2002; DHAWAN *et al*, 2004; SOULIMANI *et al*, 1997).

Em termos quantitativos, é importante destacar a diferença no conteúdo de flavonóides C-glicosilados presentes em *P. incarnata* e *P. alata*. Isovitexina (figura 5) é o principal flavonóide e está presente em maior quantidade em *P. incarnata* (MENDEZ *et al*, 2011). Por outro lado, os flavonóides vitexina e apigenina (figura 5) estão presentes em maior quantidade em *P. alata* (MENGHINI *et al*, 1993; MÜLLER *et al*, 2005). Deve ser dada atenção ao maior acúmulo de flavonóides nas folhas e a maior concentração de isovitexina entre a pré-floração e floração (MENGHINI *et al*, 1993).

Considerando os estudos que indicam a presença de flavonóides em extratos de *Passiflora* e sua relação com as propriedades farmacológicas, vários trabalhos tem proposto a análise do teor de flavonóides totais para avaliação preliminar do material extrativo dessa espécie vegetal (PETRY *et al*, 1998, 2001; DE-PARIS *et al*, 2002; PEREIRA *et al*, 2004; MÜLLER *et al*, 2005; REGINATTO *et al*, 2006). Além disso, o tipo de flavonóide pode representar um marcador particularmente importante para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, o que possibilitaria a identificação de diferentes espécies de *Passiflora* (QUERCIA *et al*, 1978; GONZÁLES ORTEGA e SCHIMIDT, 1995; PETRY *et al*, 1998).

Os flavonóides C-glicosilados encontrados em *P. incarnata* apresentam as porções glucosídeas com pouca diversificação, sendo o principal a glicose, e estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono resistente à hidrólise, apenas nas posições 6 e 8 do núcleo dos flavonóides (JAY, 1996).

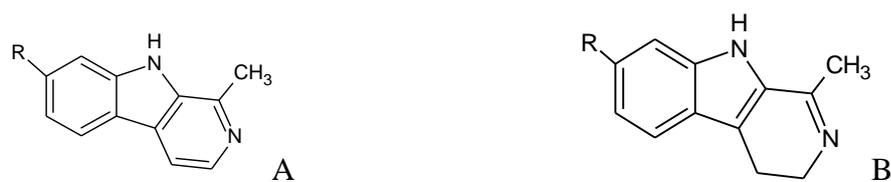
Segundo Dhawan (2004), os flavonóides são relatados como sendo os principais fito-componentes de *P. incarnata*. Dessa maneira, ela é caracterizada fitoquimicamente por um conjunto de flavonóides C-glicosilados, tais como vitexina (1), isovitexina (2), schaftosídeo (3), isoschaftosídeo (4) e isovitexina-2''-O-glicosilada (WOLMUTH, H. *et al*, 2010; ZERAIK *et al*, 2010). Além desses, são encontrados a apigenina (5), luteolina (6), quercetina (7), kaempferol (8), C-glicosídeos da orientina (9), da iso-orientina (10) e da swertisina (11), e crisina (12) (DHAWAN *et al*, 2004). A figura 5 ilustra as estruturas químicas dos flavonóides de *P. incarnata*.



Flavonóides	R1	R2	R3	R4	R5	R6
(1) Vitexina	OH	H	H	H	OH	Glicose
(2) Isovitexina	OH	H	H	Glicose	OH	H
(3) Schaftosídeo	OH	H	H	Glicose	OH	Arabinose
(4) Isoschaftosídeo	OH	H	H	Arabinose	OH	Glicose
(5) Apigenina	H	H	H	H	OH	H
(6) Luteolina	OH	OH	H	H	OH	H
(7) Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	H
(8) Kaempferol	H	OH	OH	H	OH	H
(9) Orientina	OH	OH	H	H	OH	Glicose
(10) Iso-orientina	OH	OH	H	Glicose	OH	H
(11) Swertisina	OH	H	H	Glicose	OCH ₃	H
(12) Crisina	H	H	H	H	OH	H

Figura. 5 – Principais flavonóides de *P. incarnata*

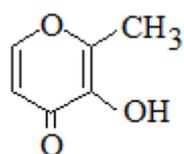
Os alcalóides presentes no género *Passiflora* são do tipo indólico. Os alcalóides indólicos compreendem o segundo grande grupo de alcalóides atualmente conhecidos (ZERAIK *et al*, 2010). Muitos tem valor na medicina como tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (HARBONE e BAXTER, 1995). *P. incarnata* é a espécie mais estudada com relação aos alcalóides (PEREIRA *et al*, 2000), sendo detectados, em estudos da década de 60, harmina (13), harmol (14), harmalina (15), harmalol (16) e harmana (17) (figura 6). Em estudos recentes, a presença de traços desses alcalóides foi confirmada (PEREIRA e VILEGAS, 2000), sendo indetectáveis na maioria dos materiais comerciais (HERBA PASSIFLORAE, 2007).



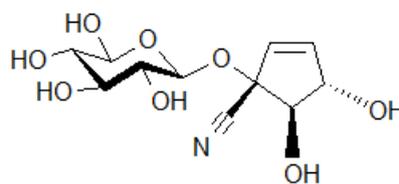
Alcalóides			
A	R	B	R
(13) Harmina	OCH ₃	(15) Harmalina	OCH ₃
(14) Harmol	OH	(16) Harmalol	OH
(17) Harmana	H		

Figura 6 – Principais alcalóides de *P. incarnata*

Outros constituintes químicos foram identificados, como carboidratos, aminoácidos, benzopironas, derivados pirônicos, maltol (18) e etil-maltol, um glicosídeo cianogênico (ginocardina) (19), dentre outras substâncias (DHAWAN *et al*, 2004; PATEL *et al*, 2009).



(18)



(19)

1.3. Produtos Registrados

Conforme mencionado anteriormente, para a comercialização de medicamentos no Brasil é necessário o registro no órgão sanitário competente. A relação constante no Anexo (ver página 79) se refere aos produtos e apresentações registrados no Banco de Dados da ANVISA (BRASIL, 2013a), onde pode ser observada a presença de produtos compostos por espécies do gênero *Passiflora* em associação a outras substâncias ativas. Nesta busca foram considerados produtos registrados a partir de 1985, alguns já fora do mercado, porque a ANVISA não descadastra o medicamento por conta de registro histórico do mesmo. Deste

modo, a relação de produtos contempla os revalidados, os de situação regular no mercado, aqueles cujo registro caducou e outros com o registro cancelado.

No total de 52 produtos registrados na ANVISA foi observado que *P. incarnata*, como fitoterápico simples, contribui com o mesmo percentual que *P. alata* associada a outras substâncias (figura 7), e praticamente o mesmo ocorre quando em associação. O percentual referente a outros é devido a não especificação da *Passiflora* empregada na formulação. O registro de produtos utilizando fitoterápicos em associação requer comprovação dos benefícios trazidos por esta composição e avaliação do risco / benefício (NASCIMENTO *et al.*, 2009), assim como a utilização de *P. alata* como substituinte da *P. incarnata*. Apesar de *P. alata* estar inscrita na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), esta espécie vegetal não consta na lista das existentes na legislação de registro simplificado de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2008a).

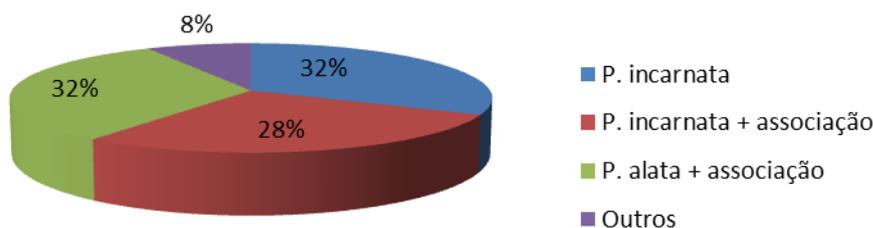


Figura 7: Número de medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA que empregam espécies de *Passiflora*.

1.4. Produtos Comercializados no Brasil

Os produtos e apresentações encontrados comercialmente e disponibilizados em sítios eletrônicos dos fabricantes, dos estabelecimentos de venda (farmácias e drogarias), da Receita Federal e do Diário Oficial da União estão apresentados também no anexo (página 79). A busca foi feita utilizando como palavra-chave <*Passiflora*>, a qual retornou indicando o *status* atual dos produtos, acusando inclusive se algum produto apresentava alguma restrição sanitária, como interdição, suspensão, cancelamento, ou não foi encontrado.

Apesar de 52 produtos constarem na relação de fitoterápicos contendo *Passiflora*, apenas 32 produtos são comercializados no País em duas principais especialidades farmacêuticas. Essa diferença se deve ao fato de constarem todos os produtos registrados, não

diferenciando comercializados daqueles que não estão mais no mercado (figuras 8 e 9). Associado ao fato de 68% representarem produtos não enquadrados na IN 5 / 08 (figura 7), e ainda 29 produtos serem apresentações na forma sólida (figura 9), foi observada pouca diversificação nas opções de escolha, o que torna interessante um fitoterápico a base de *P. incarnata* que atenda aos requisitos da IN 5 / 2008 e que apresente um diferencial no leque de opções disponível.

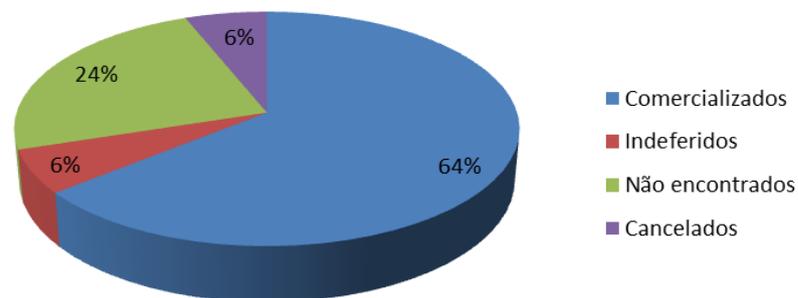


Figura 8: Fitoterápicos a base de *Passiflora* comercializados no Brasil.

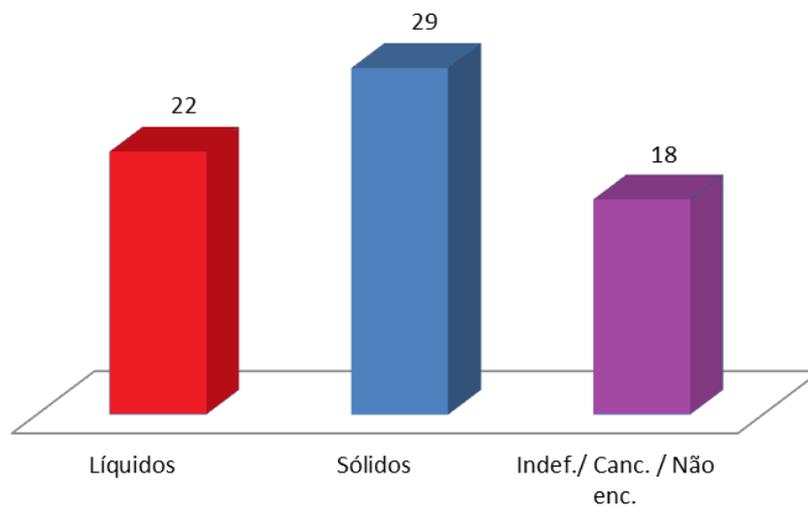


Figura 9: Principais especialidades farmacêuticas de fitoterápicos a base de *Passiflora*.

1.5. Propriedade Intelectual e Patentes no Brasil

Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (Acordo TRIPS, na sigla em inglês) estabeleceu os atuais padrões de proteção de propriedade intelectual no mundo. Ele entrou em vigor no dia primeiro de janeiro de 1995 e é obrigatório para todos os países membros da Organização Mundial do Comércio (OMC).

O Acordo TRIPS estabelece padrões mínimos no âmbito do direito internacional relacionados às patentes, incluindo aquelas de medicamentos. Países membros da OMC concordaram com certos padrões comuns na forma de elaboração e implementação de legislações patentárias. Estes padrões incluem, entre outros, que as patentes devem ser concedidas durante um período mínimo de vinte anos, que as patentes podem ser concedidas para produtos e processos e que informações de testes de medicamentos podem ser protegidas contra o “uso comercial desleal”. No Brasil, a Lei de Propriedade Intelectual (BRASIL, 1996) exclui de patenteabilidade todas as plantas e animais, ou partes deles, exceto microorganismos transgênicos que satisfaçam os requisitos de patenteabilidade (novidade, atividade inventiva e aplicação industrial), e aquelas que não se constituam em meras descobertas.

Desta forma, a legislação brasileira não permite a patenteabilidade de extratos vegetais. No entanto, são patenteáveis os processos para a obtenção de extratos ou para isolar substâncias ativas a partir de plantas, composições farmacêuticas e seus processos de preparação, e mesmo outros usos de produtos obtidos a partir de plantas.

Com vistas ao disposto, buscou-se no sítio eletrônico do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), como palavras-chave <*Passiflora incarnata*>; <*xarope de Passiflora*> e <*xarope dietético de Passiflora*>, no campo de busca “Título” (BRASIL, 2013b). Os resultados retornaram para a primeira e segunda pesquisas, mas para a terceira o retorno foi nulo, indicando não haver até este momento, qualquer depósito ou pedido de depósito para algum produto à base de *P. incarnata* em veículo ausente de sacarose. Para o segundo termo pesquisado, os resultados foram uma miscelânea de produtos alimentícios, material de embalagem, processos de fabricação de xaropes simples para uso alimentício, formulações de xaropes de ervas contendo broncodilatadores, dentre outros. Os resultados para o primeiro termo da pesquisa e que despertaram algum interesse estão apresentados na tabela 3. Vale a pena observar que a data do depósito é relativamente recente e que o título é

concernente tanto à obtenção de novos extratos, quanto de processos produtivos e de técnicas analíticas.

Tabela 1 – Relação de patentes depositadas no País.

PROCESSO	DEPÓSITO	TÍTULO
PI0816292-1	03/09/2008	Processo para a preparação de um extrato de planta <i>Passiflora alata</i> e uso do dito extrato em composições cosméticas e farmacêuticas.
PI0800544-3	01/02/2008	Tecnologia analítica baseada na pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa para caracterização e obtenção de compostos químicos a partir de extratos de <i>Passiflora alata</i> CURTIS secos por nebulização.
PI0602106-9	25/05/2006	Processo para preparação de um produto a base de <i>Passiflora incarnata</i> L., produto farmacêutico, composição farmacêutica, usos e método de tratamento de ansiedade e insônia.

Fonte: <http://formulario.inpi.gov.br>. A acessado em 2 de março de 2013.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um produto utilizando veículo isento de sacarose contendo o extrato fluido de *Passiflora incarnata* Linné.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Analisar morfológicamente espécies de *Passiflora*;
- ✓ Analisar físico-quimicamente as matérias-primas vegetais comerciais a base de *Passiflora incarnata*;
- ✓ Estabelecer perfil cromatográfico das amostras de matéria-prima e produtos;
- ✓ Analisar o marcador químico na matéria-prima e no produto;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimental

3.1.1. Equipamentos

As balanças analíticas Gehaka[®] AG 200 (capacidade 200 g e precisão de 0,1 mg) e a Shimadzu[®] AX 200 (capacidade 200 g e precisão de 0,1 mg) foram utilizadas na pesagem dos extratos, produto, substâncias de referência e dos padrões comerciais utilizados para a preparação das soluções estoque.

O potenciômetro Quimis[®] Q-400A com eletrodo combinado de vidro QA 338-ECV (Ag/AgCl), faixa 0 – 14 e temperatura de 0 – 80°C, foi utilizado nas medições de pH dos extratos e produtos.

A centrífuga Hettich[®] Zentrifugen 2070 (RPM máximo de 15000 U / min) foi utilizada na separação em frações aquosa, hidrometanólica e metanólica dos extratos fluidos.

A estufa de secagem Fanem[®] 315 foi utilizada na secagem dos extratos e para a determinação do peso constante. As amostras foram acondicionadas em dessecador de vidro e posteriormente pesadas.

O picnômetro com saída lateral, classe A, da Roni Alzi[®], de vidro, capacidade de 25,0 mL, calibrado, referência E478 e dotado de termômetro de vidro, Incoterm[®] (0 – 50°C) foi utilizado na determinação da densidade das amostras.

Liofilizador utilizado foi CHRIST Beta 1-16 LMC-2.

O evaporador rotatório utilizado foi o BÜCHI Rotavapor R-114, com sistema BÜCHI de controle de vácuo V-800 Vac[®] V-513, banho circulante BÜCHI B-740 e banho de água BÜCHI *Waterbath* B-480 na temperatura de 30 °C.

O espectrofotômetro UV/VIS utilizado foi o Shimadzu, modelo UV-1601 PC – UV/Vis, *software* UVPC versão 3.7 / 1994. Cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico e 45 mm de altura, volume de 3,5 mL e duas facetas polidas, foram utilizadas para a obtenção das medições de absorvância.

Placas cromatográficas da marca Alugram® SIL G/UV254 com 0,20 mm de espessura.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado ao DAD utilizado foi o Shimadzu Class vp, equipado com duas bombas SIL-10ADvp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, injetor automático SIL-10ADvp, forno de coluna CTO-10Avp e controladora SCL-10Avp. A coluna utilizada foi Eclipse Plus C18, 5 µm, (150 x 21 mm de diâmetro, Agilent).

O cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas utilizado foi Shimadzu – Diode Array Detector (DAD), modelo SPD-M20A Prominence; forno NEXERA CTO-30^a. A coluna utilizada foi KINETEX C18 (Phenomenex) com partícula de 2,6µm, com dimensões de 100 x 3,0 mm. Duas bombas LC30AD, NEXERA. Amostrador SIL-30AC NEXERA Auto Sampler; *Software Lab Solutions*. Espectrofotômetro de massas da Waters, modelo Micromass ZQ 4000; software MASS LYNX 4.0.

3.1.2. Padrões, Soluções e Reagentes

Os solventes utilizados ácido fórmico (HCOOH), metiletilcetona e acetato de etila foram obtidos da VETEC (São Paulo, Brasil). Acetonitrila e metanol grau cromatográfico foram obtidos da Tedia (São Paulo, Brasil). As soluções aquosas utilizadas na CLUE foram preparadas com água Milli-Q.

Os padrões vitexina, rutina e hiperosídeo foram obtidos da Carl Roth (Alemanha).

Os reagentes dos reveladores NP/PEG (solução metanólica com 1% de 2-aminoetildifenilborinato (p/v) + solução etanólica com 5% de polietilenoglicol) foram obtidos da Sigma Aldrich®. O revelador químico Dragendorff foi preparado de acordo com Wagner & Bladt (1995) com subnitrito de bismuto (sigma), ácido acético e cloreto de sódio (Vetec).

A fase móvel utilizada na análise por CLAE e CLUE foi um gradiente decrescente de (A) solução 0,05% de HCOOH em (B) acetonitrila, sendo os solventes filtrados em membrana de 22 µm. O volume de amostra injetado foi de 10µL (CLAE) e 2 µL (CLUE) e o fluxo foi de 0,7 (CLUE) e 1 mL/min (CLAE).

3.1.3. Matéria-Prima e Material Vegetal

As amostras de matéria-prima foram obtidas por meio de doação de indústrias: dois extratos fluidos hidroalcoólicos (S e CF) e um extrato seco veiculado em maltodextrina (H).

Material vegetal rasurado de *Passiflora incarnata* de procedência alemã foi doado pela profª Silvana (Faculdade de Farmácia, UFRN) que trabalhou com essa espécie no doutorado. As demais espécies de *Passiflora* utilizadas na análise morfológica foram coletadas na reserva Ducke no estado do Amazonas. As excisas para comparação taxonômica estão no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Manaus).

3.1.4. Coadjuvantes Farmacotécnicos

No preparo das formulações farmacêuticas foram utilizados sacarina sódica, propilenoglicol, metilparabeno e propilparabeno fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda, sorbitol em pó, fabricado pela Syral e fornecido pela Vogler Ingredientes Ltda, carboximetilcelulose de sódio, fabricado pela Murta Especialidades Químicas e fornecido pela Brazmo Bandeirante Química e aroma artificial de maracujá fornecido pela Borges Broemmé Aromas e Fragrâncias Ltda. Água foi purificada utilizando sistema de osmose reversa simples passo, Culligan®.

3.1.5. Determinação da perda por dessecação

O extrato (1 g) foi pesado em pesa-filtro chato, previamente dessecado durante 30 minutos em estufa a 100 - 105 °C e resfriado em dessecador. A amostra foi evaporada até seca em banho-maria e, em seguida, levada para estufa a 100 - 105 °C, por 2 horas, resfriada até a temperatura ambiente em dessecador contendo pérolas de sílica-gel e pesada em balança analítica. O procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante (variação do peso na qual duas pesagens consecutivas não diferiram em mais que 0,5 mg). O resíduo seco foi

calculado em porcentagem sobre a massa. A porcentagem de perda por dessecação é dada pela figura 10. Para o extrato seco, a amostra foi levada diretamente para a estufa até peso constante (BRASIL, 2010e).

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Figura 10: Equação do teor da perda por dessecação

Onde:

Pa = peso da amostra,

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

3.1.6. Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato fluido foi determinada por meio do picnômetro. A amostra foi transferida para o picnômetro, previamente pesado e com a temperatura ajustada para 20 °C, o excesso da amostra foi removida, e pesada. O peso da amostra foi obtido por meio da diferença de massa do picnômetro cheio, com água destilada, e vazio. A densidade relativa foi calculada determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. O extrato H por ser um sólido e tendo em vista que na etapa de formulação, esse extrato será dispersado em fase aquosa. Por essa razão, a densidade dessa amostra não foi mensurada.

3.1.7. Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico dos extratos S e CF foi analisado conforme procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010e). Cerca de 35 mL de cada extrato foram utilizados, e

igual medida de água destilada foi adicionada e, sob destilação, coletou volume correspondente a cerca de 2 mL, menor que o volume inicial das alíquotas. Após ajuste da temperatura dos destilados para àquela correspondente à da tomada das alíquotas, foi adicionada água até obter o volume de 35 mL. Após homogeneização, a densidade a 20°C dos líquidos de cada extrato foi determinada conforme de descrito acima. A porcentagem foi determinada através de sua comparação com a densidade, em volume de etanol, contido nos extratos pela Tabela Alcoométrica, constante do anexo da Farmacopéia Brasileira.

3.1.8. Preparo de frações a partir dos extratos brutos e produtos para CCD

3.1.8.1. Extratos brutos

O Ext. H (25 g) foi dissolvido em 100 mL de água destilada e centrifugado durante 20 minutos, a 3800 rpm. A fração aquosa foi separada e liofilizada. Alíquotas de 4,0 mL dos Ext. S e CF foram levadas à secura em evaporador rotatório. Os resíduos foram ressuspensionados em metanol e transferidos para frascos limpos e mantidos sob exaustão para a completa evaporação do metanol. Cerca de 2,0 mL de água destilada foram adicionados para a ressuspensão. Após centrifugação durante três minutos, sob 15000 rpm, os sobrenadantes de coloração castanha foram recolhidos para frascos e identificados como fração aquosa.

Os precipitados dos Ext. S, CF e H foram ressuspensionados em 2,0 mL de uma solução metanol/água, (1:1), homogeneizados e levados a segunda centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes, de coloração castanho claro, foram recolhidos para frascos e identificados como fração metanol/água (1:1), sendo os precipitados remanescentes ressuspensionados em 2,0 mL de metanol, homogeneizados e levados a terceira centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes, de coloração verde, foram recolhidos para frascos e identificados como fração metanólica. O resíduo final foi descartado. As frações obtidas pela centrifugação foram identificadas e aplicadas em cromatoplaça de gel de sílica.

3.1.8.2. Produtos

As amostras das formulações farmacêuticas foram preparadas pela adição de uma alíquota de 4,0 mL de cada em igual volume de água, perfazendo uma diluição na proporção de 1:1. Após centrifugação durante três minutos, sob RPM 15000 U/min, os sobrenadantes das formulações farmacêuticas S e H foram recolhidos para frascos e identificados como fração aquosa. A formulação CF não apresentou separação de fases e foi utilizado o produto sem diluição. Os precipitados S e H foram ressuspensos em 2,0 mL de uma solução metanol/água, (1:1), homogeneizado e levado a segunda centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram recolhidos para frascos e identificados como fração metanol/água (1:1), sendo os precipitados remanescentes ressuspensos em 2,0 mL de metanol, homogeneizados e levados a terceira centrifugação, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram recolhidos para frascos e identificados como fração metanólica. Os resíduos finais foram descartados.

3.1.9. Análises no espectrofotômetro UV/VIS

3.1.9.1. Extratos

Uma alíquota de 1,0 mL dos extratos S e CF, representando a concentração teórica de 9,50 mg de vitexina /mL de extrato fluido e 0,50 mg de vitexina /mL de extrato fluido de acordo com o laudo dos fornecedores, respectivamente, foram centrifugadas a 15000 rpm, durante 3 minutos, seguido da diluição de cada uma para 50 mL de etanol 50 % (v/v). Cerca de 0,1 g do extrato H foi pesado, com concentração teórica de 25 mg de vitexina /g de extrato seco, e também diluído em 50 mL de etanol 50 % (v/v). Estas soluções foram identificadas como solução estoque (SE). As soluções branco (SB) receberam 10,0 mL de SE e as soluções teste (ST) receberam 10,0 mL de SE e 10,0 mL de solução de AlCl_3 2% (p/v) em solução etanólica 50%. Todas as SB e ST foram diluídas em 100 mL de etanol 50% (v/v) (figura 29).

Após 30 min do preparo das amostras, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro por varredura na faixa de 200 a 600 nm.

3.1.9.2. Produtos

As soluções das formulações farmacêuticas para quantificação foram preparadas a partir 5,0 mL do ED S e diluição em 25 mL de metanol a 70% (v/v). Uma alíquota de 5,0 mL foi retirada dessa diluição, 1,0 mL de solução de AlCl_3 5% em metanol a 70% foi acrescentada e a mistura resultante foi diluída até 50 mL com metanol a 70% (v/v). Uma alíquota de 10,0 mL do ED. CF foi retirada e diluída até 25 mL com metanol a 70% (v/v). Em uma alíquota de 2,0 mL dessa diluição foi acrescentada 1,0 mL de solução de AlCl_3 5% em metanol a 70% e a mistura foi diluída até 50 mL com metanol a 70% (v/v). O mesmo procedimento foi repetido para o ED. H. A leitura no espectrofotômetro a 425 nm foi realizada após 30 min de adição do agente complexante (AlCl_3). O teor de flavonóides totais foi calculado por meio da equação da reta obtida utilizando a rutina como padrão de referência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Matéria-Prima Vegetal

4.1.1. Descrição Macroscópica

Passiflora incarnata é uma espécie vegetal exótica no País, não havendo menção sobre o cultivo em escala comercial, de folhas ou frutos, no Brasil (REIMBERG, M.C.H., 2006). Durante a busca por fornecedores no País, por meio de fornecimento comercial ou doação por entidades públicas ou particulares para o desenvolvimento desta dissertação,

foram recebidas folhas de outras espécies de *Passiflora*, as quais foram submetidas à análise morfológica para comparação com *P. incarnata*, cujo exemplar foi recebido na forma de material rasurado. Verificou-se inicialmente a diversidade do formato entre as folhas das espécies *P. edulis* Sims (exsicata n° EAFM 225), *P. nitida* Kunth (exsicata n° EAFM 541), *P. pedata* L. (exsicata n° EAFM 876) e *P. quadrilandulosa* Rodschied (exsicata n° EAFM 375) (figura 11). Essas espécies foram coletadas na cidade de Manaus, em 2012.

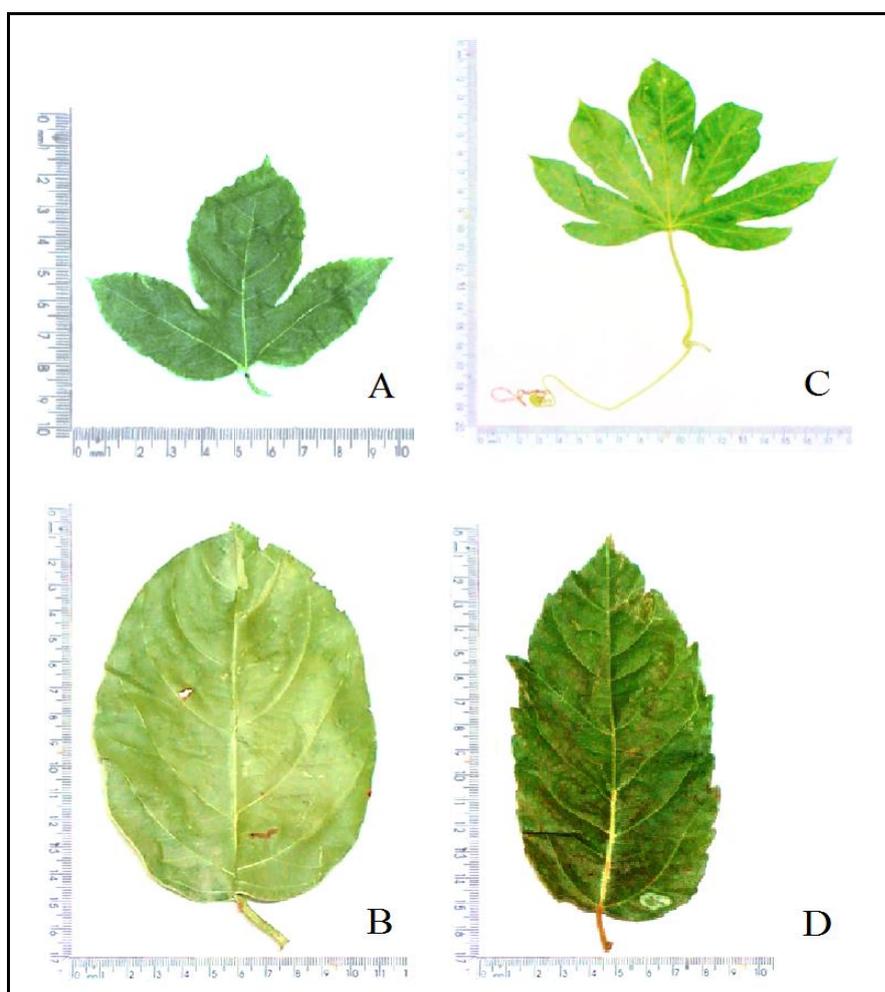


Figura 11: Foto das folhas em face adaxial de *P. edulis* Sims (A), *P. nitida* Kunth (B), *P. pedata* L. (C) e *P. quadrilandulosa* Rodschied (D). Fonte: Arquivo pessoal.

P. edulis Sims (fig. 11A) foi coletada em ambiente ensolarado, sob cultivo e conduzida em arame galvanizado, em latossolo amarelo. A espécie se encontrava em plena produção. *P. edulis* Sims tem descrição macroscópica inscrita na Farmacopéia Brasileira (2010e), cujo exemplar foto apresentou folha simples glabra, de cor verde clara. Lâminas

profundamente divididas em três lobos, tendo o lobo central 7,0 cm por 3,5 cm (comprimento x largura) e os laterais, 5,5 x 2,5 cm (comprimento x largura). Ápice acuminado e margem serrilhada. Pecíolo com 1,5 cm de comprimento com um par de nectários extraflorais.

P. nitida Kunth descrita em Cervi (1997), (fig. 11B), foi coletada em área de capoeira, no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em solo areno-argiloso, a pleno sol e sobre outras plantas de pequeno porte. A espécie apresentava produção de flores e frutos. O exemplar apresentou folha ovado-oblonga, de 12 - 14 x 9 - 10 cm (comprimento x largura), aguda no ápice, arredondada na base, ondulado-denticulada no bordo, lustrosa em ambas as superfícies, penínérvea. Bráctea oblongo-ovada, de 3,5 x 2,5 cm, arredondada na base e no ápice. Pecíolo de 2,5 cm de comprimento, com um par de glândulas sésseis na base da lâmina foliar.

P. pedata L., também descrita em Cervi (1997), (fig. 11C), estava sob cultivo, tutorada em arame galvanizado em terreno do IFAM, a pleno sol. Esta espécie é de rara ocorrência e as sementes foram coletadas no município de Manicoré, Amazonas, e estava sendo cultivada para produção de frutos e sementes para distribuição pelo IFAM. O exemplar apresentou folhas compostas de três partes. O folíolo central, oblongo, de 9 x 2,5 cm (comprimento x largura), simples e inteiro. Ápice acuminado e afilando-se para a base. Os folíolos laterais, formados de 3 partes desde a base, (cada segmento, oblongo) ligeiramente menores que o folíolo central. Brácteas em número de três, oblongas a ovadas, de 6 x 4,5 cm (comprimento x largura). Pecíolo de 6 cm, com um par de glândulas estipitadas na base da lâmina foliar e outro par abaixo da metade do pecíolo. Gavinha de 13 cm de comprimento.

P. quadriglandulosa Rodschild (fig. 11D), descrita em Cervi (1997), foi coletada em área de capoeira, no terreno do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, IFAM, crescendo à sombra, em solo areno-argiloso e não apresentava fruto. O exemplar apresentou folha simples, polimórfica, oblongo-lanceolada de 15 x 7,5 cm (comprimento x largura) e margem irregularmente denteada. Pecíolo de 1,5 cm de comprimento, com um par de nectários extraflorais na base da lâmina foliar.

4.1.2. Descrição Microscópica

As drogas vegetais foram submetidas à análise histológica para comparação de suas principais estruturas. A análise de *P. incarnata* revelou as características concordantes para a espécie. A figura 12 apresenta a foto em secção transversal da nervura central, de contorno biconvexo, com protuberância acentuada de contorno arredondado no lado adaxial, revestida por tecido epidérmico, apresentando tricomas tectores longos, pluricelulares, agudos no ápice e internamente preenchida por colênquima angular. O parênquima fundamental apresentou numerosas drusas de oxalato de cálcio e amido. Os feixes vasculares colaterais ocupam a região central. O mesofilo dorsiventral apresentou um estrato de células paliçádicas e parênquima lacunoso com drusas de oxalato de cálcio e idioblastos taníferos. O revestimento epidérmico possui tricomas tectores de uma a três células no lado abaxial (figura 12). Em secção longitudinal (figura 13), as células epidérmicas apresentaram paredes sinuosas e estômatos anomocíticos.

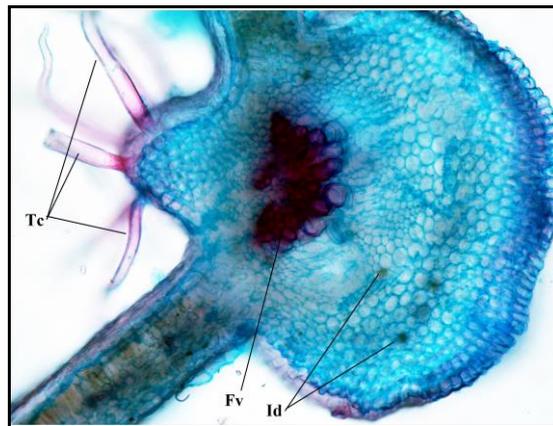


Figura 12: Foto de *P. incarnata* L. em secção transversal da nervura central apresentando idioblastos (Id), feixes vasculares (Fv), tricomas tectores multisseriados (Tc). Fonte: Arquivo pessoal

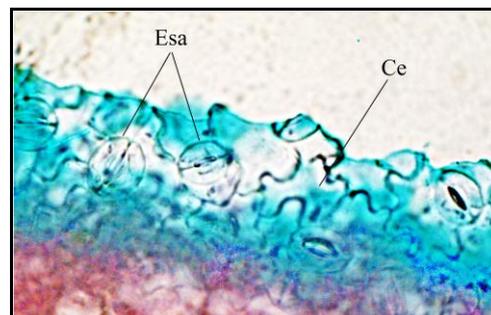


Figura 13: Foto de *P. incarnata* L. em secção longitudinal da nervura central com estômatos anomocítico (Esa) e células epidérmicas de paredes sinuosas (Ce). Fonte: Arquivo pessoal

Em comparação à *P. incarnata* L., foram preparados cortes histológicos das demais espécies de *Passiflora* recebidas. *P. edulis* Sims (figura 14), apresentou o mesofilo dorsiventral, com uma camada de parênquima paliçádico e várias camadas de parênquima lacunoso, revestido de ambos os lados por epiderme unisseriada, com tricomas tectores unicelulares, curtos, retos e estômatos anomocíticos e paracíticos somente no lado abaxial. Em secção transversal, a nervura central apresentou contorno biconvexo, com a convexidade acentuada e arredondada, do lado adaxial, contendo tricomas tectores semelhantes aos encontrados no mesofilo. Esta região está preenchida internamente por colênquima angular. Da região externa para a interna da nervura foram observados sequencialmente: colênquima angular, parênquima fundamental com drusas de oxalato de cálcio e vários conjuntos de feixes vasculares colaterais no centro. Em secção paradérmica (figura 15), as células epidérmicas apresentam paredes ondeadas, com estômatos anomocíticos e paracíticos.

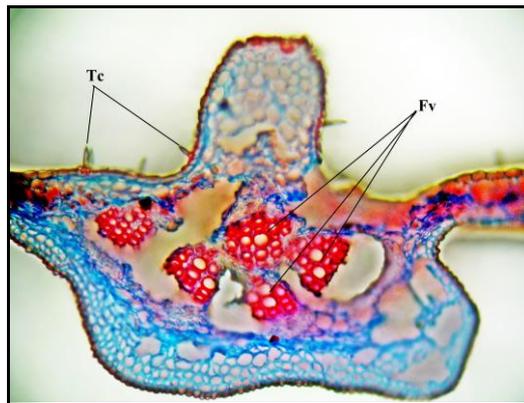


Figura 14: Foto de *P. edulis* Sims em secção transversal da nervura central com tricomas tectores unicelulares (Tc) e feixes vasculares (Fv). Fonte: Arquivo pessoal

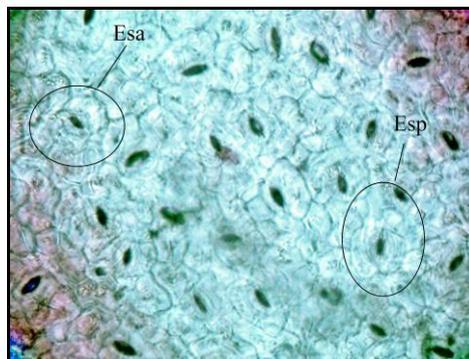


Figura 15: Foto de *P. edulis* Sims em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes ondeadas e estômatos anomocíticos (Esa) e paracíticos (Esp). Fonte: Arquivo pessoal

P. pedata L. (figura 16) apresentou, em secção transversal, na região adaxial nervura central biconvexa uma protuberância muito acentuada, de contorno aproximadamente cônico, e revestida por epiderme com tricomas tectores unicelulares curtos e retos. Internamente, esta região está ocupada por colênquima angular. Este tecido, também presente na região abaxial da nervura, no formato lamelar, é seguido de parênquima fundamental desenvolvido, onde estão situados idioblastos com drusas de oxalato de cálcio e amido. Os feixes vasculares colaterais (dois conjuntos dispostos em arco no lado inferior e dois menores acima) possuem do lado interno um parênquima medular. Em secção paradérmica (figura 17), foram observados numerosos estômatos paracíticos e células epidérmicas de paredes sinuosas. Verificou-se a existência de drusas de oxalato de cálcio ao longo das nervuras foliares (figura 18).

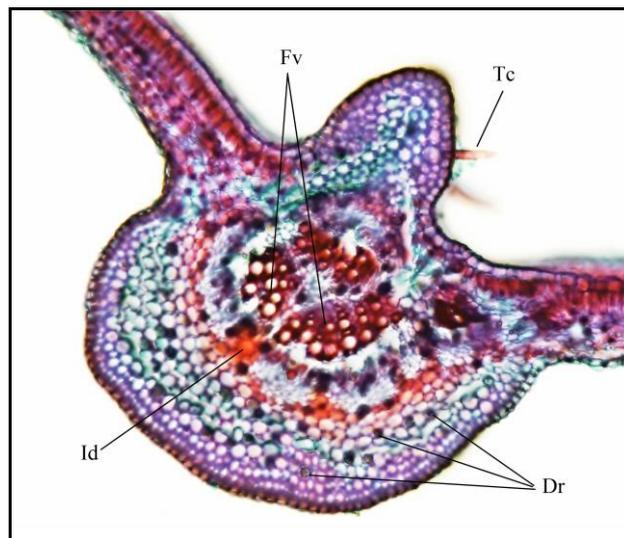


Figura 16: Foto de *P. pedata* L em secção transversal da nervura central com tricomas tectores unicelulares (Tc), feixes vasculares colaterais (Fv), drusas (Dr) e idioblastos taníferos (Id). Fonte: Arquivo pessoal

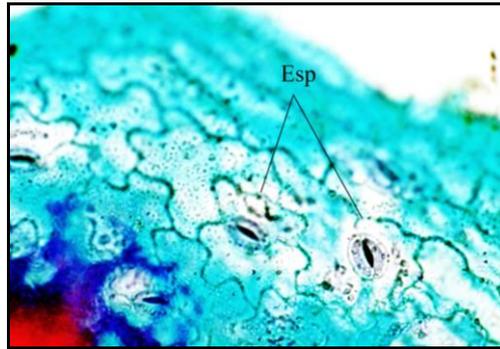


Figura 17: Foto de *P. pedata* L em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas e estômatos paracíticos (Esp). Fonte: Arquivo pessoal

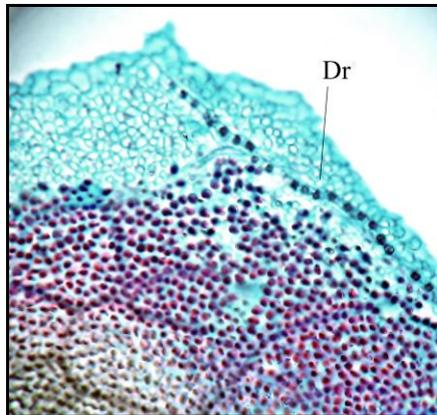


Figura 18: Foto de *P. pedata* L em secção paradérmica da nervura central indicando numerosas drusas (Dr) ao longo de feixe vascular. Fonte: Arquivo pessoal

P. quadriglandulosa Rodschild (figura 19) apresentou em secção transversal do limbo foliar na região da nervura central, (biconvexa), saliência de contorno suave do lado adaxial preenchida internamente por colênquima angular e com tricomas tectores pluricelulares, alongados, geralmente curvos (figura 20) no revestimento epidérmico, o qual era constituído por células retangulares, de paredes grossas, revestidas por cutícula espessa e estriada. Seguiu-se mais internamente o parênquima fundamental contendo idioblastos com drusas de oxalato de cálcio, taninos e grânulos de amido, periciclo fibroso descontínuo, espesso, e ocupando a região central os feixes vasculares colaterais. O mesofilo dorsiventral apresentou uma camada de parênquima paliçádico e vários estratos de parênquima lacunoso com numerosas drusas de oxalato de cálcio e grânulos de amido. A epiderme abaxial, com células de menores dimensões, apresentou estômatos anomocíticos e paracíticos, bem como numerosos tricomas, de aspecto semelhante àqueles descritos anteriormente. Em secção

paradérmica (figura 21), observou-se estômatos, anomocíticos e paracíticos, e células epidérmicas de aspecto sinuoso.

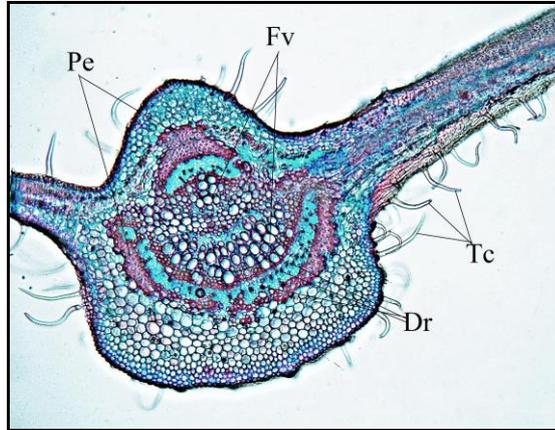


Figura 19: Foto de *P. quadriglandulosa* Rodschild em secção transversal da nervura central com tricomas tectores pluricelulares longos (Tc), periciclo fibroso e descontínuo (Pe), feixes vasculares colaterais (Fc) e numerosas drusas de oxalato de cálcio (Dr). Fonte: Arquivo pessoal

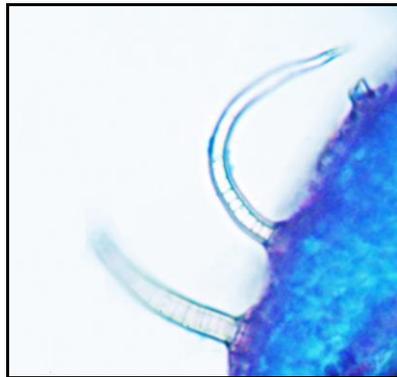


Figura 20: Foto de *P. quadriglandulosa* Rodschild em secção transversal da nervura central com tricomas tectores pluricelulares. Fonte: Arquivo pessoal

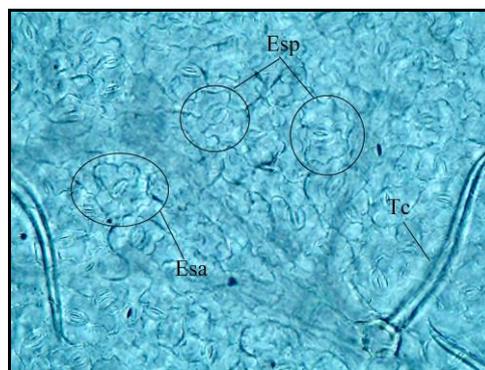


Figura 21: Foto de *P. quadriglandulosa* Rodschild em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas, estômatos paracíticos (Esp) e anomocíticos (Esa), e tricomas (Tc). Fonte: Arquivo pessoal

P. nitida Kunth apresentou em secção transversal da nervura central, de contorno biconvexo, uma saliência pouco proeminente do lado adaxial, ocupada internamente por colênquima angular. O revestimento epidérmico, glabro, mostrou células de contorno retangular, ou mais arredondado no lado abaxial. Amido, cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas e idioblastos taníferos foram observados ao longo do parênquima fundamental, onde na parte mais interna seguiu-se um tecido esclerenquimático que envolveu os feixes vasculares colaterais. A epiderme do lado adaxial apresentou células de contorno retangular de paredes grossas com cutículas espessas enquanto do lado abaxial, com células menores, apresentou estômatos anomocíticos e paracíticos. Na região do mesofilo verificou-se a presença de uma camada de células paliçádicas e parênquima lacunoso com drusas de oxalato de cálcio e amido (figura 22). Em secção paradérmica (figura 23) visualizaram-se numerosos estômatos anomocíticos e células epidérmicas de paredes sinuosas. Notou-se a ocorrência de drusas de oxalato de cálcio ao longo das nervuras foliares.

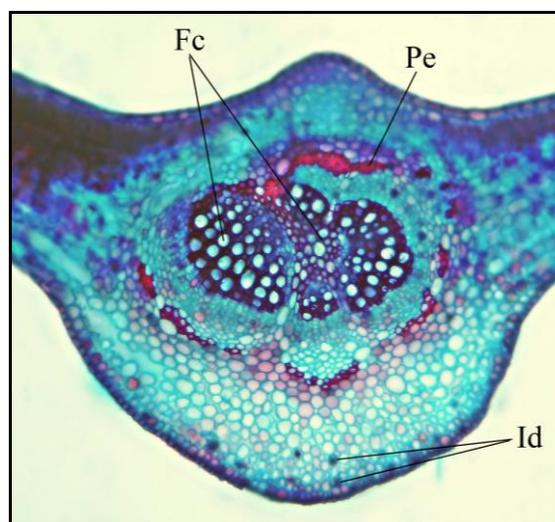


Figura 22: Foto de *P. nitida* Kunth em secção transversal da nervura central apresentando idioblastos (Id), periciclo (Pe) e feixes vasculares (Fc). Fonte: Arquivo pessoal

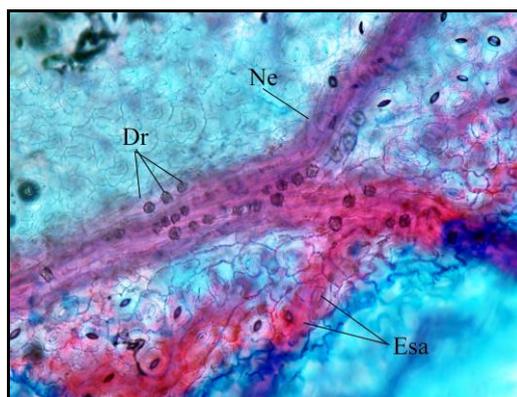


Figura 23: Foto de *P. nitida* Kunth em secção paradérmica da nervura central com células epidérmicas de paredes sinuosas, estômatos anomocíticos (Esa) e numerosas drusas (Dr) de oxalato de cálcio ao longo da nervura foliar (Ne). Fonte: Arquivo pessoal

A lacuna existente no cultivo brasileiro de *P. incarnata* L. resulta na importação das suas partes aéreas previamente secas para a interrupção de seus processos metabólicos e consequente estabilização dos princípios ativos existentes. O processo de secagem, e posterior manuseio, permite a fragmentação do material seco, que então é triturado fornecendo a droga vegetal rasurada e homogênea. A identificação das espécies de *Passiflora* é, desta forma, necessária para evitar adulterações do material analisado, assim como garantir a segurança e eficácia de uso da espécie correta. A comparação inicial entre as espécies recebidas demonstraram grande diversidade morfológica entre *P. pedata* L., *P. nitida* Kunth e *P. quadriglandulosa* Rodschied, contudo observou-se semelhanças entre *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L., pois ambas apresentaram folhas trilobadas. Porém são diferenciáveis pela análise histológica de suas principais estruturas. O material rasurado recebido como *P. incarnata* L. apresentou as principais estruturas descritas em *British Herbal Pharmacopoea* (1996). *P. edulis* Sims também apresentou aspecto morfológico condizente como descrito pela Farmacopéia Brasileira (2010e). Não obstante, não foi encontrada menção na literatura para a descrição microscópica das espécies *P. nitida* Kunth, *P. pedata* L. e *P. quadriglandulosa* Rodschied.

4.2. Especificações dos Extratos

A comercialização de extratos obtidos a partir da droga vegetal é vantajosa para a indústria sob vários aspectos, tais como a redução das etapas inerentes à fabricação do fitoterápico, da produção de resíduos para descarte, e simplificação da rota analítica do controle de qualidade. No entanto, um ponto importante a ser avaliado é concernente à padronização desse extrato comercialmente obtido.

Os extratos podem ser padronizados conforme a relação observada entre material vegetal e o extrato obtido, ou seja, quanto em peso foi inicialmente utilizado da droga vegetal seca para fornecer uma determinada massa de extrato seco. Geralmente, uma droga vegetal seca após a extração e filtração fornece um extrato líquido, que se for o objetivo final da extração, poderá ser uma tintura (de 10 a 20% em concentração) ou um extrato fluido (concentração de 100%). Se o extrato líquido for levado a resíduo seco por evaporação, fornecerá uma quantidade de material sólido, isento de excipientes, em torno de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5 a 50%, dependendo da solubilidade dos metabólitos presentes na espécie vegetal. Na proporção de 30%, a relação droga vegetal (D) / extrato (E) é de 3:1, significando que foram utilizados 3 quilos da droga para a obtenção de 1 quilo de extrato seco. Para a proporção de 50% de extrato seco, a relação D/E é de 2:1 e para a proporção de 5%, a relação D/E é de 20:1.

A padronização de uma matéria-prima pode ser feita utilizando o doseamento químico das substâncias, ou classe de substâncias, relacionadas aos efeitos terapêuticos ou, ainda, pela presença de substâncias majoritariamente presentes na espécie vegetal, conhecidas como marcadores da espécie (MARQUES, 2005; GREGÓRIO *et al*, 2006).

A droga vegetal escolhida para esta dissertação foi a espécie *P. incarnata* L., da família Passifloraceae. A primeira amostra de matéria-prima recebida dessa espécie vegetal foi um extrato fluido droga/extrato (D/E) de 1,5:1, cujo material vegetal utilizado na preparação foi cultivado na França e importado pela empresa S Indústria e Comércio, para o Brasil. O relato de preparo no laudo fornecido pelo importador foi extração hidroalcolica a 60%, por maceração das partes aéreas, folhas e talos. Ainda nesse laudo está escrito que o extrato foi padronizado para apresentar os teores de flavonóides totais a 0,800 %, no mínimo, expressos em vitexina. O extrato fluido obtido foi codificado como Ext. S.

A segunda amostra de extrato fluido na relação D/E de 0,02 – 0,04:1 foi fornecida pela CF Indústria e Comércio (Brasil), a qual relata que elaborou o extrato com droga vegetal cultivada no País. O processo de extração foi elaborado por maceração, seguida de percolação de suas partes aéreas (folhas e talos). O solvente da extração foi uma solução hidroalcolica a 60%. O extrato foi padronizado para apresentar os teores de flavonóides totais a 0,04 %, no mínimo, expressos em vitexina conforme laudo do fornecedor. Esse extrato fluido foi codificado como Ext. CF.

A terceira amostra foi fornecida pela H Indústria e Comércio, a qual importou a matéria-prima na forma de extrato seco de *P. incarnata* em maltodextrina, da Alemanha. Para obtenção desse material, as partes aéreas da droga vegetal foram extraídas com etanol a 60%. O extrato fluido obtido apresentou a relação D/E de 4-7:1. O extrato seco foi obtido na etapa seguinte após a adição de excipientes inertes, tais como sílica coloidal anidra e maltodextrina, seguida da secagem da mistura. Esse extrato seco foi padronizado com relação aos teores de flavonóides totais na faixa de 2,2 a 2,8%, expressos em vitexina e foi codificado como Ext. H.

Essas matérias-primas estão ilustradas na figura abaixo.

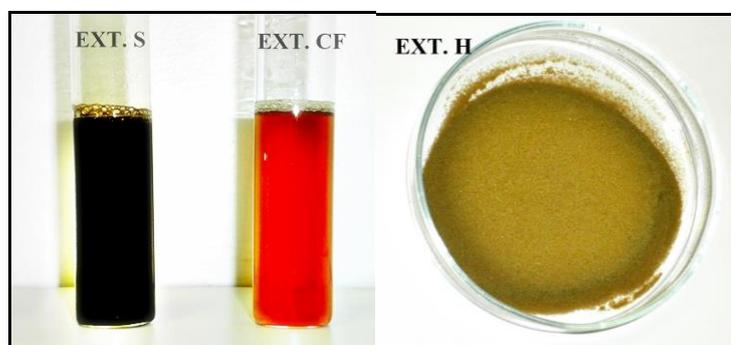


Figura 24: Foto comparativa dos extratos fluidos S e CF e do extrato seco H.

4.2.1. Determinação de pH

O pH das amostras líquidas foi determinado com o potenciômetro, por medição direta na amostra sem diluição, com três repetições consecutivas. Para o extrato seco, foram adicionados em 1,0 g da amostra, 10 mL de água destilada, perfazendo uma dispersão a 10%.

Os valores encontrados para as soluções estão apresentados na tabela 2 e mostraram que não há variações relevantes entre as matérias-primas.

Tabela 2 – Comparação dos valores de pH das soluções S, CF e H.

Solução	1ª duplicata	2ª duplicata	3ª duplicata	Média
S	5,60	5,59	5,60	5,60
CF	5,92	6,00	5,95	5,96
H (sol. 10%)	5,47	5,40	5,42	5,43

4.2.2. Determinação da densidade relativa

A densidade relativa do extrato fluido foi determinada por meio do picnômetro. A amostra foi transferida para o picnômetro, previamente pesado e com a temperatura ajustada para 20 °C, o excesso da amostra foi removida, e pesada. O peso da amostra foi obtido por meio da diferença de massa do picnômetro cheio, com água destilada, e vazio. A densidade relativa foi calculada determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. O extrato H por ser um sólido não foi analisado. As densidades obtidas estão listadas na tabela 3.

Tabela 3 – Comparação dos valores de densidade dos extratos.

Extrato	Densidade (g / mL)			Média
	1ª dup.	2ª dup.	3ª dup.	
S	1,0097	1,0097	1,0097	1,0097
CF	0,9719	0,9719	0,9718	0,9719

4.2.3. Determinação da perda por dessecação

Este ensaio se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza, fornecendo, dentre outras informações, a quantidade de sólidos totais dissolvidos e

foi realizado de acordo com o método apresentado na seção de materiais e métodos. Os valores, expressos em porcentagem, relativos ao resíduo seco estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Comparação dos valores de perda por dessecação dos extratos.

Extrato	Perda por dessecação (%)			Média
	1ª dup.	2ª dup.	3ª dup.	
S	84,2731	83,7101	85,8845	84,6225
CF	98,4345	98,7529	98,5746	98,5874
H	6,6132	6,8110	6,6132	6,6791

4.2.4. Determinação do teor alcoólico

Conforme o procedimento descrito em 3.1.7, com o resultado da densidade, a porcentagem foi determinada (tabela 5), em volume de etanol contido nos extratos pela Tabela Alcoométrica.

Tabela 5 – Teor alcoólico dos extratos.

Extrato	Densidade (g/mL)	Teor Alcoólico (%)
S	0,9654	28,7
CF	0,9732	21,9

4.2.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As primeiras tentativas de obtenção de um cromatograma em CCD foi realizada utilizando o método descrito na metodologia analítica para o extrato seco de *P. incarnata*, na *British Pharmacopoeia* 2009, versão CD ROM. O sistema de solventes preconizado pela farmacopéia utilizada foi uma mistura de ácido fórmico, água, metiletilcetona e acetato de etila (10:10:30:50) A cromatoplaça foi seca a 100 – 105 °C e revelada em lâmpada de UV a 365 nm. O resultado obtido por esse procedimento não foi satisfatório pois, o cromatograma

apresentou pouca separação entre as substâncias dos extratos S, CF e H examinados. Em seguida, outra fase móvel foi testada, proposta por Wagner e colaboradores (1984), composta de acetato de etila / ácido fórmico / ácido acético glacial / metiletilcetona / água (50:7:3:30:10). Concomitantemente, os extratos foram tratados conforme o item 3.1.8 a fim de se retirar prováveis interferentes, tais como clorofila e material particulado em suspensão.

O cromatograma obtido foi revelado com lâmpada UV e reagente NP/PEG. O flavonoide pesquisado em CCD foi a vitexina (figura 25) e as amostras foram relacionadas na tabela 6.

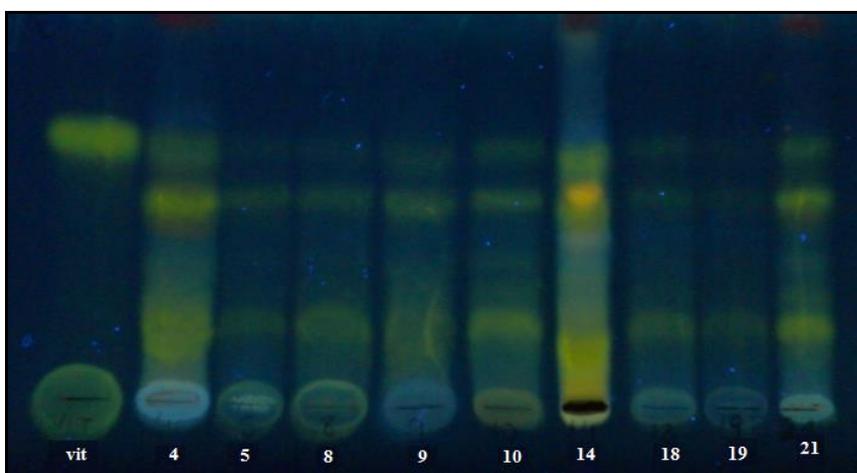


Figura 25: Cromatograma com o padrão vitexina e amostras dos extratos. Revelador solução NP/PEG e posterior visualização em lâmpada UV a 366 nm. Percurso de 5 cm.

Tabela 6 – Identificação das amostras

Amostra	Identificação
4	Formulação farmacêutica H bruto
5	Ext. seco H fração aquosa
8	Ext. bruto CF (liofilizado e ressuspenso em MeOH)
9	Formulação farmacêutica CF
10	Ext. bruto CF
14	Ext. bruto S
18	Ext. novo S
19	Formulação farmacêutica nova S
21	Extrato H (solução 10%)

No cromatograma obtido foram visualizadas manchas relacionadas ao padrão vitexina nas amostras aplicadas. Esse padrão é de interesse especial tendo em vista ser o marcador preconizado pela IN 5/08. Em paralelo a essa análise, os resultados das frações metanólicas provenientes da cromatografia líquida (CLAE) acoplada ao DAD sinalizaram a ausência de flavonóides nessas frações e elas não foram consideradas para análise por CCD.

A presença de alcaloides nas mesmas amostras foi pesquisada por CCD. A fase móvel utilizada foi clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (8,0:2,0:0,025), percurso de 5 cm. A figura 26 mostrou presença de manchas que após revelação com solução de Dragendorff, resultou na figura 27, indicando a presença de alcalóides claramente nas amostras 5, 8, 18 e 19.

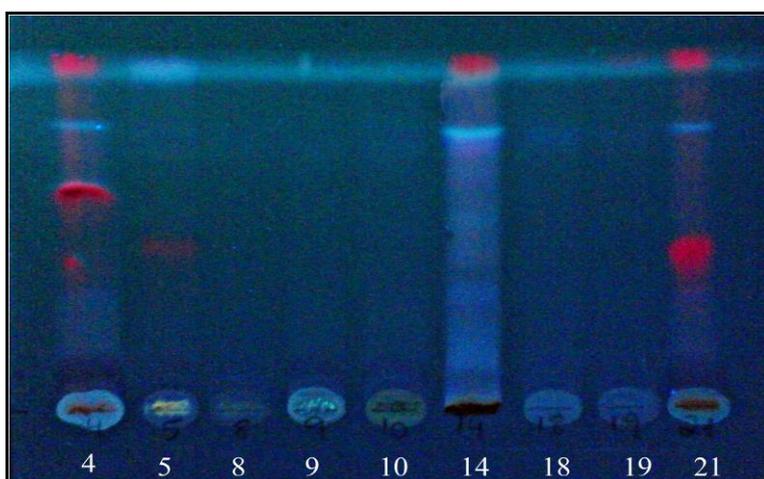


Figura 26: Cromatograma das amostras obtido após a eluição com clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (8,0:2,0:0,025). Visualização em lâmpada de UV a 366 nm.

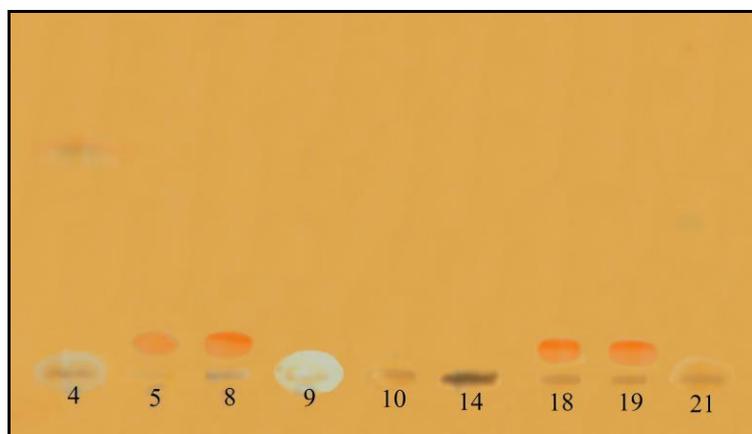


Figura 27: Cromatograma acima revelado com solução de Dragendorff.

Como a IN 5/08 preconiza a padronização em flavonóides totais expressos em vitexina, esses resultados fornecem dados preliminares da presença dessas substâncias e que a análise espectrofotométrica pode ser realizada com sucesso. Além disso, no estágio de desenvolvimento do produto para a seleção de fornecedores, é interessante buscar e eleger a matéria-prima com efetiva presença de vitexina.

4.2.6. Espectrofotometria Ultravioleta / Visível (UV / VIS)

De modo geral, os flavonóides são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado, conseqüentemente apresentando sistema conjugado de seus anéis aromáticos. Em função da conjugação, absorvem luz ultravioleta, apresentando duas bandas definidas. A banda I, de maior longitude, abrange a faixa de 300 a 550 nm e está associada à funcionalidade cinamoíla. A banda II a abrange a faixa de 240 a 285 nm e é devido ao anel aromático A (figura 28).

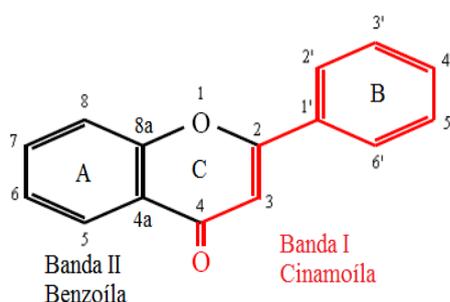


Figura 28: Estrutura geral dos flavonóides com indicação dos anéis aromáticos, numeração dos carbonos e indicação das bandas I e II.

A posição da banda I depende do tipo de flavonóide: flavonas apresentam na faixa de 310 - 350 nm, flavonóis 3-O-substituído em 330 - 360 nm e os flavonóis, de 350 - 385 nm. A presença de hidroxilas fenólicas em diferentes posições da molécula pode ser estabelecida estudando o comportamento do espectro na região do UV utilizando reagentes de deslocamento: metóxido de sódio (NaOMe), acetato de sódio (NaOAc), cloreto de alumínio (AlCl₃) com e sem HCl, e ácido bórico (H₃BO₃). A adição desses reagentes provoca o

chamado efeito batocrômico, o qual promove o deslocamento das bandas de absorção para um comprimento de onda maior devido a efeitos de substituição ou de solvente. Além disso, também podem ocorrer os efeitos hiperacrômico (aumento da intensidade da banda de adsorção) ou hipocrômico (diminuição da intensidade da banda de adsorção) (MARTINEZ, A. M., 2005).

O objetivo no deslocamento dessas bandas é o de evitar a interferência de outras substâncias que possuam absorção no mesmo comprimento de onda. Com a adição de AlCl_3 (com e sem HCl) e H_3BO_3 há a formação de quelatos. H_3BO_3 em meio alcalino forma quelatos com hidroxilas fenólicas na posição orto. Essa formação promove o deslocamento na banda I. Se o deslocamento é de 12 a 36 nm, trata-se de um flavonóide (flavona, flavonol, aurona ou chalcona) orto-hidroxilado no anel B. Se o deslocamento é menor, então é um flavonóide *orto*-diidroxilado no anel A. As isoflavonas, flavanonas e flavononóis *orto*-diidroxiladas no anel A mostram deslocamento batocrômico de 10 a 15 nm mas na banda II (figura 29).

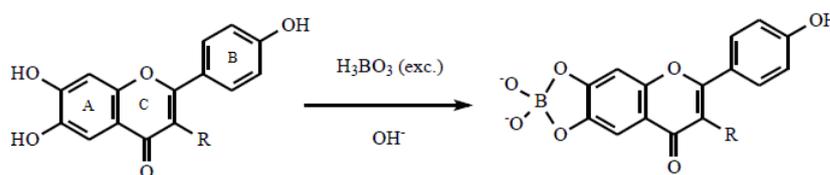


Figura 29: Representação estrutural do complexo formado entre H_3BO_3 e flavonóide. Adaptado de MARTINEZ, A. M., 2005.

A adição de AlCl_3 forma quelatos com flavonóides *orto*-diidroxilados, 3-hidroxilados e 5-hidroxilados. O quelato dos *orto*-hidroxilados é instável em pH ácido, enquanto que os quelatos de 3-hidroxilados e 5-hidroxilados são estáveis. Se o espectro de absorção com esse reagente em meio ácido mostra um deslocamento batocrômico de 35 a 55 nm na banda I (comparando com o espectro da substância em metanol), então se trata de uma flavona ou um flavonol 5-hidroxilado. Se o deslocamento é de 17 a 20 nm, pode-se tratar de uma flavona ou flavonol 5-hidroxilado e 6-oxygenado. Se o deslocamento é de 50 a 60 nm, trata-se de uma flavona ou flavonol 3-hidroxilado (com ou sem 5-OH) (MARTINEZ, 2005), (figura 30).

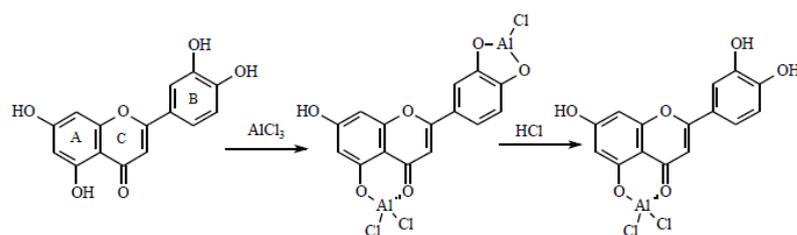


Figura 30: Representação estrutural do complexo formado entre AlCl_3 e flavonóide. Adaptado de MARTINEZ, 2005.

Deste modo, a pesquisa em compêndios oficiais, levou a metodologia descrita na Farmacopéia Britânica (2001) para a quantificação de flavonóides em *Passiflora incarnata*. Essa metodologia utiliza a formação de quelatos pela adição de H_3BO_3 e ácido oxálico, com leitura em 401 nm, sendo necessário na preparação de soluções teste e de compensação, o uso de evaporador rotatório e emprego de vários reagentes. A metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010e) baseia-se na formação de quelatos pela adição de AlCl_3 em etanol a 50% e leitura em 397 nm, não requerendo a utilização de evaporador rotatório e utilizando menor número de reagentes. Desta forma, essa metodologia foi aplicada para a análise dos extratos.

O procedimento foi utilizado com algumas modificações. Conforme descrito, o método emprega a droga vegetal que após refluxo de 60 minutos, resulta no extrato hidroalcoólico. A partir deste extrato, uma alíquota é retirada e AlCl_3 a 2% em etanol a 50% é adicionado, seguido de leitura após 30 minutos.

Pelo fato das amostras já serem extratos, a etapa de extração não foi necessária e o procedimento descrito no item 3.1.7.1 foi seguido (figura 31). Os espectros obtidos estão representados nas figuras 32, 33 e 34.

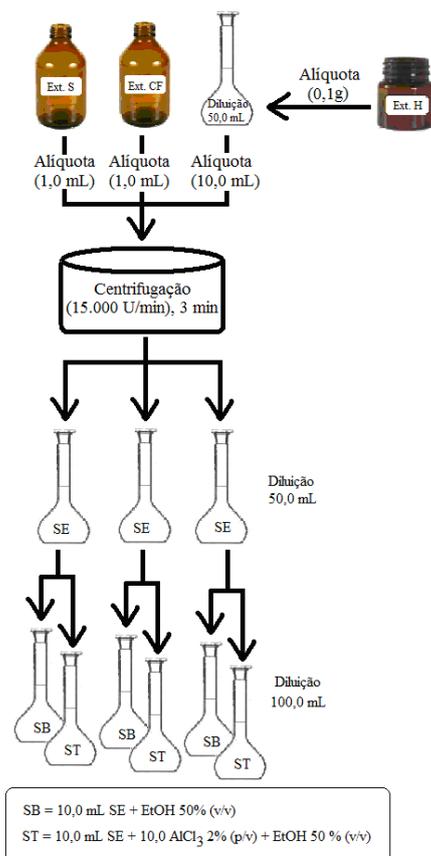


Figura 31: Fluxograma da preparação das amostras para reação de complexação AlCl₃ e os flavonóides das amostras.

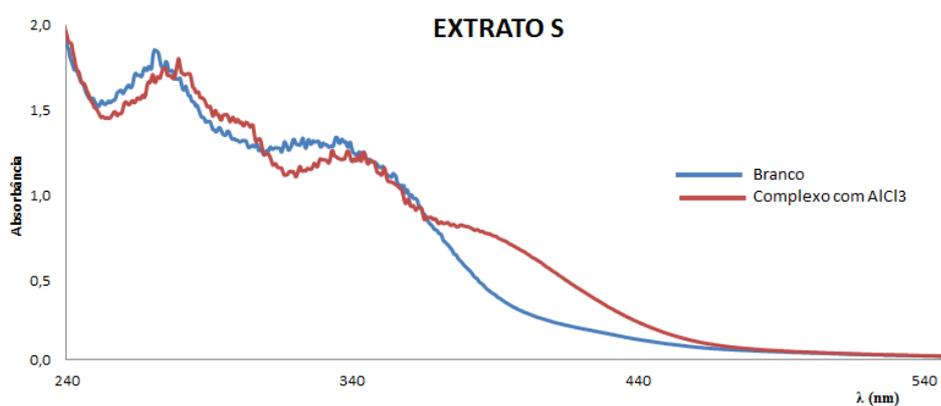


Figura 32: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na amostra Ext. S.

— - banda I (334,5 nm; Abs = 1,8541) e banda II (271 nm; Abs = 1,3423); — - banda I (344,0 nm; Abs = 1,2544) e banda II (279,5 nm; Abs = 1,8044).

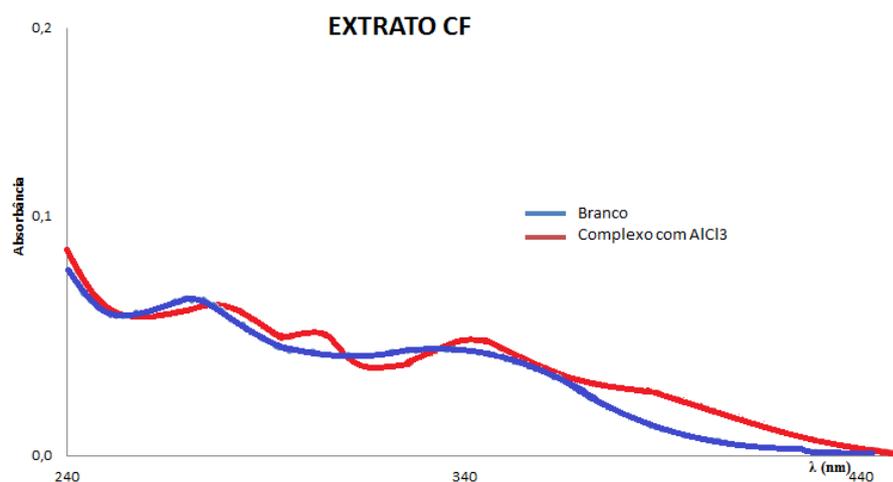


Figura 33: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides no extrato CF. — banda I (340,5 nm; Abs = 0,0502) e banda II (274,5 nm; Abs = 0,0658); — - banda I (343,0 nm; Abs = 0,0481) e banda II (277 nm; Abs = 0,0647).

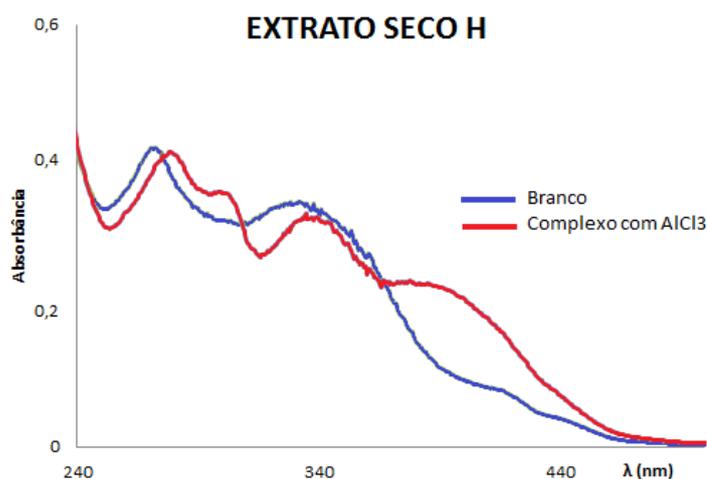


Figura 34: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides no extrato H. — banda I (332,5 nm; Abs = 0,3439) e banda II (271 nm; Abs = 0,4153); — - banda I (335,0 nm; Abs = 0,3291) e banda II (279,0 nm; Abs = 0,4105).

Conforme descrito anteriormente, visualizou-se o efeito batocrômico com o aumento do desvio do comprimento de onda e aumento da absorção nas três amostras. As diferenças quanto à magnitude da absorvância entre as amostras, está ligada diretamente a quantidade de flavonóides presentes na amostra e nas conseqüentes diluições adotadas. Apesar dos interferentes visualizados na figura 32, os sinais referentes às bandas I e II foram identificados.

A quantificação dos flavonóides nos extratos foi determinada por meio de uma curva de calibração, utilizando a rutina como padrão, procedendo diluições seriadas de 0,001 a 0,02 mg/mL. A escolha da rutina foi feita por ser um flavonol diglicosilado cuja estrutura química é próxima dos flavonóides glicosilados presentes na *Passiflora*. Além disso, apresenta dois sítios de ligação para complexação, aumentando a intensidade da cor formada pelo complexo com o flavonoide, enquanto a vitexina apresenta apenas um. Outro motivo está relacionado ao seu menor custo, comparando com a vitexina. A curva obtida está apresentada na figura 35.

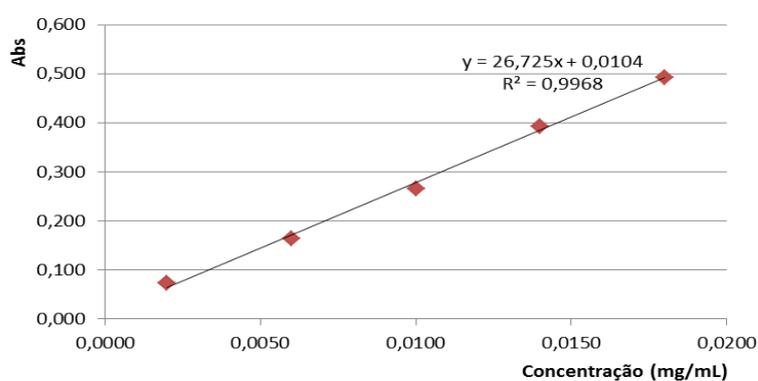


Figura 35: Curva de calibração elaborada com o padrão rutina.

A quantificação do teor de flavonóides totais foi calculado por meio da equação da reta obtida pela curva elaborada com o padrão rutina (figura 36), apresentando os resultados na tabela 7.

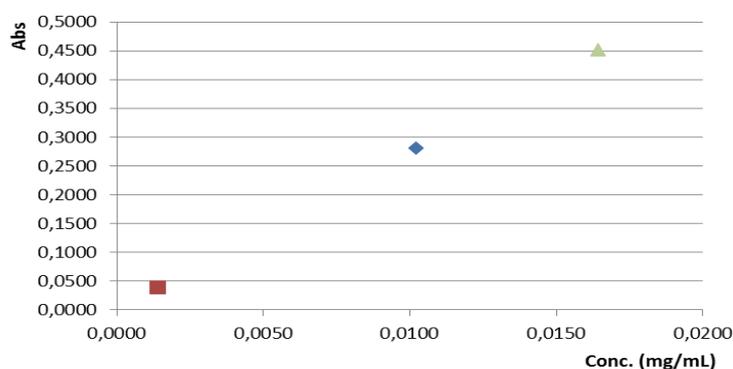


Figura 36: Concentração de flavonóides totais presentes nos extratos. ■ - Ext. CF; ◆ - Ext. H; ▲ - Ext. S

Tabela 7 – Teor de flavonóides totais expressos em rutina e vitexina

Extratos	Concentração (mg/mL)	Teor (%) Rutina	Teor (%) Vitexina
S	0,0164	0,4784	0,950
CF	0,0014	0,0189	0,050
H	0,0102	0,2975	2,50

Apesar do teor ser correspondente à quantidade de flavonóides totais expressos em rutina nos três extratos, foram observados valores diferentes em relação ao teor expresso em vitexina declarado pelos fabricantes. A metodologia aplicada mostrou que utilizando a rutina para quantificação, o extrato S forneceu o maior teor de flavonóides totais, possuindo uma maior quantidade de flavonóides que complexam igual ao padrão.

4.2.7. Análise por CLAE / DAD

Apesar da espectrofotometria na região do ultravioleta – visível (UV/VIS) ser uma técnica corrente para a detecção e quantificação de flavonóides totais em controle de qualidade, essa técnica não distingue as substâncias dentro das classes de flavonóides, por exemplo, os flavonóis vitexina e quercetina. Este processo de diferenciação pode ser realizado por meio de técnicas cromatográficas. Neste contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. Diferentes fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária. O detector mais frequentemente utilizado em CLAE é o espectrofotométrico (UV/VIS). Nesse caso, as substâncias de interesse tem que possuir grupamento cromóforo, como é o caso dos flavonóides.

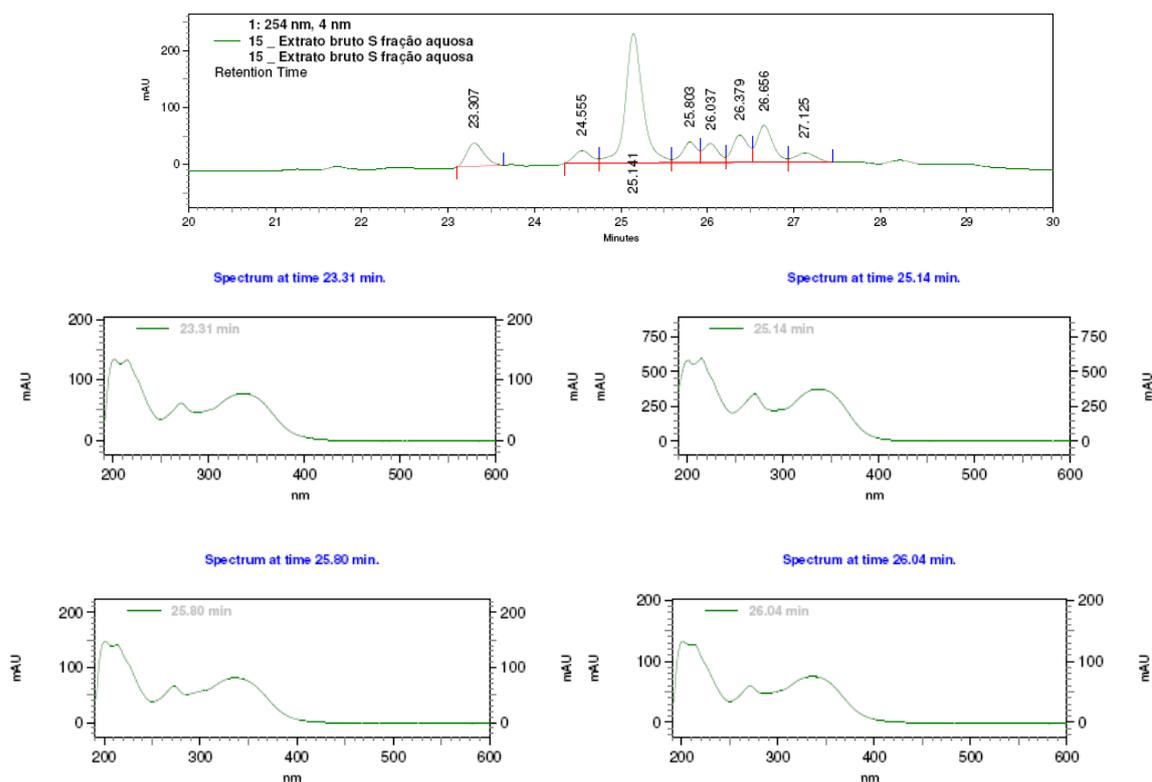
O detector de comprimento de onda múltiplo mede, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de

diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida por meio da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorbância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma (BRASIL, 2010e).

Desta forma, o sistema CLAE/DAD foi utilizado nessa primeira etapa do trabalho com o objetivo de delinear o perfil cromatográfico e identificar, utilizando os espectros UV característicos dos flavonóides, essas substâncias nas amostras (extratos e frações). O método utilizado foi um gradiente crescente de 0 a 65 minutos com acetonitrila em água com 0,05% de HCOOH, iniciando com 3% da fase ácida. Esse método desenvolvido para análise das amostras foi satisfatório e permitiu a visualização dos sinais referentes aos flavonóides quando os cromatogramas foram monitorados a 254 e 340 nm.

Todas as análises apresentaram no perfil cromatográfico sinais cujos espectros na região do ultravioleta foram característicos aos flavonóides. As figuras abaixo mostram os melhores perfis cromatográficos obtidos com as amostras analisadas (Ext. S aquoso, CF e H) em 254 e 340 nm, e respectivos espectros UV.

✓ Fração aquosa do extrato S:



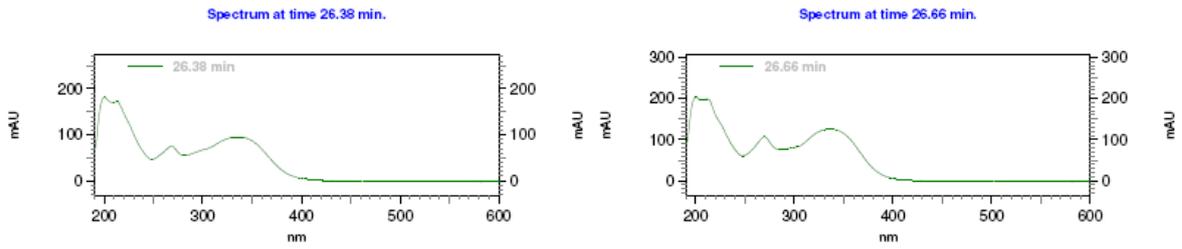


Figura 37: Cromatograma obtido por CLAE (254 nm) da fração aquosa do extrato S e os espectros UV característico dos flavonóides.

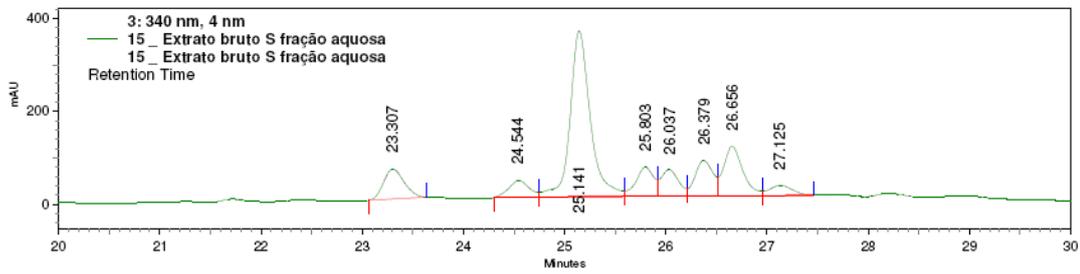
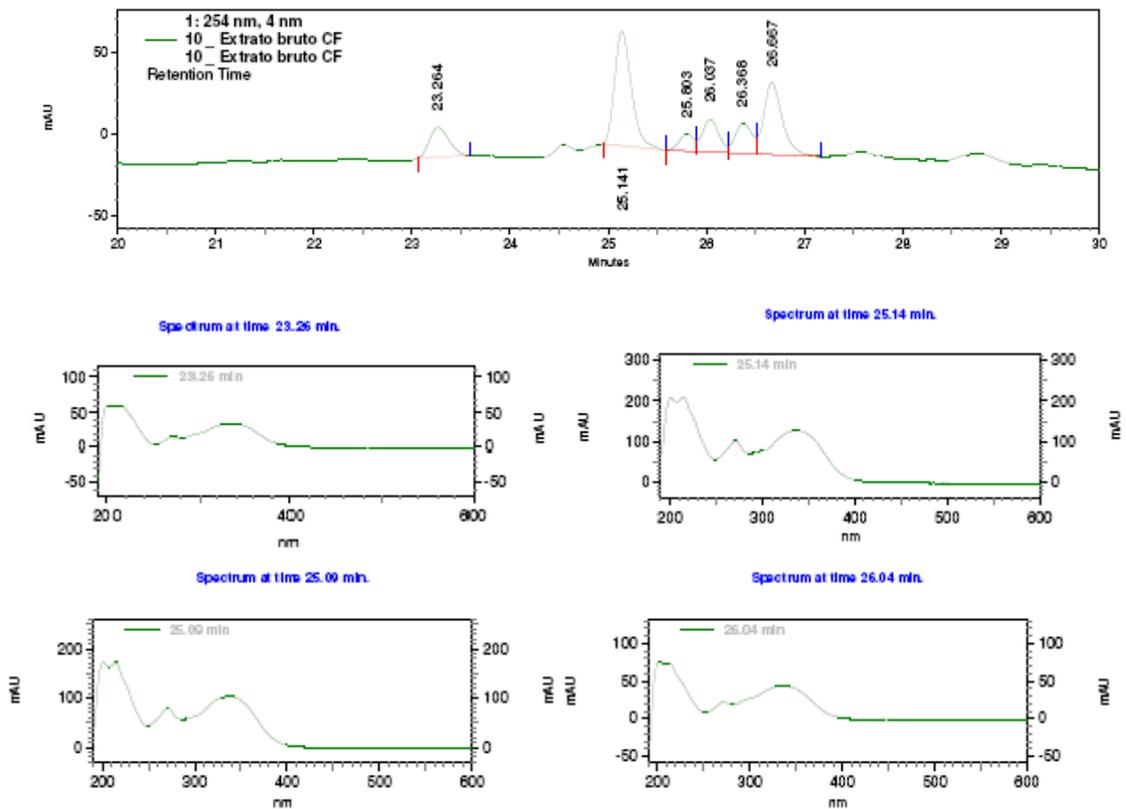


Figura 38: Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) da fração aquosa do extrato S.

✓ Extrato bruto CF:



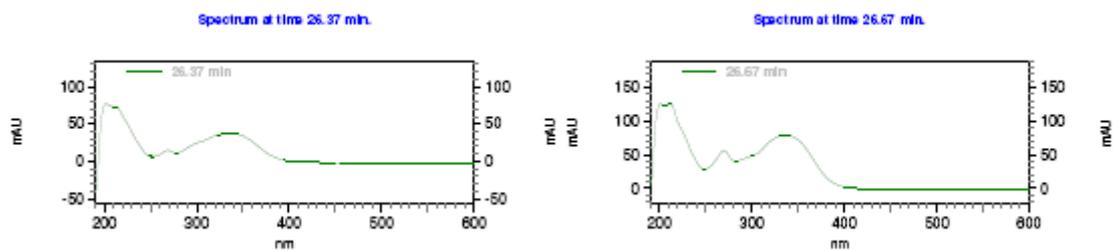


Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE (254 nm) do extrato CF e os espectros UV característico dos flavonóides.

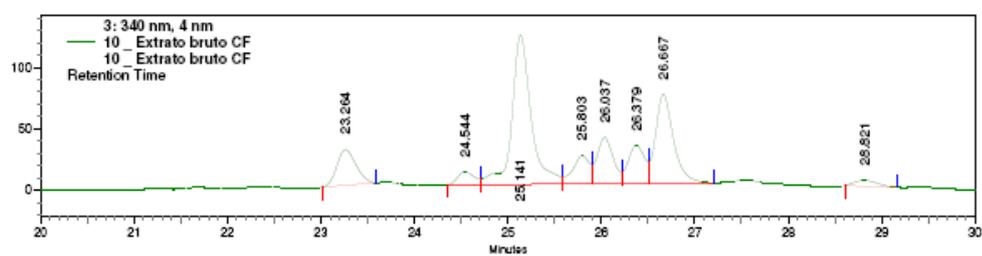


Figura 40: Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) do extrato bruto CF.

✓ Fração MeOH:H₂O do extrato H:

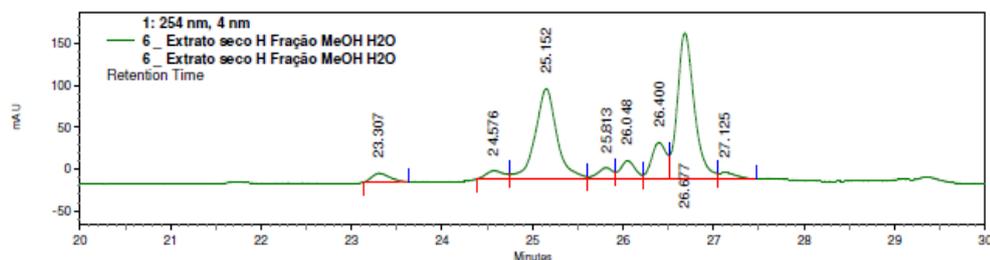


Figura 41: Cromatograma da CLAE (254 nm) da fração MeOH:H₂O do extrato H.

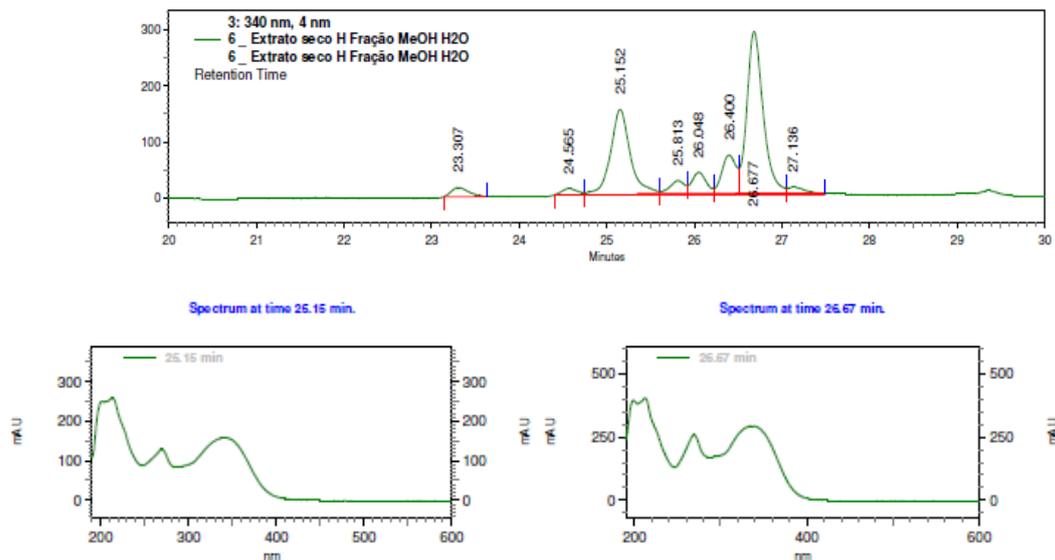


Figura 42: Cromatograma obtido por CLAE (340 nm) da fração MeOH:H₂O do extrato H e espectros UV característicos de flavonóides na amostra.

Os resultados obtidos nessa etapa foram utilizados para as análises por CLUE.

4.2.8. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Associada a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas (CLUE - DAD – EM)

Apesar da utilização crescente da CLAE acoplada ao DAD na avaliação de amostras de materiais vegetais, a efetiva identificação das substâncias é limitada, pois o CLAE - DAD fornece apenas o espectro UV-VIS característico de classes químicas de substância como informação, o que não é suficiente para a identificação de substâncias. Entretanto, a análise por cromatografia líquida associada a espectroscopia de massas (CL-EM) é uma ferramenta útil, a qual pode ser aplicada para a identificação e caracterização estrutural de biomoléculas, tais como os flavonóides (MARÇO & POPPI, 2008), combinando as vantagens da cromatografia líquida (alta seletividade e eficiência na separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA *et al*, 2008). Essa técnica se torna mais efetiva ainda com o uso de um padrão existente no extrato vegetal estudado.

A associação do CL com EM resulta em um cromatograma de massas, uma vez que os resultados são apresentados em um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrofotômetro de massas, chamado de cromatograma de íons totais – CIT (do inglês “total ion chromatogram” - TIC) ou apenas pelos íons de interesse produzidos por este. Este último pode ser obtido pelo monitoramento dos íons selecionados - MIS (do inglês “selected ion monitoring” - SIM), ajustando-se o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão m/z de interesse, ou ainda, selecionando-os a partir de um banco de dados que contenha os espectros de massas completos (CHIARADIA *et al*, 2008).

Desta forma, essa técnica foi utilizada para a análise dos extratos brutos, os produtos desenvolvidos e frações com o objetivo de identificar os sinais de massas relacionados aos espectros na região do UV característicos dos flavonóides. Com o uso do padrão do flavonol C-glicosilado vitexina, substância de interesse na análise de produtos de *Passiflora* de acordo com a legislação brasileira, foi possível o monitoramento desse flavonoide em todas as amostras. O padrão injetado, de peso molecular de 432 daltons forneceu, após ionização da molécula, o íon molecular de massa 431 ($M-1$)⁻ no cromatograma de massas, cujo tempo de retenção foi em 4,77 minutos de acordo com o cromatograma obtido por CLUE (figuras 43 e 44).

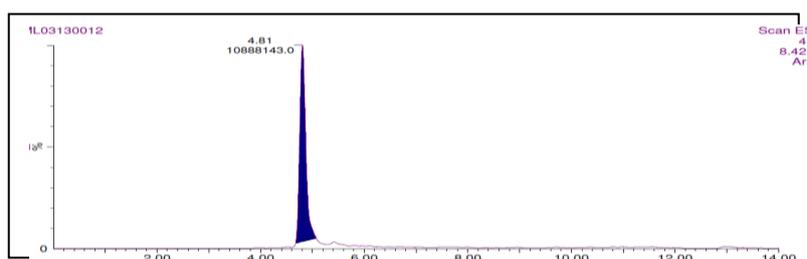


Figura 43: Cromatograma de CLUE-EM do íon selecionado 431daltons do padrão vitexina.

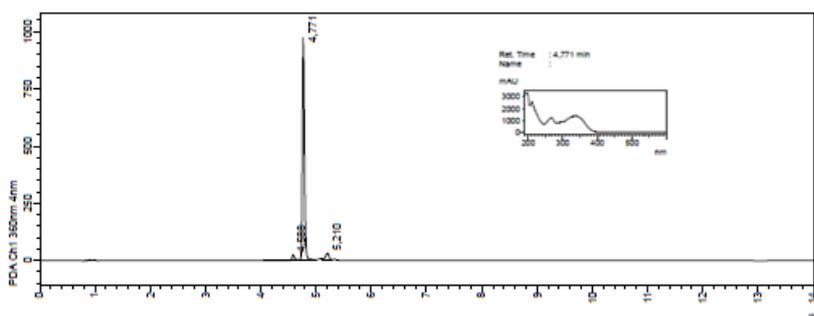


Figura 44: Cromatograma obtido por CLUE e respectivo espectro UV do padrão vitexina ($t_R = 4,77$ min).

A análise do padrão vitexina forneceu o tempo de retenção para a pesquisa desse marcador nos extratos S, CF e H. Além disso, a mudança da eficiência do tipo de cromatografia possibilitou a obtenção de melhores cromatogramas com sinais definidos com espectros na região do UV mais delineados. Os cromatogramas obtidos por CLUE monitorados em 360 nm dos extratos S, CF e H, as frações aquosa e MeOH/H₂O estão apresentados abaixo. Nos cromatogramas de massas foi evidenciado o sinal relacionado a massa da vitexina, 431 daltons (M-1)⁻. As frações MeOH de cada extrato não foram analisadas nessa etapa devido a ausência de sinais relacionados aos flavonóides nas análises anteriores realizadas por CLAE / DAD.

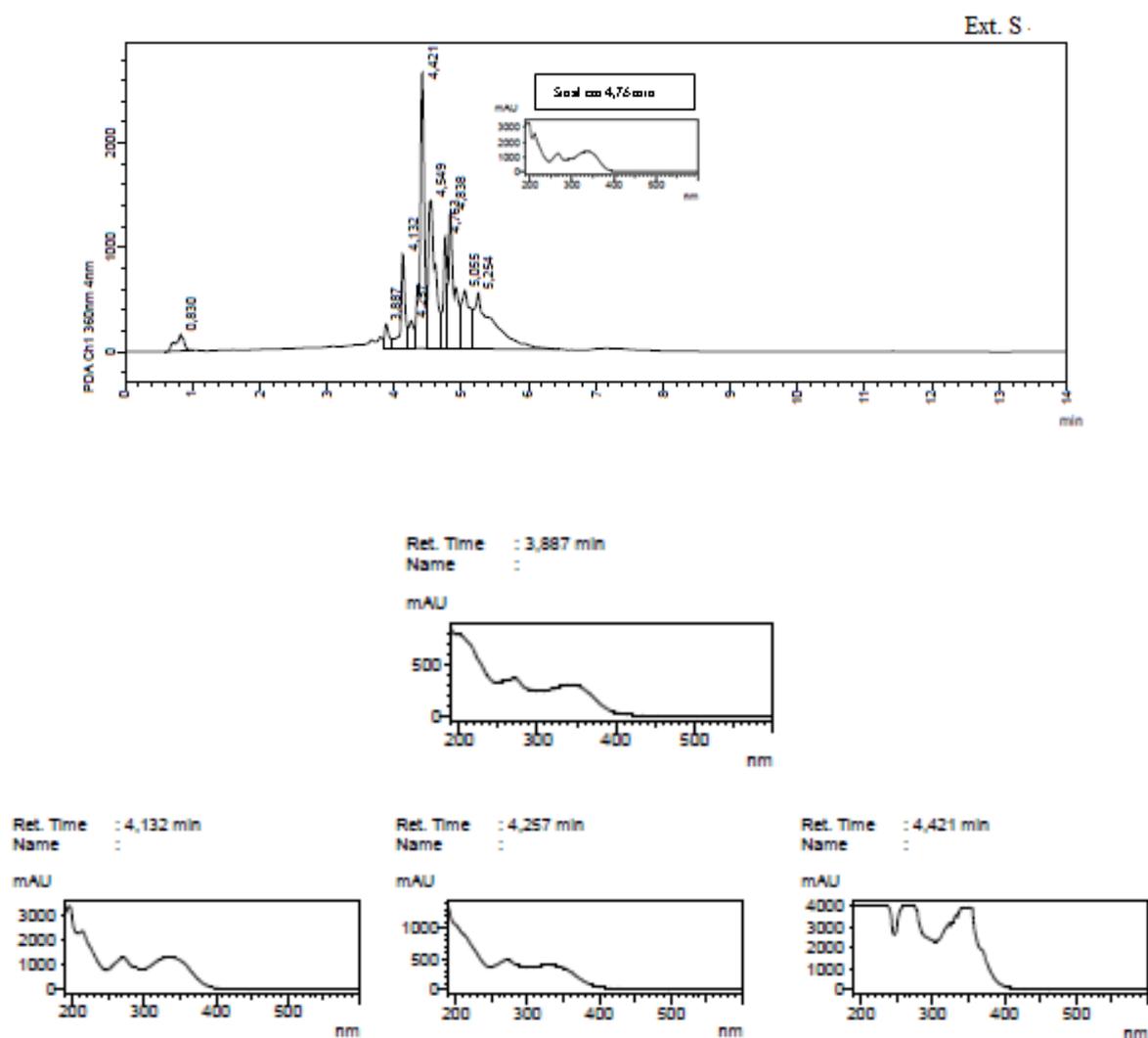


Figura 45: Cromatograma obtidos por CLUE do Ext. S em 360 nm com destaque do espectro UV do sinal da vitexina e espectros UV dos demais sinais associados as substâncias flavonoídicas do extrato.

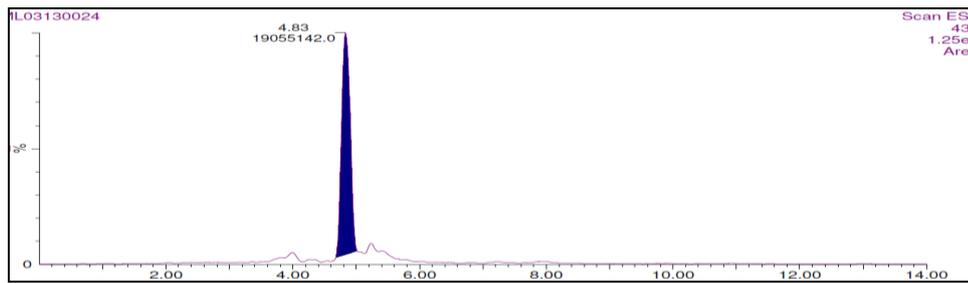


Figura 46: Cromatograma de massas do Ext. S com monitoramento seletivo do íon 431 daltons relacionado a vitexina.

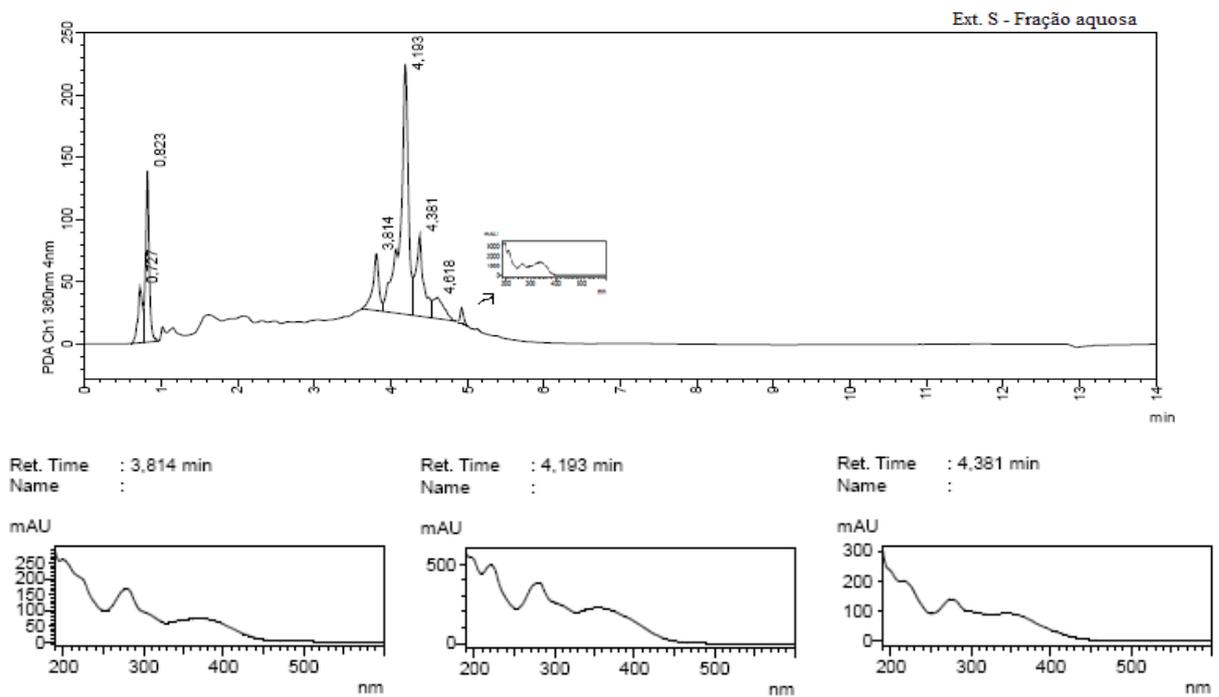


Figura 47: Cromatograma da CLUE da fração aquosa de Ext. S com destaque do espectro UV relacionado ao sinal da vitexina e os espectros UV dos sinais dos demais flavonóides.

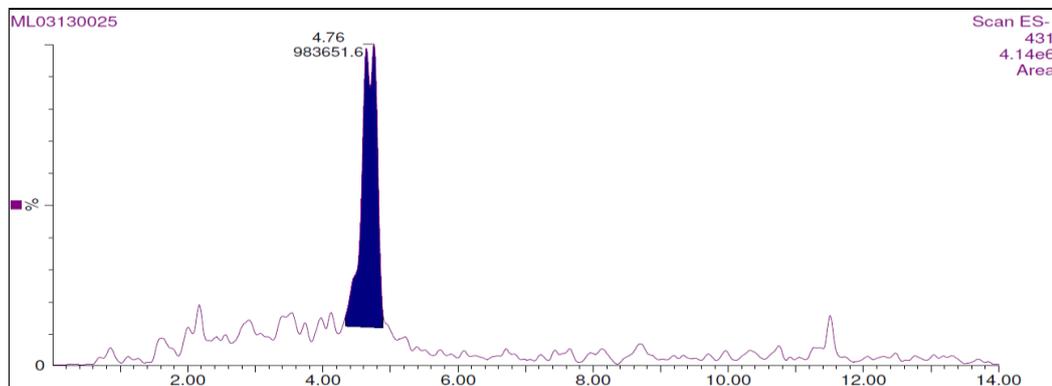


Figura 48: Cromatograma de massas da fração aquosa do Ext. S associado a seleção monitorada do íon 431 daltons.

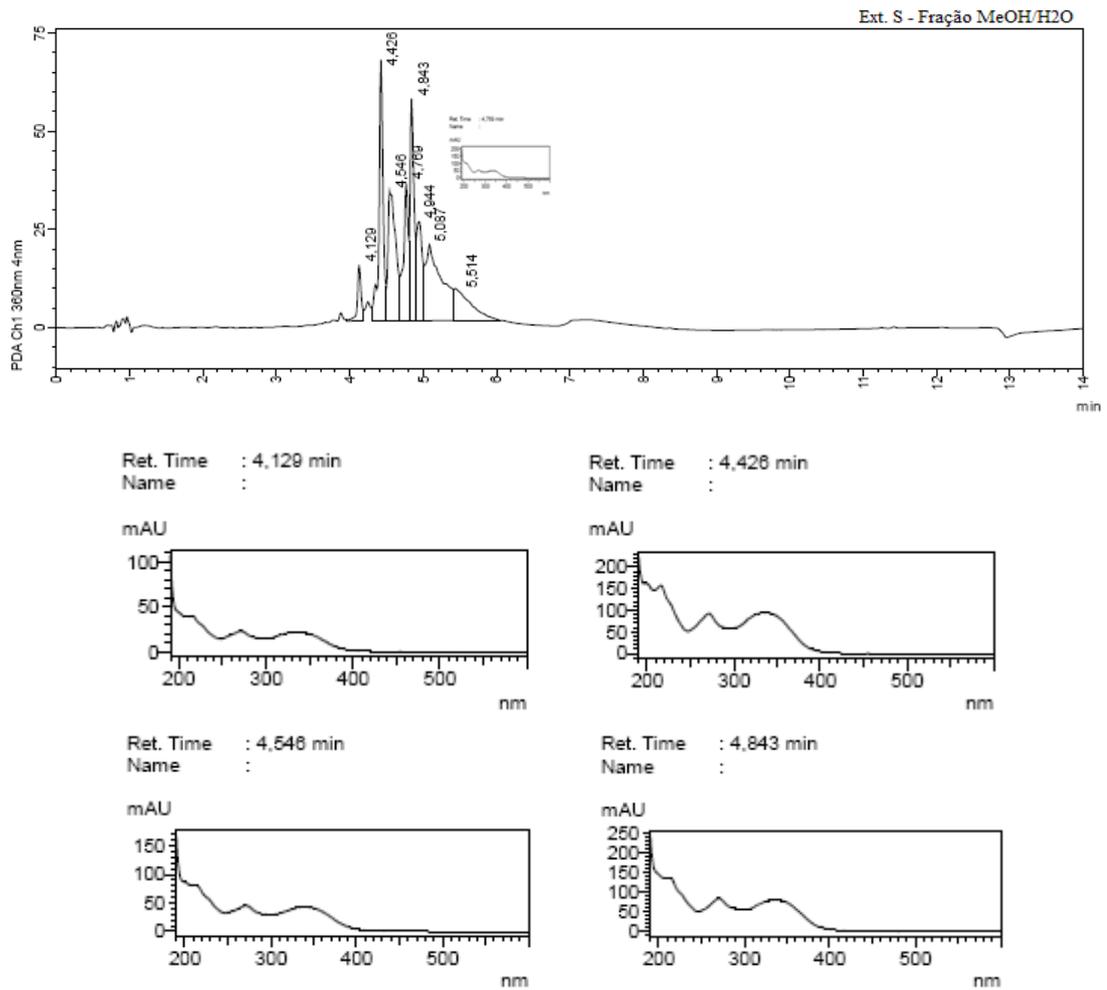


Figura 49: Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H₂O do Ext. S com destaque para o espectro UV do sinal relacionado ao t_R da vitexina e os demais sinais com espectros UV característicos de flavonóides.

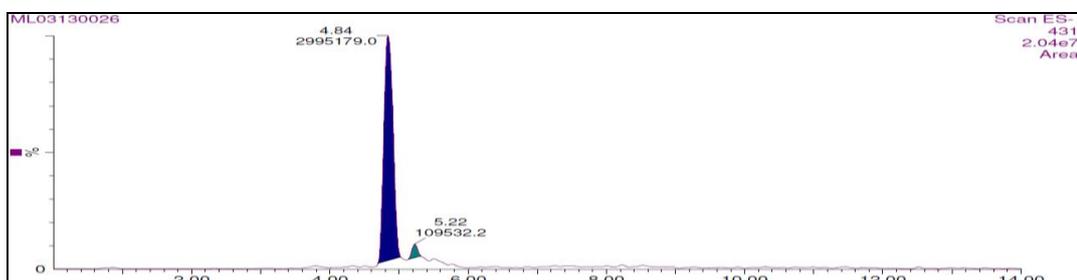


Figura 50: Cromatograma de massas da fração MeOH/H₂O do Ext. S associado a seleção monitorada do íon 431 daltons.

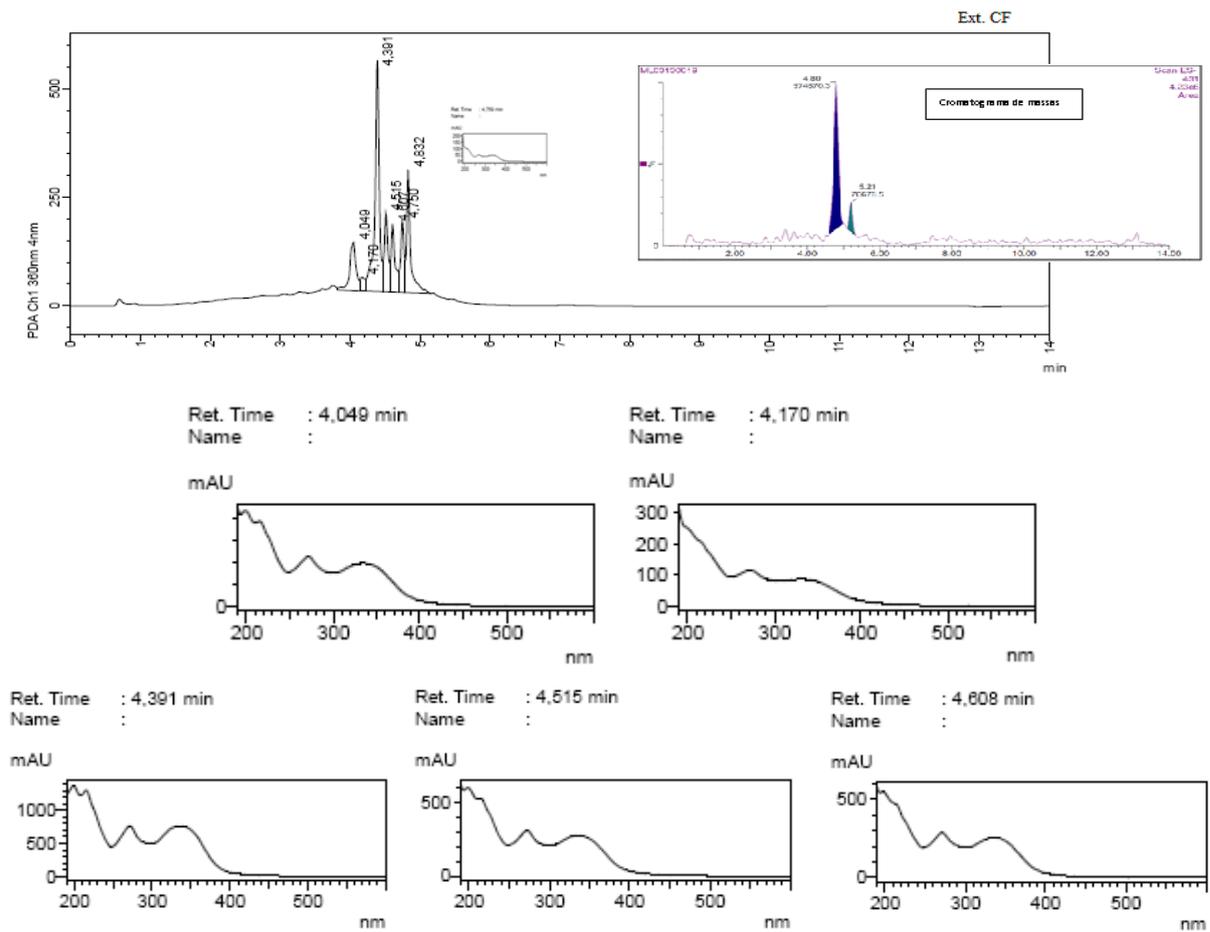


Figura 51: Cromatograma da CLUE do Ext. CF com destaque do espectro UV e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os demais sinais associados aos flavonóides do extrato.

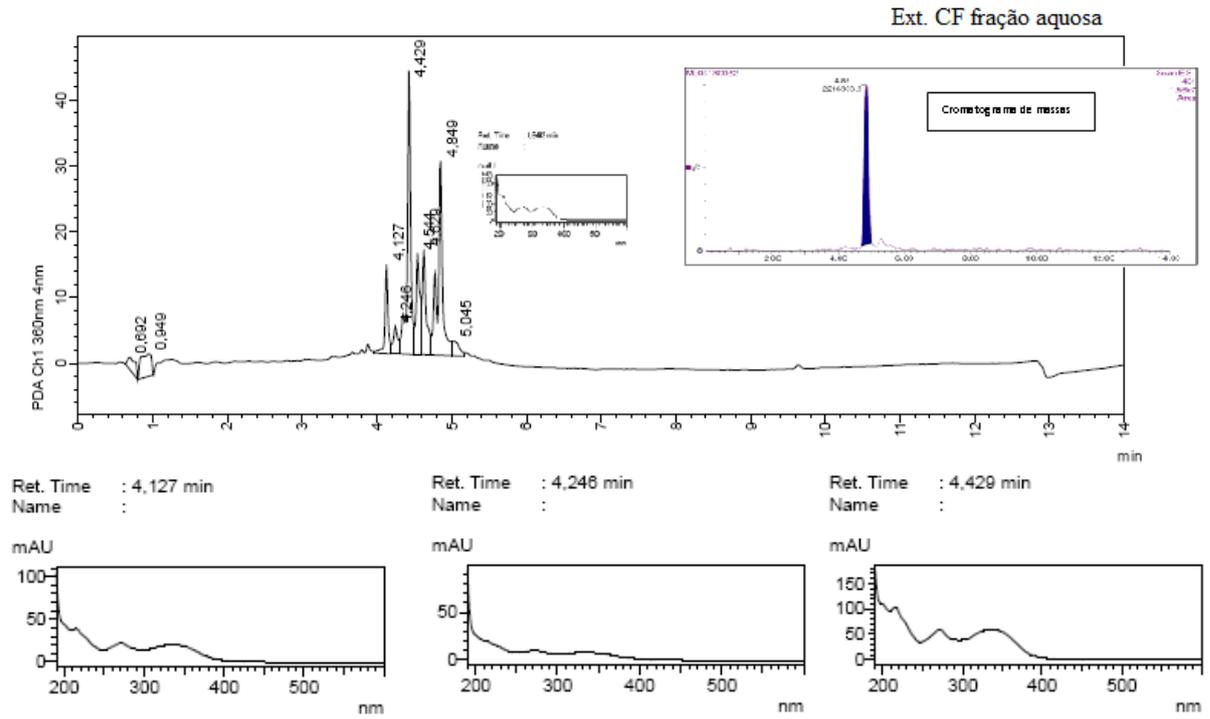


Figura 52: Cromatograma da CLUE da fração aquosa do Ext. CF com destaque do espectro UV e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os demais sinais associados aos flavonóides do extrato.

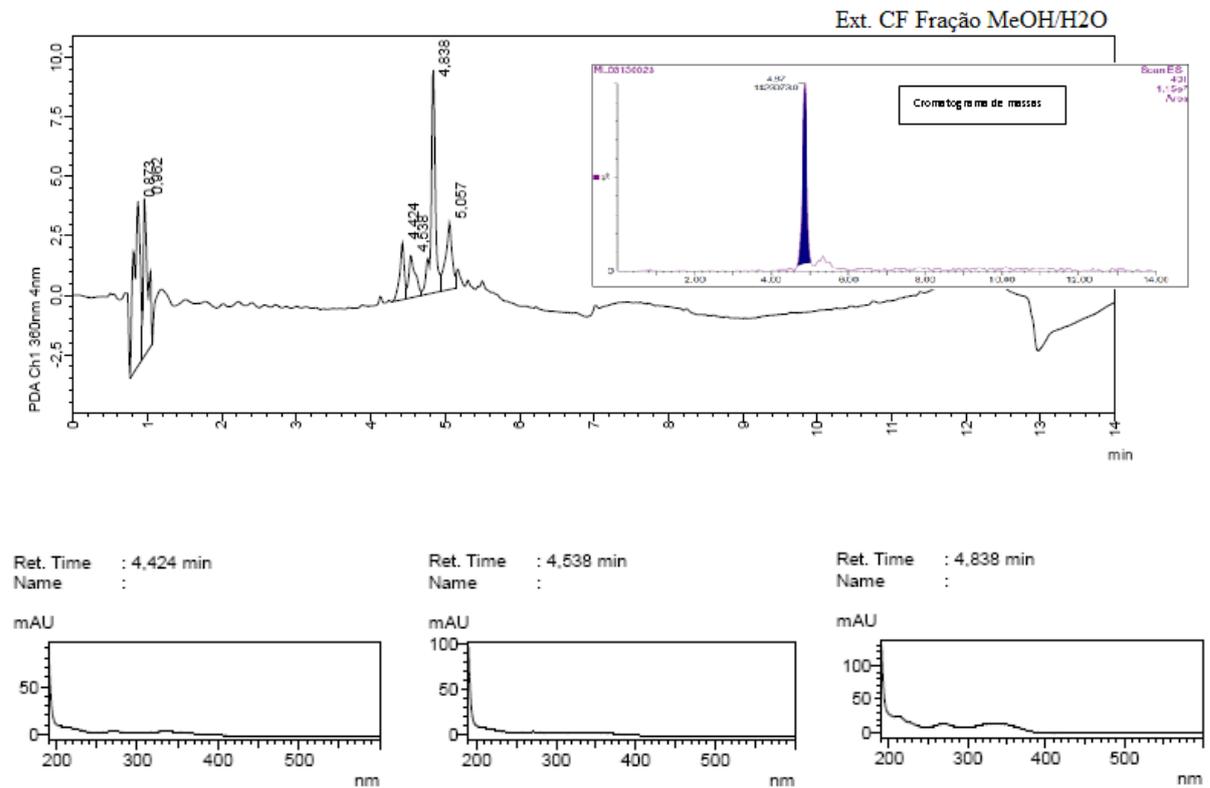


Figura 53: Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H₂O de Ext. CF e o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina. Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides do extrato, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.

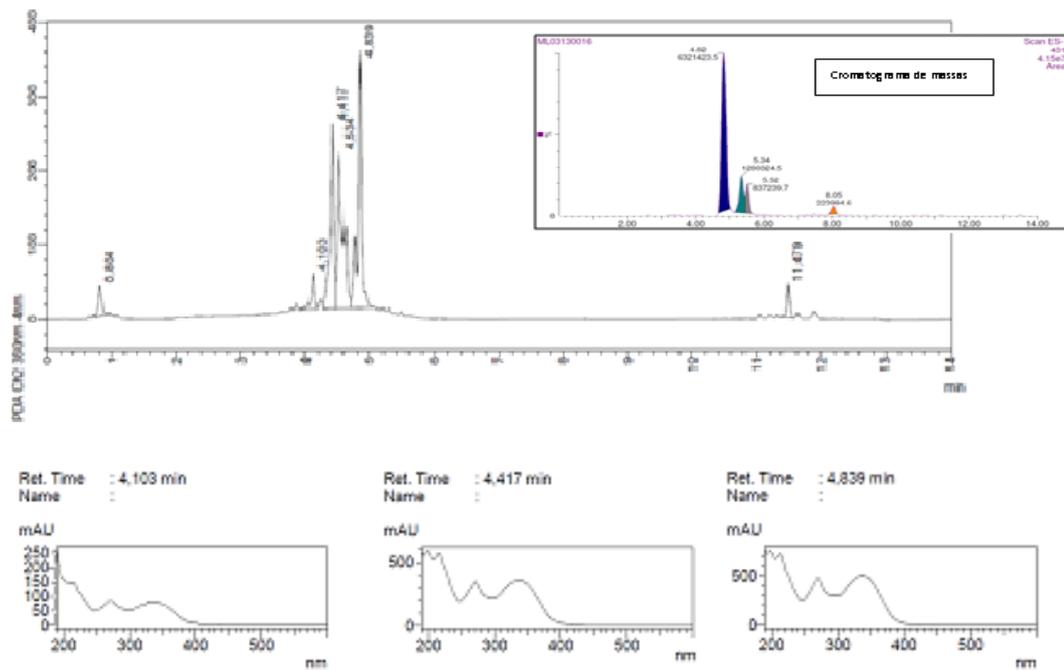


Figura 54: Cromatograma da CLUE de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides do extrato, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.

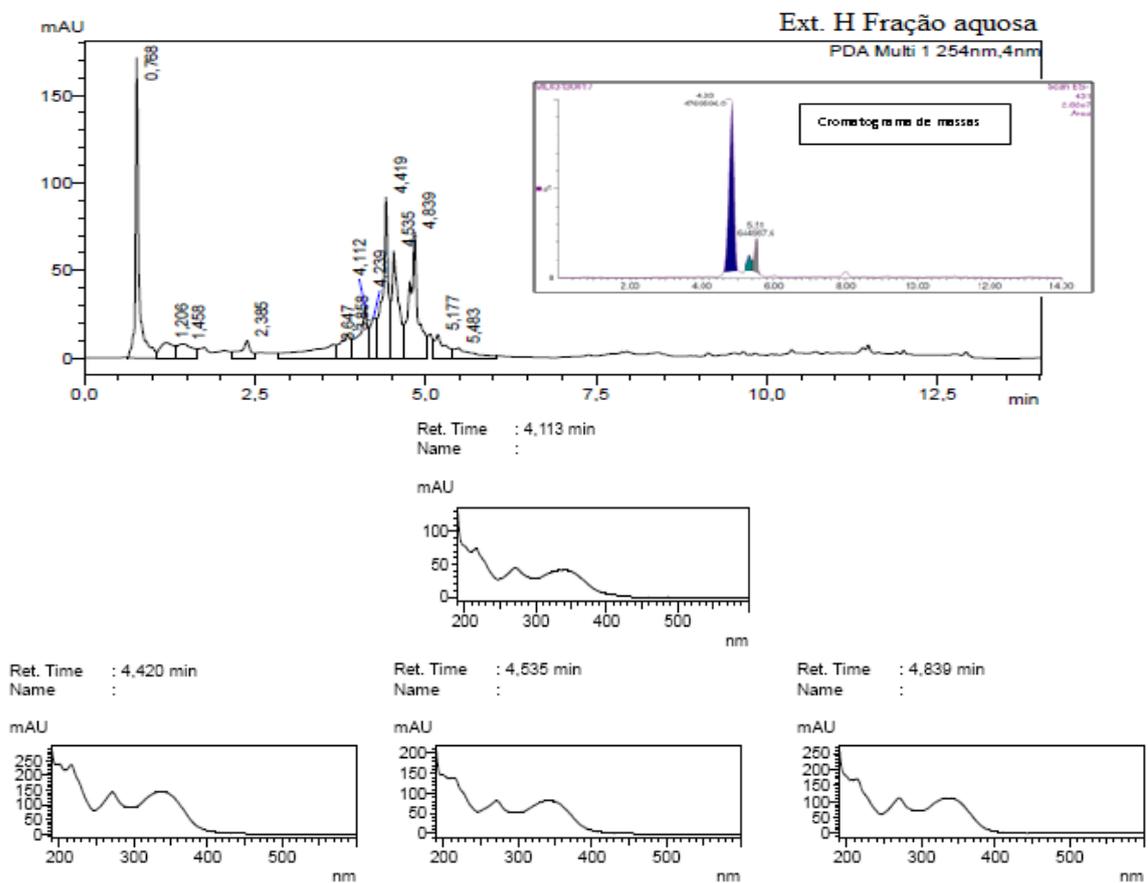


Figura 55: Cromatograma da CLUE da fração aquosa de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides da fração, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.

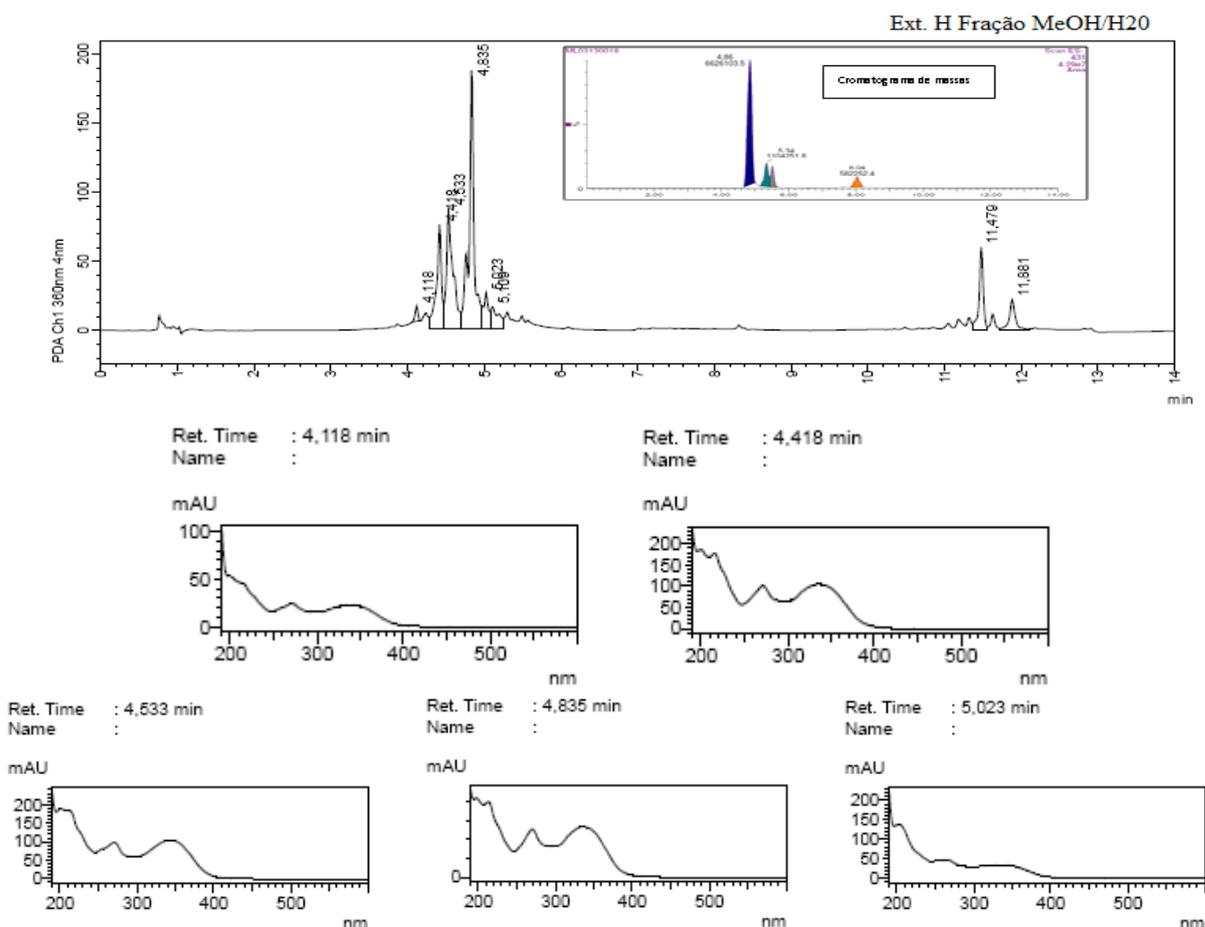


Figura 56: Cromatograma da CLUE da fração MeOH/H₂O de Ext. H com destaque para o cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais associados aos flavonóides da fração, sendo o em 4,8 min relacionado a vitexina.

Em todos os cromatogramas foi possível observar os flavonóides majoritários nos t_R de 4,4 e 4,8 minutos, sendo esse último a vitexina. A diferença de tempo de retenção encontrado, com pequenas variações, é normal em cromatografia líquida, principalmente quando se injeta várias amostras. Não foram realizadas amostragens em replicada.

Todas as amostras analisadas dos extratos brutos e suas frações apresentaram a vitexina em sua composição. Dentre os extratos brutos, a maior área relativa dessa substância foi encontrada para o extrato bruto H.

4.3. Produto a base de *Passiflora*

O produto a base de extrato de *Passiflora* foi desenvolvido, de acordo com as normas vigentes, para medicamentos fitoterápicos com registro simplificado, para a notificação de lotes-piloto de fitoterápicos, para o estudo de estabilidade e de Boas Prática de Fabricação e Controle (BRASIL, 2008a, 2009a; 2005, 2010c). Para a formulação foram utilizadas três matérias-primas fornecidas por indústrias.

A IN 5 preconiza uma faixa para a dose diária a ser utilizada de 20 a 64 mg de flavonóides totais expressos em vitexina em um medicamento fitoterápico a base de *Passiflora* (BRASIL, 2008a). Com vistas ao disposto, a formulação farmacêutica foi preparada atendendo a dose mínima e, em função das diferentes especificações dos extratos, formulações distintas foram obtidas para cada extrato.

Três formulações farmacêuticas foram preparadas a partir de cada extrato fornecido, com uma dose diária, em torno de 40 mg de flavonóides totais expressos em vitexina. As formulações farmacêuticas preparadas foram identificadas de acordo com seus extratos, ou seja, a amostra S produziu a formulação farmacêutica S, a amostra CF produziu a formulação farmacêutica CF e amostra H produziu a formulação farmacêutica H. As principais análises físico-químicas foram realizadas com os produtos formulados e estão discutidas abaixo.

4.3.1. Análises Físico-químicas do Produto

Diferentes formulações foram elaboradas até a definição de uma que apresentasse características agradáveis de sabor, que o sistema de conservantes utilizado fosse solubilizado em veículo aquoso e impedisse o crescimento microbiano. Uma formulação base para a elaboração das formulações farmacêuticas foi utilizada e cada extrato vegetal proveniente dos fornecedores comerciais ou de doação resultaram em três produtos de especificações distintas. A formulação foi padronizada para apresentar a dose diária aproximada de 40 mg de vitexina, representando 2,0 mg (vitexina) / mL de produto, de acordo com a IN 5/08 (BRASIL, 2008a). Os produtos foram identificados como formulação farmacêutica ED.S, ED.CF e ED.H (figura 57). As características gerais de cada uma foram descritas a seguir.

Formulação farmacêutica ED.S: Líquido de coloração castanho escuro com nuance levemente esverdeada, odor e sabor adocicados, com nota de fundo de aroma de maracujá.

Formulação farmacêutica ED.CF: Líquido de coloração castanho claro, odor e sabor adocicados, com nota de fundo de aroma de maracujá e odor de alcoólico.

Formulação farmacêutica ED.H: Líquido de coloração castanho escuro, odor e sabor adocicados, com nota de fundo de aroma de maracujá.

Os valores de pH, densidade e teor alcoólico estão apresentados na tabela 8, 9 e 10, assim como uma foto mostrando as diferenças entre os produtos (figura 57). Como a formulação farmacêutica H foi elaborada a partir de extrato seco e não houve adição de etanol à formulação, o teor alcoólico não foi determinado.

Tabela 8 – Comparação dos valores de pH das formulações

Formulação	1ª dup.	2ª dup.	3ª dup.	Média
ED.S	5,3	5,29	5,31	5,30
ED.CF	5,86	5,92	5,88	5,89
ED.H	5,36	5,3	5,3	5,32

Tabela 9 – Comparação dos valores de densidade das formulações

Formulação	1ª dup.	2ª dup.	3ª dup.	Média
ED.S	1,0544	1,0544	1,0544	1,0544
ED.CF	1,0329	1,0331	1,0330	1,0330
ED.H	1,0745	1,0746	1,0746	1,0746

Tabela 10 – Teor alcoólico das formulações

Formulação	Densidade (g/mL)	Teor Alcoólico (%)
ED.S	0,9939	4,2
ED.CF	0,9786	16,9

De acordo com os resultados apresentados, os produtos apresentaram densidade semelhantes, mesma faixa de pH, sendo a formulação ED.CF a mais básica. Essa formulação também foi a que apresentou maior teor alcoólico, decorrente do extrato bruto comercial.

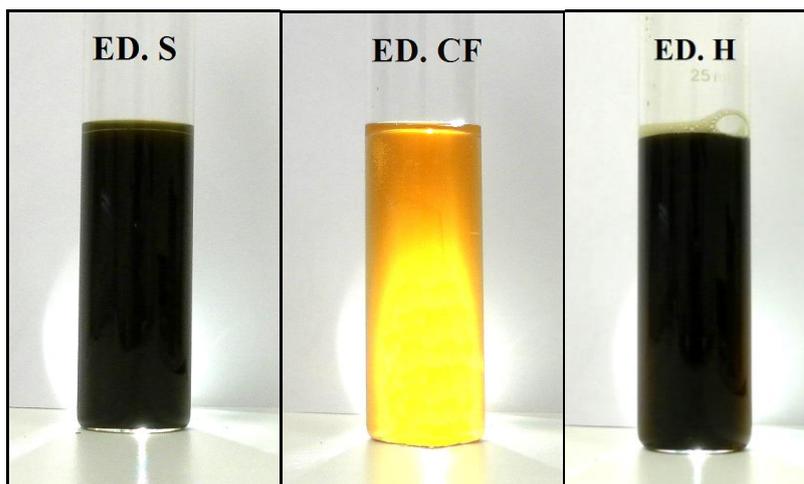


Figura 57: Foto ilustrativa das formulações: ED. S;ED. CF e ED. H.

4.3.2. Análise por CCD dos produtos

As amostras foram aplicadas junto com os extratos brutos e frações. O cromatograma obtido está na página 60, figura 25. A análise das manchas do cromatograma mostraram que as formulações, assim como os extratos, apresentaram a vitexina como um dos seus constituintes flavonoídicos.

4.3.3. Análise por Espectrofotometria UV / VIS dos produtos

A figura abaixo ilustra o preparo das amostras para leitura no espectrofotômetro de UV/VIS, por meio de varredura de 200 a 600 nm.

As alíquotas de 4,0 mL foram retiradas de cada formulação, representando a concentração teórica de 2,0 mg/mL, e após centrifugação a 15000 U/min, durante 3 minutos, preparou-se diretamente as soluções SB e ST. As soluções SB receberam 2,0 mL de amostra e as soluções ST receberam 2,0 mL de amostra mais 2,0 mL de solução de AlCl_3 2% (p/v) em solução etanólica 50%. As soluções SB e ST foram diluídas em 100 mL de etanol 50% (v/v). A leitura no espectrofotômetro foi realizada após 30 min executando-se a varredura na faixa de 200 a 600 nm.

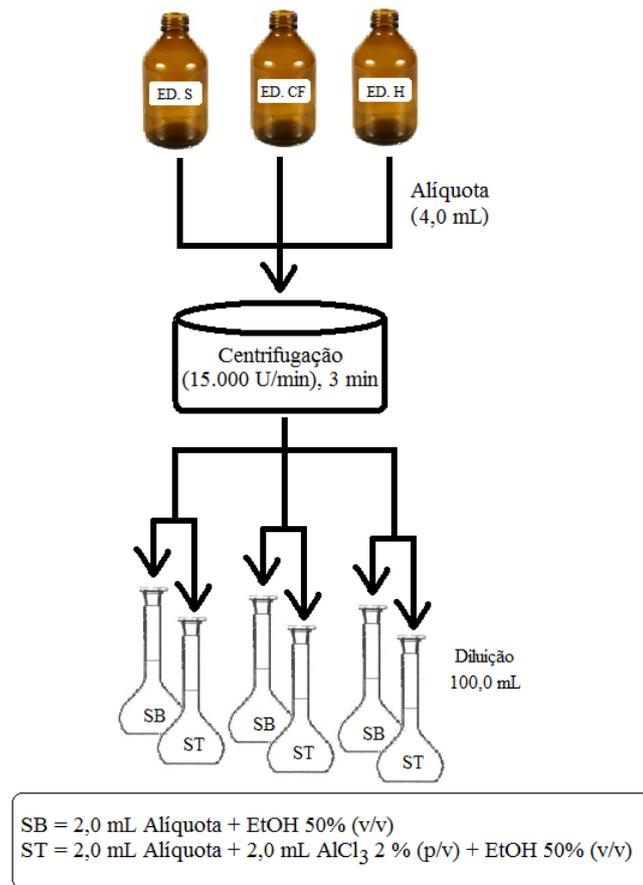


Figura 58: Fluxograma da preparação das amostras das formulações para reação de complexação entre o AlCl_3 e os flavonóides.

Os espectros obtidos para cada amostra estão representados nas figuras 59, 60 e 61. A leitura denominada branco consistiu da solução da formulação em análise sem cloreto de alumínio a 2% em etanol.

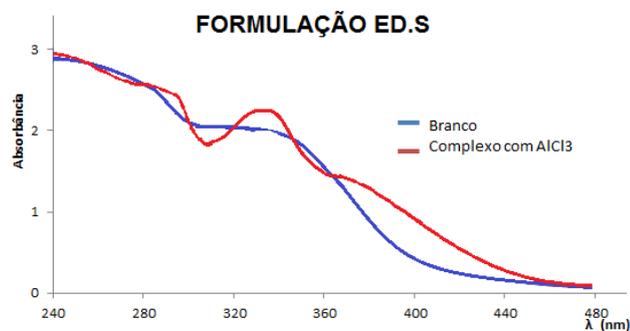


Figura 59: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.S sem e com AlCl_3 . — banda I (344,5 nm; Abs = 0,30638) e banda II (275 nm; Abs = 3,999); — banda I (347,0 nm; Abs = 1,9618) e banda II (276,0 nm; Abs = 3,2665).

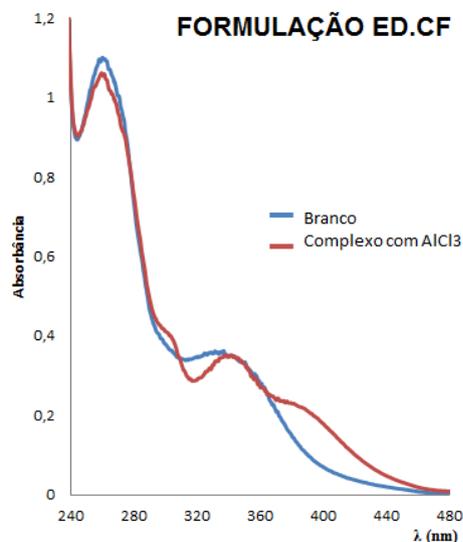


Figura 60: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.CF sem e com AlCl_3 . — - banda I (337,0 nm; Abs = 0,3629) e banda II (260 nm; Abs = 1,1016). — - banda I (337,0 nm; Abs = 0,3521) e banda II (261,0 nm; Abs = 1,067).

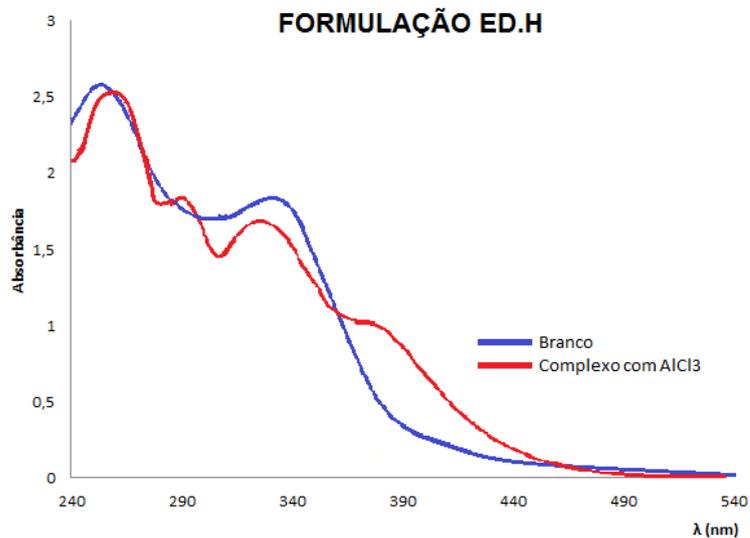


Figura 61: Espectros na região do UV referentes à análise de flavonóides na formulação ED.H sem e com AlCl_3 . — - banda I (330,5 nm; Abs = 1,9131) e banda II (275 nm; Abs = 3,2665); — - banda I (333,0 nm; Abs = 1,725) e banda II (277,0 nm; Abs = 2,5240).

Os resultados obtidos nesse experimento mostraram um efeito batocrômico referente a banda I, após a adição da solução de AlCl_3 , nas soluções dos produtos evidenciando a presença de flavonóides com deslocamento. Como as formulações farmacêuticas foram

preparadas para apresentarem a mesma faixa de concentração teórica, as diferenças quanto à magnitude da absorbância entre elas não deveriam ser expressivas caso as amostras das matérias-primas utilizadas tivessem as mesmas características. Com intenção de obter melhores informações sobre os produtos gerados, o método de quantificação acima utilizando o espectrofotômetro e um flavonóide como referência foi utilizado.

Os resultados obtidos após as leituras das soluções de diferentes concentrações da rutina a 425 nm (0,002; 0,006; 0,010; 0,014 e 0,018 mg/mL) forneceram o gráfico da figura 35.

Após a elaboração da curva com a rutina, as leituras das soluções dos produtos foram realizadas, informando o total de flavonóides expressos em rutina para cada formulação (figura 62).

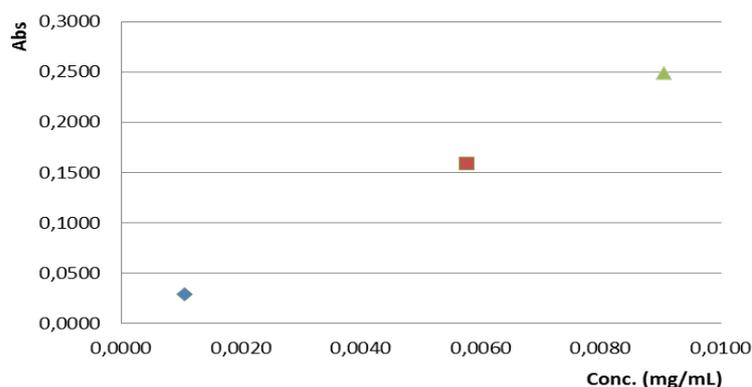


Figura 62: Teor de flavonóides totais expressos em rutina nas formulações. ■ - ED. CF; ◆ - ED. H; ▲ - ED. S

Durante a formulação de ED S e ED H, foi utilizada uma concentração de 2,0 mg de vitexina por mL de produto de acordo com o laudo dos fabricantes dos extratos, correspondendo à dose diária mínima de 30 mg / 15 mL. Devido ao baixo teor de flavonóides no Ext CF, a formulação do ED CF precisou de 40,0 mL do respectivo extrato em 50,0 mL de produto, contribuindo com 80 % da formulação. Mesmo assim, o total de flavonóides encontrado na formulação da formulação com esse extrato não correspondeu ao laudo fornecido, levando a um valor abaixo do preconizado pela legislação. Os resultados encontrados na quantificação dos produtos estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Teor de flavonóides totais expressos em rutina.

Formulação	Concentração (mg/mL)	Teor (%)
ED.S	0,0090	0,0452
ED.CF	0,0057	0,0360
ED.H	0,0010	0,0265

O uso do flavonóide rutina ao invés da vitexina foi por causa do preço e disponibilidade no laboratório. Apesar das diferenças estruturais, ambas as substâncias possuem centros de complexação, conduzindo a resultados de análises que podem ser utilizados em qualquer trabalho. Entretanto, para efeitos de registro, esses resultados tem que ser refeitos para cumprir a determinação analítica da IN 5/08, onde o total de flavonóides tem que ser expresso em vitexina, substância presente no extrato de *Passiflora incarnata*.

4.3.4. Análise dos produtos por CLAE / DAD

Para a elaboração dos cromatogramas foi utilizada a mesma metodologia descrita para os extratos e suas frações. A escolha do melhor comprimento de onda para monitoramento do cromatograma foi realizada após análise dos perfis em 254, 280 e 340 nm. Este último (fig. 63) foi definido para o acompanhamento e revelou seis sinais significativos e bem distribuídos. Os cromatogramas obtido por CLAE para todos os produtos, monitorados em 340 nm, estão apresentados a seguir:

1. Formulação ED.S

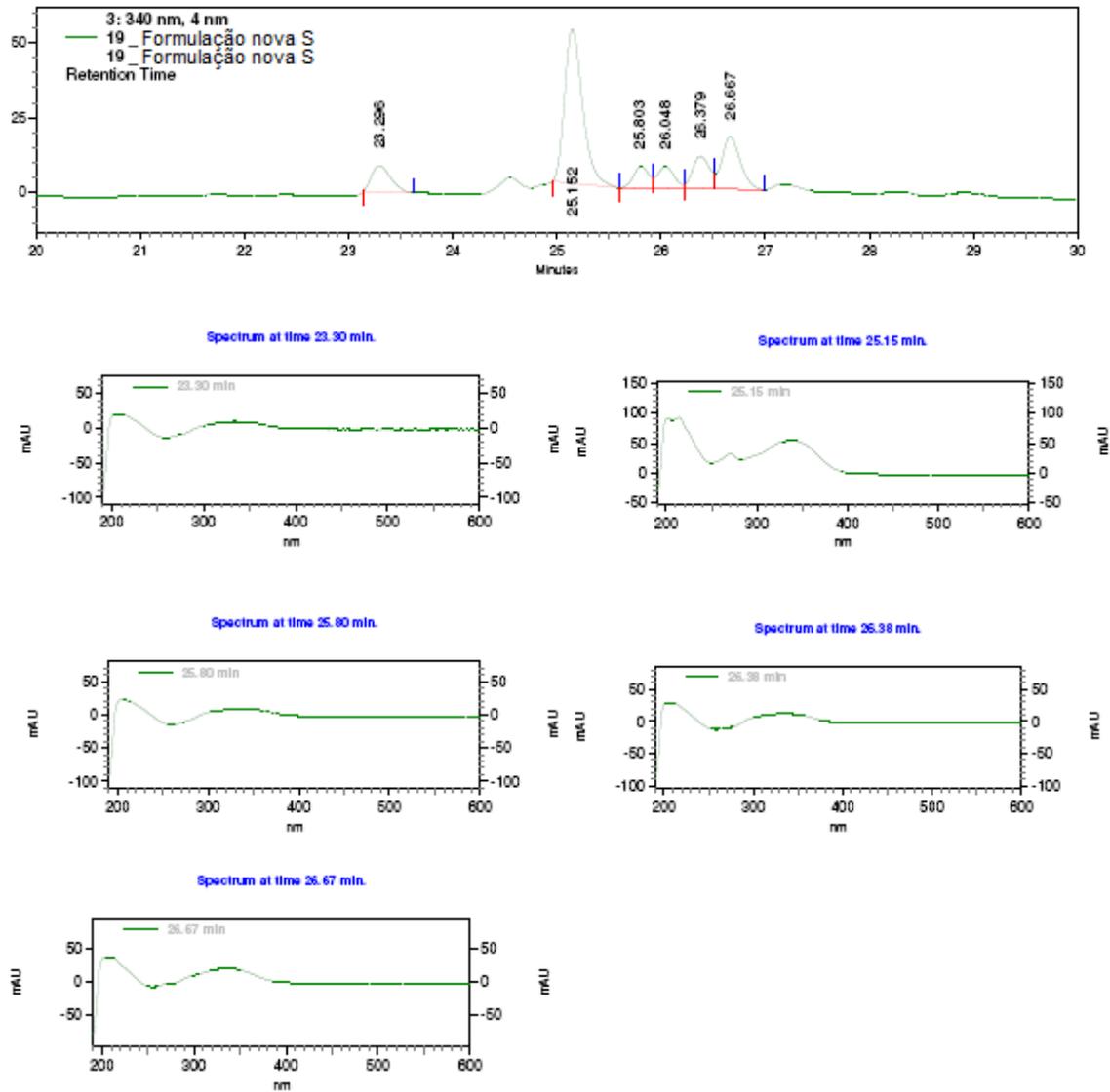


Figura 63: Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.S e respectivos espectros UV dos sinais visualizados.

2. Formulação ED.CF

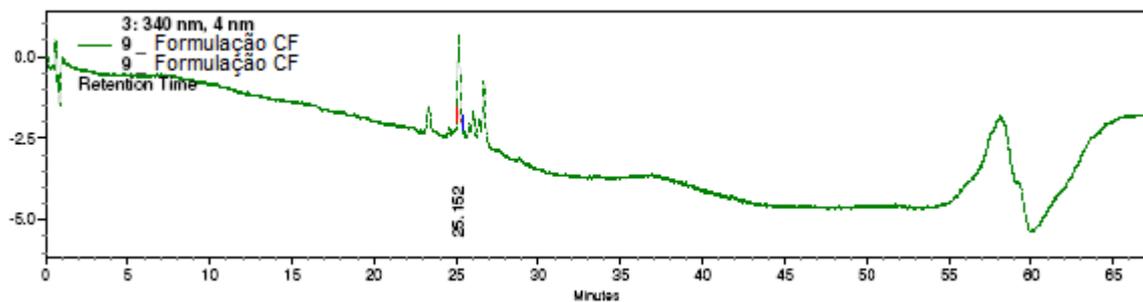


Figura 64: Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.CF.

3. Formulação ED.H

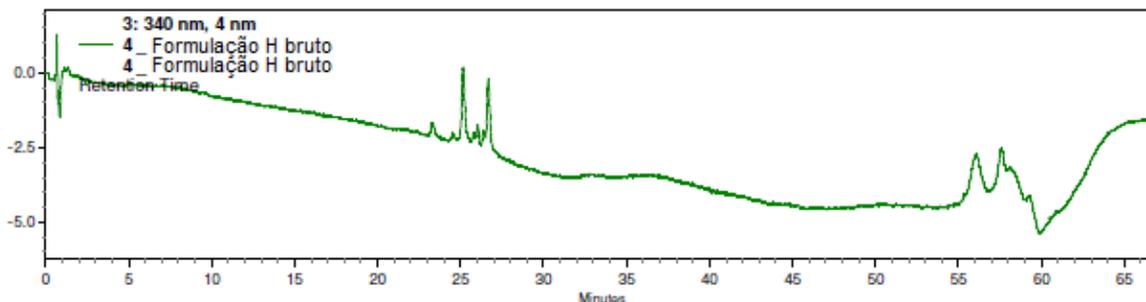


Figura 65: Cromatograma da CLAE (340 nm) da formulação ED.H.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE das formulações ED.CF e ED.H não apresentaram boa resolução, com intensidade de absorção próxima de 15 mAU. Essa baixa resolução forneceu espectros UV com ruídos e difíceis de interpretar. Esses problemas poderiam ser contornados pela injeção de uma outra amostra com maior massa de analito, entretanto a melhor opção foi a utilização dessas soluções no cromatógrafo líquido de ultra eficiência.

4.3.5. Análise dos produtos por CLUE – DAD - EM

As análises foram realizadas com o mesmo método descrito para os extratos obtidos por CLUE acima. Os cromatogramas obtidos das formulações estão apresentados abaixo. De uma maneira geral, todos os cromatogramas da CLUE das amostras monitorados em 360 nm no DAD e na seleção do íon 431 daltons relativo a vitexina apresentaram boa resolução, sendo possível observar os flavonóides com ótima definição. Adicionalmente, de acordo com o cromatograma de massas, o flavonóide vitexina foi encontrado nos três produtos formulados demonstrando a maior eficiência da cromatografia líquida e a consequente sensibilidade dos detectores hifenados a ela, garantindo resultados de melhor qualidade e confiabilidade para o produto elaborado.

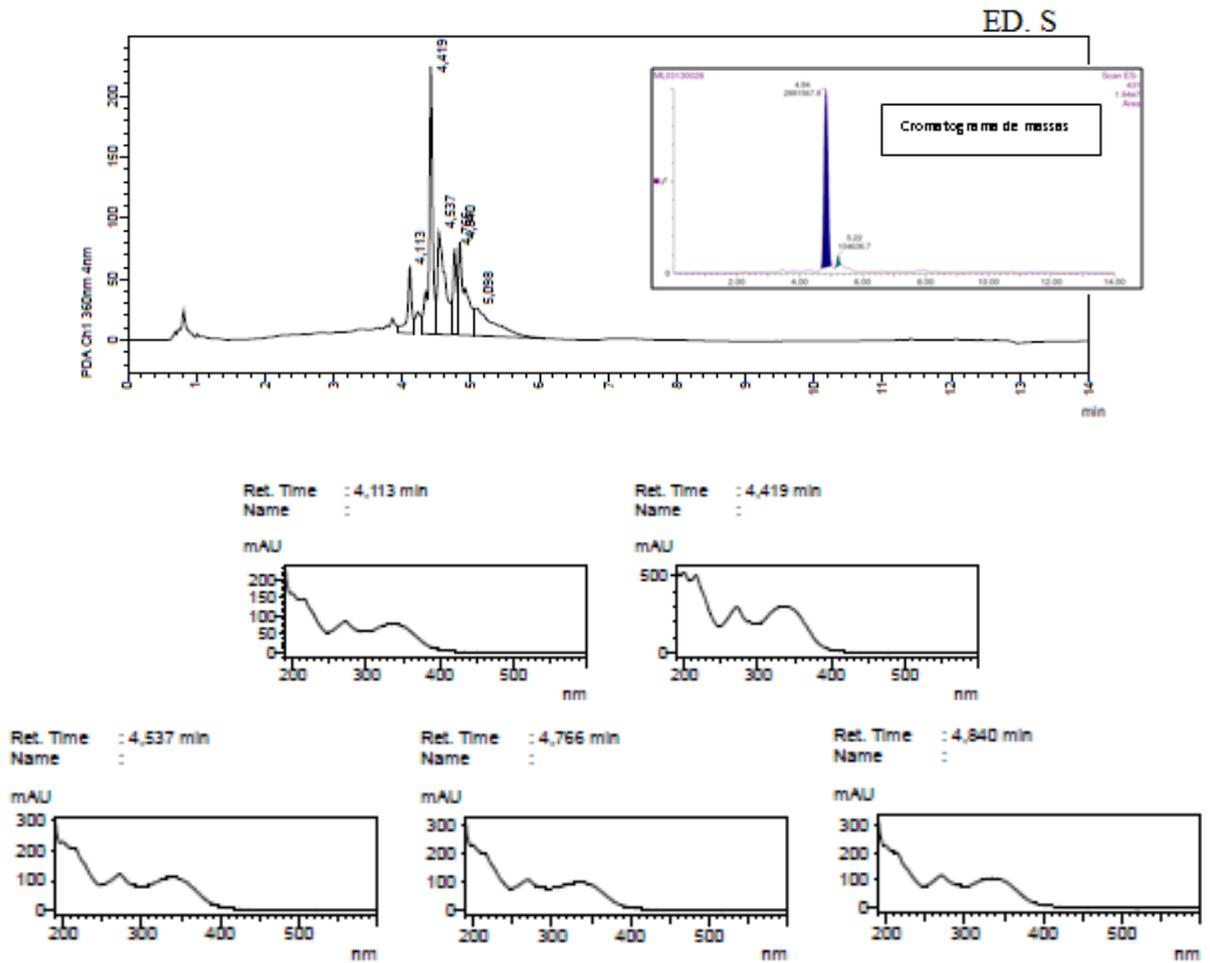


Figura 66: Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED S com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.

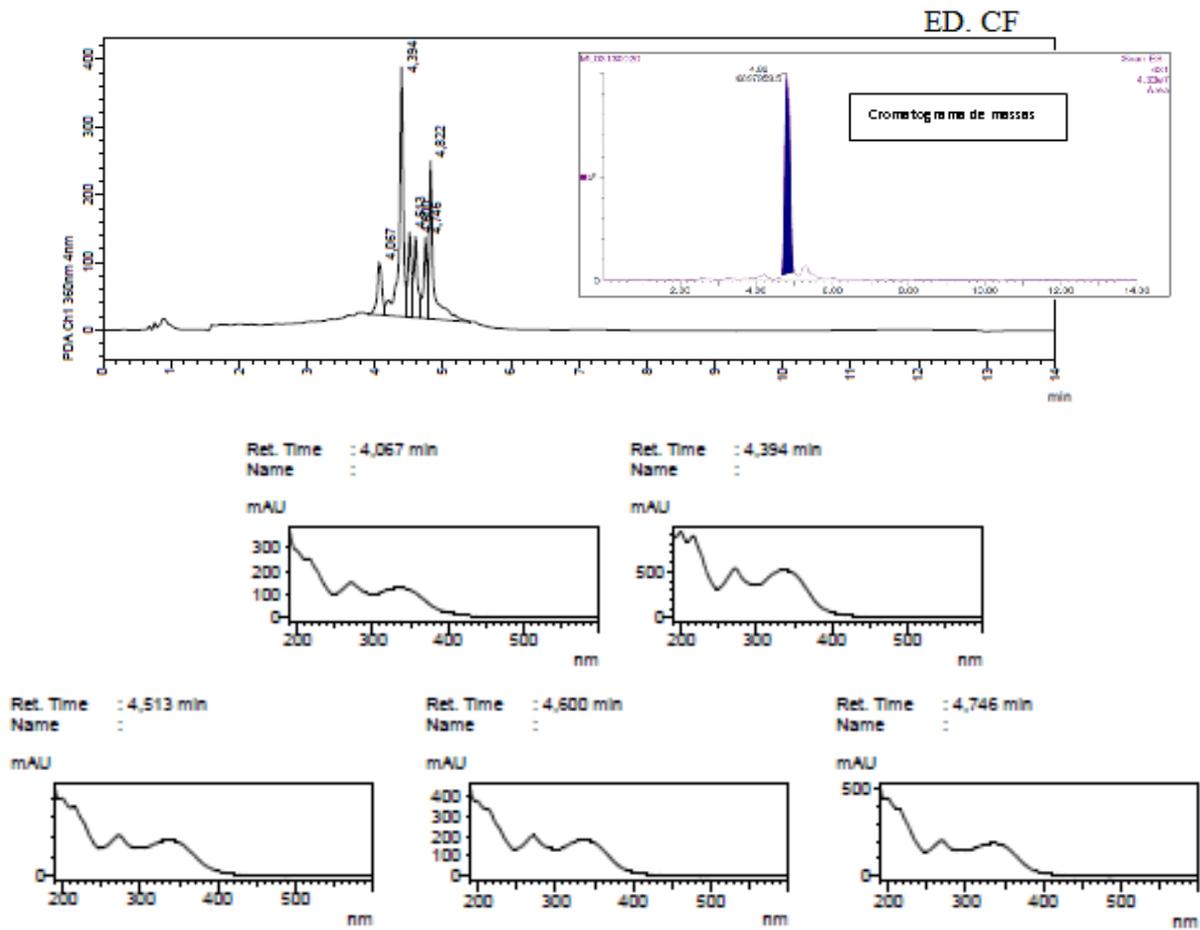


Figura 67: Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED CF com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.

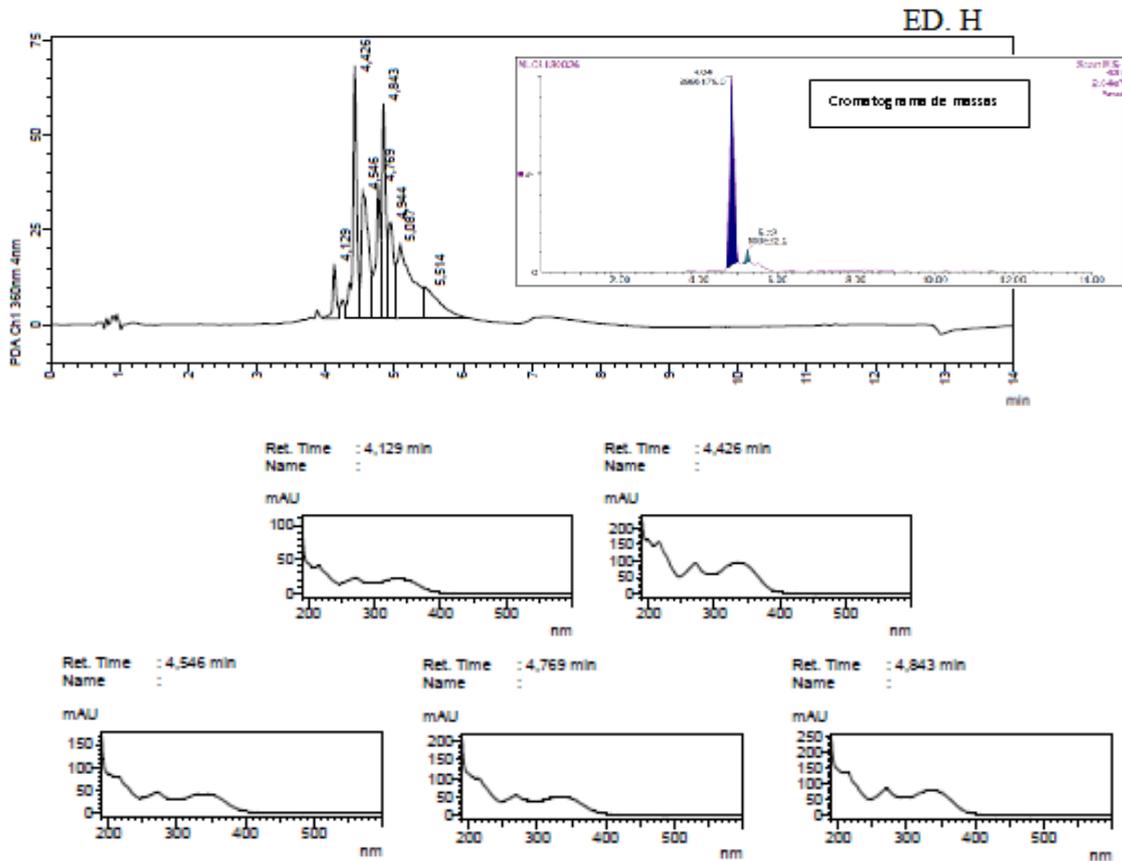


Figura 68: Cromatograma obtido por CLUE da formulação ED H com destaque do cromatograma de massas com a seleção do íon 431 daltons da vitexina (4,8 min, pico majoritário). Os espectros UV representam os sinais relacionados a flavonóides do produto.

Em todos os cromatogramas foi possível observar os flavonóides majoritários nos tempo de retenção de 4,4 e 4,8 minutos, sendo esse último o da vitexina. As amostragens em replicada serão objeto de outros estudos de melhoramento do método e quantificação do padrão.

4.3.6. Patenteamento: Uma Possibilidade?

Conforme mencionado anteriormente, a legislação brasileira considera os extratos de plantas e as substâncias ativas presentes nas plantas como descobertas e não patenteáveis, mesmo quando estas substâncias são obtidas a partir delas. Contudo, são patenteáveis os processos para a obtenção de extratos ou para isolar substâncias ativas a partir de produtos

naturais. Nesse sentido, a elaboração de um medicamento fitoterápico no qual haja interesse na inovação e na comercialização justifica a proteção patentária do produto (MULLER & MACEDO, 2005). Com o mercado de fitoterápicos crescente, alinhado com as políticas públicas fomentando a regularização desde a obtenção até o uso de plantas medicinais, e seus derivados (BRASIL, 2006), a perspectiva de patenteamento da presente formulação farmacêutica está sob avaliação. Por isso, detalhes sobre a formulação não puderam ser adicionados na presente dissertação.

5. CONCLUSÃO

As análises das diferentes matérias-primas vegetais analisadas morfológicamente mostraram a importância da procedência do material botânico para a elaboração de um produto. Diferenças notáveis dentre os exemplares das espécies de *Passiflora* analisados foram observados na análise microscópicas realizadas, destacando a importância dessa etapa no processo de qualidade de qualquer produto de origem vegetal. Infelizmente a dificuldade em obter amostras de *P. incarnata*, foi consultada a Embrapa (exemplares em cultivo morreram) e principalmente o fornecedor do extrato de *Passiflora* estudado nesse trabalho (não enviou uma amostra), mostrou a provável não existência dessa espécie no Brasil para fins comerciais. As espécies estudadas são encontradas em vários estados brasileiros e algumas estão sendo avaliadas morfológicamente pela primeira vez.

Dentre os extratos vegetais recebidos, os extratos S e CF não corresponderam a qualidade necessária para elaboração do produto. O extrato Ext. S, após as análises, não atendeu às especificações da IN 5 / 08 no que diz respeito ao teor de vitexina, fator importante para a concessão do registro da formulação S, apesar das análises mostrarem a presença desse e de outros flavonóides.

O extrato Ext. CF apresentou o total de flavonóides abaixo do desejado, sendo usado 80% na formulação, resultando em um produto com alto teor alcoólico e conseqüentemente, inviabilizando o uso. Além disso, a falta de confirmação pelo fornecedor da procedência da matéria-prima vegetal utilizada para elaborar o extrato de *Passiflora incarnata*, tendo em vista que essa espécie botânica não é cultivada no Brasil por não conseguir adaptação às condições edafoclimáticas, deixou uma lacuna no dossiê do produto obtido. A origem da matéria-prima

vegetal utilizada é de grande relevância para a garantia da eficácia, qualidade e segurança da produto final e por segmento, a população.

O extrato Ext. H apresentou boa qualidade para a elaboração do produto, por atender aos requisitos preconizados pela IN 5/08. Apesar do extrato ter sido uma doação, o mesmo veio com laudo técnico e especificação, assim como a declaração de origem. De todas os três materiais utilizados, esse extrato é o que oferece maior segurança para o desenvolvimento de um produto.

As formulações obtidas foram analisadas de acordo com exigências contidas na IN 5/08 e depois de até dois anos formuladas (produtos de “prateleira”), apresentaram estabilidade visual (sem qualquer tipo de precipitação) e após análise no CLUE – DAD apresentaram a mesma constituição inicial.

Apesar da análise de flavonóides totais ter sido realizada com a rotina como padrão, os dados podem ser usados para discussão sobre a presença dessas substâncias nos extratos comerciais. Posteriormente, será realizada a quantificação da vitexina por CLUE-DAD, uma técnica mais precisa e confiável que, apesar de mais cara, utiliza menos amostra para obtenção da curva.

As análises obtidas por CLUE mostraram a facilidade em se trabalhar com pouca quantidade de amostra, maior sensibilidade, melhor delineamento dos sinais e dos respectivos espectros UV. Por meio dessa técnica foi possível verificar a presença do principal marcador (vitexina) no produto formado com os extratos a base de *Passiflora* obtidos e uma amostra padrão desse flavonoide.

REFERÊNCIAS

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. ; PASSOS, I. R. da S. [Online]. Espécies de maracujá: Caracterização e conservação da biodiversidade. In Faleiro, F. G. Junqueira, N. T. V. Braga, M. F. (eds). Maracujá Germoplama e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados**, 2005 p. 559-586.

Disponível em <http://www.cpac.embrapa.br/ivrtpm/homepage/capitulos/cap_22.pdf>.

Acesso em 24 jun 2011.

BRASIL, 1996. Presidência da República. Lei nº 9.279, de **LEI Nº 9.279, DE 14 DE MAIO DE 1996**. Regula direitos e obrigações relativos a propriedade industrial. Brasília, DF.

Disponível em : < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9279.htm>. Acesso em :4 mar 2013.

BRASIL, 1999. Congresso Nacional. **Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil (D.O.U.), Brasília, DF, 27 jan 1999. Seção 1, p. 1. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_9782_99.pdf>. Acesso em 22 ago 2011.

BRASIL, 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U. Brasília, DF, 2 jun 2003.

Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 10 ago 2011.

BRASIL, 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade pré-clínica de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

Disponível em: <<http://www.abfit.org.br/legislacao.shtml>>. Acesso em: 10 ago 2011.

BRASIL, 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 91, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

Disponível em: <<http://www.abfit.org.br/legislacao.shtml>>. Acesso em: 10 ago 2011.

BRASIL, 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 1, de 29 de julho de 2005**. Dispõe sobre o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. D.O.U. Brasília, DF. 1 ago 2005. Disponível em:

<<http://www.interfarma.org.br/site2/images/Site%20Interfarma/Informacoesdosetor/RE/Registro/2005/RE%2001-05.pdf>>. Acesso em 24 jun 2011.

BRASIL, 2006. Presidência da República. Lei nº 9.279, de **LEI Nº 5.813, DE 23 DE JUNHO DE 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em:

< <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/decretofitoterapicos.pdf>>. Acesso em: 4 mar 2013.

BRASIL, 2008a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IN nº. 5, de 11 de dezembro de 2008**. Determina a publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. D.O.U. Brasília, DF. 12 dez. 2008, p. 56-58. Disponível em: <http://www.anfarmag.org.br/integra.php?codigo=1274&codcategoria_menu=184>. Acesso em 24 jun 2011.

BRASIL, 2008b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 39, de 5 de junho de 2008**. Aprova o Regulamento para a realização de pesquisa clínica e dá outras providências. D.O.U. nº 147, Brasília, DF. 6 jun 2008, Seção 1, pág. 75. Disponível em:

<http://www.fiscolex.com.br/doc_1328450_RESOLUCAO_N_39_5_JUNHO_2008.aspx>. Acesso em: 10 ago 2011.

BRASIL, 2008c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº.95, de 11 de dezembro de 2008**. Regulamenta o texto de bula de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. 9 set 2009 Brasília, DF. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RDC_N_95_anvisa.pdf>. Acesso em 24 jun 2011

BRASIL, 2009a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IN nº. 2, de 30 de março de 2009**. Determina a publicação do Guia para notificação de Lotes-piloto de medicamentos. D.O.U. Brasília, DF. 01 abr 2009.

Disponível em: < <http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=210575>>. Acesso em: 20 ago 2011.

BRASIL, 2009b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº. 71, de 22 de dezembro de 2009**. Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos. D.O.U. Brasília, DF. 23 dez 2009.

Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/site2/images/.../RDC%2071-9Rotulagem.pdf>>. Acesso em: 20 nov 2011.

BRASIL, 2009c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº. 47, de 8 de setembro de 2009**. Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. D.O.U. 9 set 2009 Brasília, DF. Disponível em:

<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/102619-47.html>>. Acesso em 24 jun 2011

BRASIL, 2010a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil (D.O.U.) Nº 63, Brasília, DF, 5 de abril de 2010.

Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>>. Acesso em: 10 ago 2011.

BRASIL, 2010b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IN nº. 5, de 31 de março de 2010**. Fica estabelecida a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, DF. 5 abr. 2010, p. 91. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/IN_N_5_2010_anvisa.pdf>. Acesso em 24 jun 2011.

BRASIL, 2010c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº. 17, de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. D.O.U. Brasília, DF. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html>. Acesso em 24 jun 2011

BRASIL, 2010d. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº. 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA e dá outras providências. D.O.U. nº 46, Brasília, DF, 10 mar 2010, Seção 1, p. 52. Disponível em: <http://www.abiquifi.org.br/legislacao/do/do1-46-1_10.pdf>. Acesso em 24 jun 2011

BRASIL, 2010e. Ministério da Saúde. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**, 5ª edição, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 11 mar 2011.

BRASIL, 2013a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **BASE DE DADOS**. Disponível em:

<http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp>. Acesso em: 11 mai 2013.

BRASIL, 2013b. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **BASE DE DADOS**. Disponível em:

<<http://formulario.inpi.gov.br/MarcaPatente/jsp/servimg/servimg.jsp?BasePesquisa=Patentes>>. Acesso em: 11 mai 2013.

BRITISH HERBAL PHARMACOPOEIA, 4ª edição. Monographs: Passiflora, p. 148-149, 1996.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical substances, Passion Flower, Volume I, 2007.

CARVALHO, M. J.; PEDROSA, T. N.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; NUNEZ, C. V.; OHANA, D. T., PEREIRA, M. M.; LIMA, E. S.. Estudo farmacognóstico e atividade in vitro sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 1, p. 199 – 206, 2010.

CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, 92p, 1997.

CERVI, A. C.; JUNIOR, A. D. Passifloraceae do Brasil: Estudo do gênero *Passiflora* L. Subgênero *Distephana* (Juss.) Killip. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n. 55, p. 45-67, 2004.

CERVI, A. C.; RODRIGUES, W. A.. Nomenclatural and taxonomic review of Passifloraceae species illustrated and described by Vellozo in Flora Fluminensis. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1109-1111, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**. v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

COLOMBO, R.; LANÇAS, R. M.; YARIWAKE, J.H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography UV detection. **Journal of Chromatography A**, n. 1103, p. 118-124, 2006.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; CULLAGH, M. Study of *C*- and *O*-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 483-490, 2008.

COLOMBO, R.; PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J.H.; CULLAGH, M. Diferenciação de flavonóides isoméricos *C*-glicosilados presentes em extratos de plantas brasileiras usando LC-MS de massa exata. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J. B.; KAPCZINDKI, F.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical study of aqueous extract of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farm Bonaer.**; n.21, p. 5-8, 2002.

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

FIALLO, V.F.; HERNÁNDEZ, C.M.L.; FERRADÁ, C.A.R.; PÉREZ, P.S.; MÉNDEZ, G. Instructivo técnico del cultivo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Cubana del Plantas Medicinales**, v. 5, n. 3, p. 118-122, 2000.

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

GOSMANN, G.; PROVESNSI, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S.M.K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, s. 1, p. 88-99, abr. 2011.

GREGÓRIO, G.; ALBANO, O.; MARQUES, L.C.; AYALA, S.; CARVALHO, J. E.; COZZOLINO, S.; YARIWAKE, J. H. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. **Phytociência**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2006.

REIMBERG, M.C.H. Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonóides do cultivo de folhas de *Passiflora incarnata* L. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HARBONE, J.B., BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compound from plants**. London. Taylor e Francis, 1995.

HERBA PASSIFLORAE. In: WHO monographs on selected medicinal plants. 2007. v.3. p. 257 – 267.

Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241547024_eng.pdf>. Acesso em 24 jun 2011.

JAY, M. C-glycosylflavonoids. In: HARBONE, J.B. **The Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1996, p. 64.

LIMA, E.S.; SCHWERTZ, M.C.; SOBREIRA, C.R.C., BORRAS, M.R.L. Efeito hipoglicemiante da farinha do fruto de maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth) em ratos normais e diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.383-388, 2012.

MARÇO, P. H. & POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**. V.31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. v. 3, n.2, p. 74-76, 2005.

MARTINEZ, A. M. **Flavonóides**.

Disponível em: <<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>> Acesso em 19 jan 2013

MENDEZ, A. S. L.; SIMIONATO, N. O.; VALDUGA, A. T.; REGINATTO, F. H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 1, n. 32, p. 105-111, 2011.

MULLER, A. C.; MACEDO, M. F. Patentes de fitomedicamentos: como garantir o compartilhamento dos benefícios de P&D e do uso sustentável de recursos genéticos. **Revista Fitos**. V. 1, n. 2, p. 19-24, 2005.

MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; n. 37, p. 399-403, 2005.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L.B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 8, n. 90, p. 1229-1238, 2003.

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

NETER, J., KUTNER, M., NACHTSHEIM, C., LI, W. **Applied Linear Statistical Models**. 5 ed. Editora McGraw-Hill, 1396p. 2004.

OLIVEIRA, J. C. & RUGGIERO, C. [Online]. Espécies de Maracujá com potencial agrônômico. In Faleiro, F. G. Junqueira, N. T. V. Braga, M. F. (eds). Maracujá Germoplama e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados**, 2005 p. 141-158. Disponível em <http://www.cpac.embrapa.br/ivrtpm/homepage/capitulos/cap_6.pdf>. Acesso em 24 jun 2011.

PATEL, S. S.; SALEEM, T. S. M.; RAVI, V.; SHRESTHA, B.; VERMA, N. K.; GAUTHAMAN, K. *Passiflora incarnata* Linn: A phytopharmacological review. **International Journal of Green Pharmacy**, n.3, p. 277-280, 2009.

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.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, n. 15, p. 241-248, 2004.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos em extratos hidroalcolóicos de *Passiflora alata* Cryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 79, p: 7–10, 1998.

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

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

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

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**. n. 1112, p. 31-63, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Brasil: LTC, 2006. 508 p.

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

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. C. Cytogenetic Studies in Some Species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A Review Emphasizing Brazilian Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 2, p. 247 – 258, Mar / Apr. 2008.

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 320p.

WOHLMUTH, H., PENMAN, K.G., PEARSON, T., LEHMANN, R.P. Pharmacognosy and chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.

ZERAIK, M.L., PEREIRA, C.A.M., ZUIN, V.G., YAKIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ANEXO – Relação de produtos registrados na ANVISA e comercializados no País.

ANEXO – Relação de produtos registrados na ANVISA e comercializados no País (continua)

PRODUTO / CATEGORIA	APRESENTAÇÃO	FABRICANTE	UF	SUBSTÂNCIA ATIVA	STATUS
ACALMIL / Fitoterápico composto	Comprimido revestido	Multilab Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos Ltda - 92.265.552/0001-40 Indústria Farmacêutica Milian Ltda - 29.333.218/0001-40	RJ	<i>Passiflora incarnata</i> L. / extrato da folha de <i>Salix alba</i> (salgueiro) / extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i>	Comercializado
BRONQUIOGEN / Expectorante Fitoterápico composto	Solução oral	Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda. 51.603.488/0001-82	SP	<i>Caesalpinia ferrea</i> MART. / <i>Roripa nasturtium BECK</i> / <i>Mikania glomerata</i> SPRENG. / <i>Lantana camara</i> LINNÉ / <i>Passiflora alata CURTIS</i> / <i>Melissa officinalis</i> L. / <i>Myrospermum erythroxyllum</i> ALLEM.	Não comercializado Indeferimento de registro (Em desacordo com a legislação vigente)
CALMAN / Fitoterápico composto	Comprimido revestido Solução oral	Ativus Farmacêutica Ltda - 64.088.172/0001-41	SP	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Salix alba</i> L. / <i>Passiflora incarnata</i>	Comercializado
CALMANTE FARMAERVAS / Ansiolítico simples	Solução oral	Laboratório Farmaervas Ltda 60.565.520/0001-73	SP	<i>Melissa officinalis</i> L. / <i>Passiflora alata curtis</i> / <i>Valeriana officinalis</i> L. / <i>Lavandula officinalis chaix</i>	Não comercializado Indeferimento de registro (Em desacordo com a legislação vigente)
CALMAVITA / Fitoterápico simples	Cápsula gelatinosa dura	Laboratório Vitalab Ltda - 56.646.953/0001-86	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
CALMAPAX / Produtos naturais associados	Comprimido revestido / Solução oral / Razura	Instituto Terapeutico Delta LTDA - 33.173.097/0002-74	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L./ <i>Erythrina mulungu MART.</i> / <i>Matricaria chamomilla</i> L.	Comercializado
CALMI / Fitoterápicos associados	Solução oral	Laboratório Belém Jardim Ltda 17.299.140/0001-05	MG	<i>Matricaria chamomilla</i> L. / <i>Citrus aurantium L.</i> / <i>Cymbopogon citratus</i> STAPF. / <i>Passiflora alata</i> CURTIS	Comercializado
CALMINTHEO / Ansiolítico simples	Xarope	Theodoro F Sobral & Cia Ltda – 06.597.801/0001-62	PI	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
CALMIPLAN / Fitoterápico composto	Comprimido revestido	Bunker Ind Ftca Ltda – 47.100.862/0001- 50	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L. / <i>Salix alba</i> L. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Comercializado
CALMOPLANTAS / Fitoterápico simples Ansiolítico simples	Tintura / Cápsula gelatinosa dura	As Ervas Curam Ind Farmacêutica Ltda – 79.634.572/0001-82	PR	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
CALMOXIL / Ansiolítico simples	Comprimido revestido / Solução oral	H B Farma Laboratórios Ltda – 28.643.633/0001-37	RJ	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
CARDIOSETYL / Antiespasmódicos Fitoterápico composto	Solução oral	Laboratório Químico Farmacêutico Barros Ltda 21.573.449/0001-19	MG	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Leptolobio elegans</i> VOG.	Não comercializado Indeferimento de registro (Em desacordo com a legislação vigente)
CARDIOSETYL M / Fitoterápico simples Ansiolítico simples	Solução oral	Laboratório Químico Farmacêutico Barros Ltda 21.573.449/0001-19	MG	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado

ANEXO – Relação de produtos registrados na ANVISA e comercializados no País. (continuação)

PRODUTO / CATEGORIA	APRESENTAÇÃO	FABRICANTE	UF	SUBSTÂNCIA ATIVA	STATUS
DYRAJAIA / Fitoterápico composto	Tintura	Flora Medicinal J. Monteiro da Silva Ltda 02.007.074/0001-85	RJ	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Dorstenia multiformis</i>	Não encontrado
ELIXIR DE CEREUS COMPOSTO / Fitoterápicos associados	Solução oral	Laboratorio Kraemer Ltda 92.695.816/0001-03	RS	Tintura de <i>Crataegus</i> / <i>Cereus grandiflorus</i> MILL. / <i>Valeriana officinalis</i> L. / <i>Passiflora alata</i> CURTIS	Não encontrado
ELIXIR DE MARACUJÁ COMPOSTO FARMAERVAS / Fitoterápico composto	Elixir	Laboratório Farmaervas Ltda - 60.565.520/0001-73	SP	<i>Passiflora alata</i> Curtis / <i>Paulínia cupana</i> / <i>Valeriana officinalis</i> L.	Registro cancelado DOU Nº 136, segunda-feira, 18 de julho de 2005
ERVA SILVINA COMPOSTA / Fitoterápico composto	Elixir	Cibecol Industrial Farmacêutica Ltda 92.943.992/0001-09	RS	<i>Casearia sylvestris</i> SW. / <i>Aristolochia cymbifera</i> MARTIUS / <i>Passiflora alata</i> CURTIS	Registro cancelado DOU Nº 82, terça-feira, 2 de maio de 2006
FIMATOSAN / Produtos naturais associados	Solução oral	Laboratório Simões Ltda	RJ	<i>Caesalpinia ferrea</i> MART. / <i>Roripa nasturtium</i> BECK / <i>Mikania glomerata</i> SPRENG. / <i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Polypodium vulgare</i> / <i>Myrospermum erythroxyllum</i> ALLEM. / <i>Lantana camara</i> LINNÉ	Comercializado
FITOCALMIN / Fitoterápico simples	Cápsula gelatinosa dura	Pronatus Do Amaz.Ind. Com. Prod. Farm. Cosm. Ltda - 14.186.324/0001-70	AM	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Não encontrado
FLORINY / Ansiolíticos-Associações medicamentosas Fitoterápico composto	Comprimido revestido / Solução oral	Ativus Farmacêutica Ltda – 64.088.172/0001-41	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L. / <i>Salix alba</i> L. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Comercializado
MARACUJA GOTAS / Fitoterápico simples	Solução hidroalcoólica	Herbarium Laboratório Botânico Ltda – 78.950.011/0001-20	PR	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Não encontrado
MARACUJA CONCENTRIX / Fitoterápico composto Ansiolítico simples	Drágea simples / Solução oral	Germed Farmacêutica Ltda – 45.992.062/0001-65 Legrand Pharma Indústria Farmacêutica Ltda – 05.044.984/0001-26	SP	<i>Passiflora incarnata</i> / <i>Salix alba</i> L. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Comercializado
MARACUJÁ HERBARIUM / Ansiolítico simples	Cápsula gelatinosa dura / Comprimido revestido	Herbarium Laboratório Botânico Ltda – 78.950.011/0001-20	PR	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
MARACUGINA COMPOSTA / Fitoterápico composto	Solução oral / Comprimido revestido	Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A. 61.082.426/0002-07 DM Indústria Farmacêutica Ltda 67.866.665/0002-34 Hypermarcas S.A. 02.932.074/0001-91	SP	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L.	Comercializado

ANEXO – Relação de produtos registrados na ANVISA e comercializados no País. (continuação)

PRODUTO / CATEGORIA	APRESENTAÇÃO	FABRICANTE	UF	SUBSTÂNCIA ATIVA	STATUS
NERVITON / Fitoterápicos associados	Elixir / Cápsula gelatinosa dura	Laboratório Cangeri Ltda - 92.751.965/0001-34	RS	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Ptychopetalum olacides</i> BENTH / <i>Cola nitida</i> SCHOTT & ENDL. / <i>Paulinia cupana</i> / <i>Cloridrato de tiamina</i>	Comercializado
PASALIX / Fitoterápico composto	Drágea simples / Solução oral / Comprimido revestido	Marjan Indústria E Comércio Ltda – 60.726.692/0001-81	SP	<i>Salix alba</i> L. / extrato seco de <i>Passiflora</i> / extrato de <i>Crataegus oxyacantha</i>	Comercializado
PASIC / Fitoterápico composto	Comprimido revestido / Aerossol oral	Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. – 44.734.671/0001- 51	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Salix alba</i> L.	Comercializado
PASSANEURO / Fitoterápico composto Ansiolíticos- Associações medicamentosas	Comprimido revestido / Solução oral	Bunker Indústria Farmacêutica Ltda. – 47.100.862/0001-50	SP	Extrato seco de <i>Passiflora</i> / <i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Matricaria chamomilla</i> L.	Comercializado
PASSICALM / Fitoterápico composto	Solução oral	Laboratórios Gemballa Ltda – 85.776.524/0001-21	SC	<i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Valeriana</i> <i>officinalis</i> L. / <i>Passiflora alata</i> CURTIS	Não encontrado
PASSIENE / Fitoterápico simples	Xarope	Herbarium Laboratório Botânico Ltda – 78.950.011/0001-20	PR	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
PASSIFLORA / Fitoterápico composto	Tintura	Flora Medicinal J. Monteiro da Silva Ltda 02.007.074/0001-85	RJ	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Erythrina mulungu</i> MART.	Não encontrado
PASSIFLORA COMPOSTA / Fitoterápico composto	Drágea simples / Solução oral	Infabra Indústria Farmacêutica Brasileira Ltda - 42.341.149/0001-84	RJ	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Passiflora</i> <i>incarnata</i> L. / <i>Erythrina mulungu</i> MART.	Não encontrado
PASSIFLORA COMPOSTA / Fitoterápico composto	Elixir / Solução dermatológica	Luper Indústria Farmacêutica Ltda 61.299.111/0001-35	SP	<i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Melissa officinalis</i> L. / <i>Passiflora alata</i> CURTIS	Não encontrado
PASSIFLORA DA ÍNDIA / Produtos Naturais Associados	Elixir	Laboratório Farmacêutico Flora da Índia Ltda. 87.104.170/0001-02	RS	<i>Passiflora alata</i> CURTIS/ <i>Atropa belladonna</i> / <i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Citrus limetta</i> Risso / <i>Cereus grandiflorus</i> MILL.	Não encontrado
PASSIFLORA KLEIN / Fitoterápico simples Ansiolítico simples	Tintura	Laboratórios Klein Ltda - 92.762.277/0001-70	RS	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Não encontrado
PASSIFLORA ORIENT / Fitoterápico simples	Cápsula gelatinosa dura	Orient Mix Fitoterápicos Do Brasil Ltda. - 73.657.876/0001-89	RJ	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
PASSIFLORINE / Fitoterápico composto	Drágea simples / Solução oral	Produtos Farmacêuticos Millet Roux - 33.388.182/0001-79	RJ	<i>Passiflora incarnata</i> L./ <i>Salix alba</i> L. / <i>Crataegus oxyacantha</i> L. / gluconato de cálcio / colecalfiferol / peptídeos de baixo peso molecular / hipossulfito de magnésio	Comercializado
PHYTOCALM / Fitoterápico composto	Xarope / Cápsula gelatinosa dura	Laboratório Catarinense S.A. 84.684.620/0001-87	SC	<i>Passiflora incarnata</i> L. / <i>Valeriana officinalis</i> L. / <i>Matricaria chamomilla</i> L. / <i>Crataegus</i> <i>oxyacantha</i> L. / <i>Erythrina mulungu</i> MART.	Não encontrado

ANEXO – Relação de produtos registrados na ANVISA e comercializados no País. (conclusão)

PRODUTO / CATEGORIA	APRESENTAÇÃO	FABRICANTE	UF	SUBSTÂNCIA ATIVA	STATUS
RITMONEURAN RTM / Ansiolítico simples Fitoterápico simples	Cápsula gelatinosa dura Solução oral	Kley Hertz S/A Indústria e Comércio 92.695.691/0001-03	RS	Extrato seco de <i>Passiflora</i>	Comercializado
RITMONEURAN / Fitoterápico composto	Cápsula gelatinosa dura Solução oral	Kley Hertz S/A Indústria e Comércio 92.695.691/0001-03	RS	<i>Passiflora alata</i> CURTIS / <i>Erythrina mulungu</i> MART. / <i>Leptolobio elegans</i> VOG / <i>Adonis</i> <i>vernalis</i>	Comercializado
SALSAPARILHA COMPOSTO / Produtos naturais associados	Elixir	Cibecol Industrial Farmacêutica Ltda - 92.943.992/0001-09	RS	<i>Smilax japicanga</i> GRISEB. / <i>Baccharis</i> <i>genistelloides</i> PERSON / <i>Plantago major</i> L. / <i>Aristolochia cymbifera</i> MARTIUS / <i>Passiflora</i> <i>incarnata</i> L.	Comercializado
SEAKALM / Fitoterápico composto	Comprimido revestido	Natulab Laboratório S.A – 02.456.955/0001-83	BA	<i>Passiflora incarnata</i> / <i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Salix alba</i> L.	Não encontrado
SEAKALM / Fitoterápico simples	Comprimido revestido	Natulab Laboratório S.A – 02.456.955/0001-83	BA	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
SEDACAL / Fitoterápico simples	Cápsula gelatinosa dura	Luciomed Farmacêutica Do Brasil Ltda - 01.845.448/0001-79	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
SEDANUS / Produtos Naturais Associados	Solução oral	DM Indústria Farmacêutica Ltda - 67.866.665/0002-34	SP	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Passiflora incarnata</i> L. / <i>Erythrina mulungu</i> MART.	Não encontrado
SERENUS / Fitoterápicos associados	Comprimido revestido	Biolab Sanus Farmacêutica Ltda - 49.475.833/0001-06	SP	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Passiflora incarnata</i> / <i>Salix alba</i> L.	Comercializado
SINTOCALMY / Ansiolítico simples	Comprimido revestido	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. - 60.659.463/0001-91	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
SOMINEX / Fitoterápico composto	Comprimido simples	EMS S/A - 57.507.378/0001-01	SP	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Valeriana officinalis</i> L. / <i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
SOMINEX COMPOSTO / Fitoterápico composto Ansiolítico Associações medicamentosas	Comprimido simples	EMS S/A - 57.507.378/0001-01	SP	<i>Crataegus oxyacantha</i> L. / <i>Valeriana officinalis</i> L. / <i>Passiflora incarnata</i> L.	Registro cancelado Resolução - RE Nº 2.692, de 22 de junho de 2011 < www.anvisa.gov.br/legis/suplemento/27062011_suplemento_1.pdf >
TENSART / Ansiolítico simples Fitoterápico simples	Comprimido revestido / Solução oral	Ativus Farmacêutica Ltda - 64.088.172/0001-41	SP	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado
ZEN / Ansiolítico simples	Cápsula gelatinosa dura / solução oral	Laboratório Químico Farmacêutico Tiaraju Ltda. - 94.022.654/0001-60	RS	<i>Passiflora incarnata</i> L.	Comercializado

Fontes: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto; <http://www.consultaremedios.com.br>, acessados em 26 de maio de 2013.