



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DO
MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora nitida* Kunth)**

MARIA JOSÉ DE CARVALHO

**MANAUS
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

MARIA JOSÉ DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DO
MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora nitida* Kunth)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Meneses Pereira

**MANAUS
2008**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Carvalho, Maria José de

C331c Caracterização fitoquímica e atividades farmacológicas de extratos das folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth) / Maria José de Carvalho. - Manaus: UFAM, 2008. 107 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria de Meneses Pereira

1. Plantas medicinais 2. Farmacologia 3. *Passiflora nitida* Kunth I. Lima, Emerson Silva II. Pereira, Maria de Meneses III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 634.776.3 (811.3)(043.3)

MARIA JOSÉ DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DO
MARACUJÁ-DO-MATO (*Passiflora nitida* Kunth)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “Etnomedicina e Biodiversidade”.

Aprovada em 28 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa, Membro Interno
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof.^a Dra. Maria da Paz Lima, Membro Externo
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

À minha amável mãe e amiga Maria da Conceição,
ao meu precioso filho Lucas e à minha inesquecível
avó Maria José (*in memoriam*), em pequeno sinal de
meu grande amor, carinho e ilimitada gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força para superar todos os obstáculos;

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu filho, pelo apoio em todos os aspectos;

Ao Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas (MPT/UFAM), pela oportunidade;

À UFAM, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), à Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), à Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT) e à Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM), pela disponibilização de recursos humanos, materiais e estruturais ao curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro à pesquisa;

Aos Professores do MPT, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UFAM e aos do INPA, **em especial ao meu orientador, Dr. Emerson Silva Lima, à minha co-orientadora Dra. Maria de Meneses Pereira** e aos Doutores Antônio Batista da Silva, Carlos Cleomir de Souza Pinheiro, Cecília Verônica Nunez, Cynthia Tereza Corrêa da Silva, Débora Teixeira Ohana, Ila Maria de Aguiar Oliveira, Julia Ignez Salem, Maria Lúcia Belém Pinheiro, Maria Rosa Lozano Borrás, Marne Carvalho de Vasconcellos, Paulo Roberto Castro da Costa, Pierre Alexandre dos Santos, Risonilce Fernandes Silva de Sousa, Sebastião Ferreira Marinho (*in memoriam*), Sheyla Maria Rondon Caixeta Bonfim, Tatiane Pereira de Souza e Maria Zeli Moreira Frota, pela atenção e enorme contribuição que prestaram para a concretização deste trabalho, não apenas pela orientação e confiança (inclusive quanto ao acesso a seus laboratórios e materiais), mas também pelo incentivo e amizade;

À Prof^ª. Dra. Ana Mena Barreto Bastos (Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas - CEFET) e aos alunos da turma do 3^º período (2^º sem./2006) do Curso Superior de Tecnologia da Química de Alimentos (TQA), pelas experiências compartilhadas, quando do estágio de docência na disciplina Química Analítica I;

À comunidade ribeirinha do Careiro-Castanho, município do Careiro (AM), pelo fornecimento da matéria-prima vegetal e, ao Sr. Francisco Medeiros Cavalcante, pelo criterioso trabalho de coleta da planta;

À equipe do Herbário do INPA, pela minuciosa identificação da espécie da planta;

Aos Professores da UFAM, Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva (Laboratório de Cromatografia/Departamento de Química) e MSc. Antonio Fábio Lopez de Souza (Laboratório de Tecnologia do Pescado/Dep. de Ciências Pesqueiras), pela gentil liofilização de extratos;

Ao Prof. Fábio Tonissi Moroni e à Técnica de Laboratório Odiluzia Maria Saldanha de Oliveira do Biotério Central da UFAM, pelo fornecimento dos animais utilizados;

À Dra. Maria José Dantas Coelho (Laboratório de Fracionamento/HEMOAM), pelo fornecimento de PRP (plasma rico em plaquetas);

Ao Dr. Róbson Miguel de Araújo Negreiros, por toda a ajuda oferecida no decorrer deste curso, pelos conhecimentos transmitidos sobre o manuseio dos animais, pela disponibilização do Laboratório de Fundamentos de Cirurgia e Anestesia da Faculdade de Medicina da UFAM, entre outros;

À equipe da Prof^ª. Dra. Maria de Meneses Pereira: Fernanda Guilhon Simplicio, Leidyana Moraes da Costa, Maria Christina dos Santos, Viviane Alencar dos Santos e em especial, à Tatiana do Nascimento Pedrosa, pela colaboração com testes realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da FCF/UFAM;

À equipe do Prof. Dr. Emerson Silva Lima: Carlos Vitor Montefusco-Pereira, Carolina Marinho da Costa, Claudio Fernandez Araújo, Débora Cristina Lima Fernandes, Eduardo César Lins Carlos, Fabiano de Sousa Vargas, Leonardo Augusto Afonso Pontes, Leslye Luciana Reis Bezerra, Melca Gabriela Souza Printes, Milena Rodrigues Soares, Vanessa Xavier de Oliveira e em especial, à Téc. de Patologia Clínica Srta. Roseane Gomes da Silva, pela colaboração com testes realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF/UFAM;

À equipe do Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro e da Prof^ª. Dra. Cecília Verônica Nunez: Ana de Souza Lima, Danielle Rachel Silva dos Santos, David Ribeiro da Silva, Edivan Silva Rodrigues, Gabrielly Galdino Conrado, Jaqueline de Oliveira Souza, Joyce Freitas de Menezes, Júlio Nino de Sousa Neto e Mertilha Murari Brenner, pela colaboração com testes realizados no Laboratório de Farmacologia e no Laboratório de Bioprospecção da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN/INPA);

Aos funcionários da FCF, em especial às Sras. Edilamar Rocha Lino da Silva, Imarita Socorro de Menezes, Iolanda do Vale Feitosa e Maria Dorotéia Couto, aos Srs. Emibaelson José Lopes Pereira, Francisco Carvalho Ribeiro, Francisco Geraldo Rocha de Oliveira, Jardel Stélio Reis Ferreira, José Maria Tavares Guimarães, Jurandir Lima de Araújo, Lourival Araújo de Lima, Waldomiro de J. V. Filho e, ao meu primo Vanderlette Simão de Carvalho (*in memoriam*), pelo apoio;

À Coordenação do curso de MPT: Prof. Dr. Nelson Abraham Fraiji, Prof^ª. Dra. Julia Ignez Salem, Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Prof^ª. Dra. Maria Cristina dos Santos, e, aos servidores Rafaela Cristina Fernandes Pinheiro, Ronaldo Pontes Ferreira e Dulciana Grangeiro, pela exímia organização do curso e pela incessante busca por melhorias;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo reconhecimento da importância do curso e de tal esforço;

Aos colegas do Mestrado, pelo companheirismo e respeito mútuo, em especial à Dra. Adriana Vallejo Restrepo, ao Dr. Arnaldo Gomes da Costa Junior, à Dra. Luana Lins da Silva e ao Dr. Róbson Miguel de Araújo Negreiros, pelo incentivo e, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

Plantas amazônicas são usadas terapeuticamente em diversas condições patológicas. O uso do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) é descrito na literatura para tratar doenças do SNC, cardiovasculares, processos inflamatórios e dor. No entanto, a espécie *Passiflora nitida* Kunth comumente conhecida como “maracujá-do-mato” e usada pela população local para distúrbios gastrointestinais, praticamente não foi estudada até o momento. Considerando o potencial farmacológico do gênero, este trabalho teve por objetivo investigar fitoquimicamente a espécie e estudar os efeitos sobre a coagulação sanguínea, agregação plaquetária, inflamação, nocicepção e toxicidade de extratos de suas folhas. Os extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) foram obtidos pelo processo de maceração estática à temperatura ambiente. Os solventes foram eliminados por meio de rotaevaporador, sob pressão reduzida (EE e EH) e por meio de liofilização (EA). Para a caracterização fitoquímica foram realizados testes com: prospecção fitoquímica, cromatografia em camada delgada, ressonância magnética nuclear e infravermelho. O efeito dos extratos sobre a coagulação foi avaliado pelos testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) ($n = 2-7$). O efeito sobre a agregação plaquetária foi avaliado pelo método *in vitro* de Born e Cross (1963), usando adenosina difosfato (ADP) e adrenalina (ADR) como indutores da agregação ($n = 2-5$). O efeito do EE sobre a inflamação foi avaliado pelo teste do edema de pata em ratos *Wistar*, enquanto o efeito sobre a nocicepção foi avaliado pelos testes de contorções e da placa quente em camundongos BALB/c ($n = 5$, via oral - v.o.). A indometacina foi utilizada como padrão nos testes sobre a inflamação e de contorções e o citrato de fentanila, no teste da placa quente. A citotoxicidade dos extratos foi avaliada frente à *Artemia salina*. A toxicidade do EE foi avaliada pelas administrações intraperitoneal (i.p.) ou oral em camundongos e a dose letal 50 (DL₅₀) foi determinada para a via i.p. Os resultados foram avaliados pela análise de variância, complementada pelo teste de Student-Newman-Keuls ou Tukey ($P < 0,05$) e expressos como média \pm erro padrão da média, em relação aos controles. Os extratos EA, EE e EH apresentaram atividade coagulante pelo teste do TP e o EE apresentou atividade anticoagulante para o TTPa. Quando induzidos por ADP, os extratos EA, EE e EH apresentaram valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀, $\mu\text{g/mL}$) de $450,5 \pm 50,7$; $511,2 \pm 35,5$ e $394,4 \pm 8,9$, respectivamente, e quando induzidos por ADR apresentaram valores de $438,7 \pm 5,2$; $21,0 \pm 1,9$ e $546,9 \pm 49,9$, respectivamente. No teste do edema de pata, os grupos tratados com EE nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg apresentaram inibição do edema de 6,0; 6,0 e 72,2 %, respectivamente. Houve um menor número de contorções nos grupos tratados com 25 e 50 mg/kg no teste de contorções ($0,6 \pm 0,4$ e $0,2 \pm 0,2$, respectivamente), comparado ao grupo controle ($9,0 \pm 2,3$). No teste da placa quente, a dose de 25 mg/kg aumentou o tempo de latência ($10,9 \pm 0,7$ s), comparada ao grupo controle ($5,0 \pm 0,6$ s). Os extratos EA, EE e EH não apresentaram citotoxicidade frente à *Artemia salina*. O EE não apresentou toxicidade v.o. até a dose máxima de 5 g/kg, porém nos testes via i.p., a DL₅₀ foi de 466,6 mg/kg. No entanto, o *screening* fitoquímico indicou também a presença de cumarinas, compostos cianogênicos e glicosídeos cardioativos, o que torna necessária a realização de estudos químicos e toxicológicos mais detalhados, visando utilização segura terapeuticamente.

Palavras chave: *Passiflora nitida* Kunth, Constituintes Químicos, Estudo Farmacológico

ABSTRACT

Amazonian plants have been used therapeutically in several pathological conditions. The use of *Passiflora* genus (Passifloraceae) has been described in the literature to treat CNS and cardiovascular diseases, inflammatory processes and pain. However, the *Passiflora nitida* Kunth species, commonly known as “maracujá-do-mato” and used by local population for gastrointestinal disorders, had scarcely been studied so far. Considering the pharmacological potential of the genus, this study aimed to phytochemically investigate the species and studying effects on the blood coagulation, platelet aggregation, inflammation, nociception and toxicity of extracts from its leaves. The aqueous (AE), ethanol (EE) and hexane (HE) extracts were obtained by static maceration process at room temperature. The solvents were eliminated by rotaevaporator under reduced pressure (EE and HE) and by freeze-drying process (AE). Phytochemical screening, thin-layer chromatography, nuclear magnetic resonance and infrared were carried out to the phytochemical characterization. The effect of the extracts on the coagulation was evaluated by the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) tests ($n = 2-7$). The effect on the platelet aggregation was evaluated by the *in vitro* method of Born and Cross (1963), using adenosine diphosphate (ADP) and adrenaline (ADR) as inducers of aggregation ($n = 2-5$). The effect of EE on the inflammation was evaluated by paw edema test in *Wistar* rats, while the effect on the nociception, was evaluated by the writhing and hot-plate tests in BALB/c mice ($n = 5$, orally - v.o.). Indometacin was used as standard drug on the inflammation and writhing tests and fentanyl citrate was used on the hot-plate test. The cytotoxicity of the extracts was evaluated on the brine shrimp test. The toxicity of EE was evaluated by the intraperitoneal (i.p.) or oral administrations in mice and the lethal dose 50 (LD₅₀) was determined to the i.p. route. The results were evaluated by analysis of variance, followed by the Student-Newman-Keuls or Tukey tests ($P < 0.05$) and expressed as mean \pm standard error of the mean in relation to the controls. The AE, EE and HE extracts showed coagulant activity by the PT test and the EE showed anticoagulant activity to the aPTT. When induced by ADP, the AE, EE and HE extracts showed inhibitory concentration 50 % values (IC₅₀, $\mu\text{g/mL}$) of 450.5 ± 50.7 , 511.2 ± 35.5 and 394.4 ± 8.9 , respectively, and when induced by ADR showed values of 438.7 ± 5.2 , 21.0 ± 1.9 and 546.9 ± 49.9 , respectively. On the paw edema test, groups treated with EE at 50, 100 and 150 mg/kg doses showed edema inhibition of 6.0, 6.0 and 72.2 %, respectively. There were fewer writhing in the groups treated with 25 and 50 mg/kg on the writhing test (0.6 ± 0.4 and 0.2 ± 0.2 , respectively), compared to the control group (9.0 ± 2.3). On the hot-plate test, the 25 mg/kg increased the latency time (10.9 ± 0.7 s), compared to the control group (5.0 ± 0.6 s). The AE, EE and HE extracts showed no cytotoxicity on the brine shrimp test. The EE shows no toxicity v.o. until the maximum dose of 5 g/kg), however on the i.p. tests, the LD₅₀ was 466.6 mg/kg. However, the phytochemical screening indicated also the presence of coumarins, cyanogen compounds and cardioactive glycosides, which makes necessary to perform more detailed chemical and toxicological studies aiming safe usage in terms therapeutics.

Keywords: *Passiflora nitida* Kunth, Chemical Constituents, Pharmacological Study

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia externa do maracujá-do-mato (<i>Passiflora nitida</i> Kunth)	24
Figura 2	Fruto do maracujá-do-mato (<i>Passiflora nitida</i> Kunth)	25
Figura 3	<i>Passiflora nitida</i>	38
Figura 4	Espécime de <i>P. nitida</i> Kunth da coleção do Herbário do INPA	38
Figura 5	Espécime de <i>P. nitida</i> Kunth coletado e comparado	38
Figura 6	Processo de preparação da MPV (folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth)	39
Figura 7	Processo de concentração dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	41
Figura 8	Processo de CCD do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	54
Figura 9	Espectrômetro de IV	55
Figura 10	Espectrômetro de RMN	56
Figura 11	Testes de coagulação (TP e TTPa)	58
Figura 12	Teste de agregação plaquetária	62
Figura 13	Teste do edema de pata	64
Figura 14	Teste de contorções	66
Figura 15	Teste da placa quente	68
Figura 16	Teste de citotoxicidade dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth frente à <i>Artemia salina</i>	70
Figura 17	Testes de toxicidade do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	72
Figura 18	Delineamento experimental	73
Figura 19	Espectro na região do IV do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	77

CONTINUAÇÃO LISTA DE FIGURAS

Figura 20	Expansões nas regiões entre: (A) δ_H 4,46-5,68 e (B) δ_H 5,8–8,4 do espectro de RMN de 1H do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth (D ₂ O, 500 MHz)	79
Figura 21	Inibição do volume do edema de pata	82
Figura 22	Inibição de contorções	83
Figura 23	Limiar nociceptivo térmico	84
Figura 24	Análise macroscópica de camundongos tratados com extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth na dose de 1 g/kg (i.p.)	88
Figura 25	DL ₅₀ do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth (i.p.)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies do gênero <i>Passiflora</i> (Passifloraceae) e suas respectivas utilizações	20
Tabela 2	Testes preliminares das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	42
Tabela 3	Testes realizados na investigação fitoquímica preliminar das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth segundo Matos (1997)	43
Tabela 4	Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	44
Tabela 5	Teste para leucoantocianidinas, catequinas (taninos catéquicos) e flavanonas	45
Tabela 6	Reagentes empregados na detecção de compostos antioxidantes e fenólicos no extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	53
Tabela 7	Resultados da abordagem fitoquímica das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth	75
Tabela 8	Revelações cromatográficas do extratos brutos das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth frente aos reagentes específicos para compostos antioxidantes e fenólicos	76
Tabela 9	Efeitos de extratos brutos das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth nos testes de TP e TTPa	80
Tabela 10	Efeitos de extratos brutos das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth na agregação plaquetária induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR	81
Tabela 11	Valores de CI ₅₀ dos extratos brutos das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth na agregação plaquetária induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR	81
Tabela 12	Atividade citotóxica de extratos brutos das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth frente à <i>Artemia salina</i>	85
Tabela 13	Toxicidade do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth em camundongos	86
Tabela 14	Efeitos gerais do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth em camundongos	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
ADR	Adrenalina
AINE	Agentes antiinflamatórios não-esteroidais
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca⁺⁺	Íons calico
CaCl₂	Cloreto de calico
Ce(SO₄)₂	Sulfato cérico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD₃OD	Metanol deuterado
CI₅₀	Concentração inibitória 50 %
CL₅₀	Concentração letal 50
COX	Ciclooxygenase
CPPN	Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais
DL₅₀	Dose letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
D₂O	Água deuterada
EA	Extrato aquoso das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth
eds	Editores
EE	Extrato etanólico das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth
EH	Extrato hexânico das folhas de <i>Passiflora nitida</i> Kunth
EPM	Erro padrão da média
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FeCl₃	Cloreto férrico
g	Gramas
g/kg	Gramas por quilograma
gt	Gota
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico

CONTINUAÇÃO LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Hz	Hertz
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IV	Infravermelho
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
i.p.	Intraperitoneal
KOH	Hidróxido de potássio
LOX	Lipoxigenase
M	Molaridade (Mol/litro)
mg/kg	Miligrama por quilograma
min	Minuto
mL	Mililitro
MPV	Matéria-prima vegetal
n	Número de amostras
NaOH	Hidróxido de sódio
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NH₄OH	Hidróxido de amônio
NO	Óxido nítrico
P.	<i>Passiflora</i>
PG	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
PLA₂	Fosfolipase A ₂
ppm	Parte por milhão
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
s.pl.	Subplantar
Supl.	Suplemento
Suppl	Supplement
TP	Tempo de protrombina

CONTINUAÇÃO LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TXA₂	Tromboxano A ₂
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
v.o.	Via oral, gavagem
μg	Micrograma
μg/kg	Micrograma por quilograma
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μmol/L	Micromol por litro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Gênero <i>Passiflora</i>	20
2.1.1 <i>Passiflora nitida</i> Kunth	24
2.1.2 Atividades farmacológicas	25
2.2 Avaliação da Coagulação Sangüínea e da Agregação Plaquetária	27
2.3 Avaliação da Inflamação e da Nocicepção	29
2.4 Toxicidade	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos	34
4. METODOLOGIA	35
4.1 Modelo de Estudo	35
4.2 Procedimentos Éticos	35
4.3 Equipamentos, Materiais, Fármacos e Reagentes	36
4.3.1 Equipamentos	36
4.3.2 Materiais	37
4.3.3 Fármacos e reagentes	37

CONTINUAÇÃO SUMÁRIO

4.4 Operações Preliminares	38
4.4.1 Coleta da amostra	38
4.4.2 Identificação da espécie	38
4.4.3 Preparação da matéria-prima vegetal (MPV)	39
4.4.4 Obtenção dos extratos	40
4.5 Estudos Fitoquímicos	42
4.5.1 Investigação fitoquímica preliminar	42
4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	52
4.5.3 Espectrometria no infravermelho (IV)	55
4.5.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)	56
4.6 Estudos Farmacológicos	57
4.6.1 Unidades experimentais	57
4.6.2 Efeito sobre a coagulação sanguínea	57
4.6.3 Efeito sobre a agregação plaquetária	60
4.6.4 Efeito sobre a inflamação	63
4.6.5 Efeito sobre a nocicepção	65
4.7 Estudos de Toxicidade	69
4.7.1 Teste de citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	69
4.7.2 Testes de toxicidade em roedores	70
4.8 Delineamento Experimental	73
4.9 Análise dos Resultados	74

CONTINUAÇÃO SUMÁRIO

5. RESULTADOS	75
5.1 Estudos Fitoquímicos	75
5.1.1 Investigação fitoquímica preliminar	75
5.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	76
5.1.3 Espectrometria no infravermelho (IV)	77
5.1.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹ H (RMN de ¹ H)	78
5.2 Estudos Farmacológicos	80
5.2.1 Efeito sobre a coagulação sanguínea	80
5.2.2 Efeito sobre a agregação plaquetária	80
5.2.3 Efeito sobre a inflamação	82
5.2.4 Efeito sobre a nocicepção	83
5.3 Estudos de Toxicidade	85
5.3.1 Teste de citotoxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	85
5.3.2 Testes gerais de atividade farmacológica, toxicidade aguda e determinação da dose letal 50 (DL ₅₀)	86
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICES	107
APÊNDICE A - Ficha de Avaliação de Atividade Exploratória	107

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são empregadas na prevenção, tratamento, cura de distúrbios, disfunções ou doenças como primeiro recurso medicinal desde a Antiguidade, tendo representado a base da terapêutica durante muitos anos. São usadas popularmente contra várias doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônico-degenerativos, emagrecimento, para a regulação da menstruação, com intuito abortivo e até como antídoto ao veneno de cobra (GARCIA et al., 1995; MACIEL et al., 2002; SILVA; CECHINEL-FILHO, 2002).

O interesse da população em drogas de origem vegetal e o estímulo ao uso destas deve-se a várias razões, entre as quais, a dificuldade de acesso aos medicamentos industrializados, os efeitos colaterais da terapêutica convencional, além do conceito equivocado de que produtos naturais não fazem mal à saúde (RATES, 2001; MACIEL et al., 2002; TOLEDO et al., 2003). No entanto, a grande maioria das plantas medicinais é utilizada de forma empírica, sem a devida comprovação científica de suas virtudes farmacológicas.

Os produtos naturais servem como recurso para a inovação na elaboração de drogas, tendo um papel significativo na descoberta e compreensão de vias celulares específicas de doenças (NEWMAN et al., 2003; GULLO et al., 2006). Contudo, a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003).

As plantas podem ser submetidas à extração e procedimentos de purificação sucessivos para isolar as combinações de substâncias de interesse, que podem por si só ser ativas e usadas diretamente como uma droga ou podem ser usadas como precursores em

processos sintéticos ou modelos para síntese total de novas drogas, com atividades farmacológicas bem definidas ou em estudos de relação estrutura-atividade (RATES, 2001).

O medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja composição não inclua substâncias ativas de qualquer outra origem, nem as associações destas com extratos vegetais, é denominado fitoterápico. Um fitoterápico também é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase III (ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004a).

Apesar de diversas plantas terem sido estudadas do ponto de vista fitoquímico e de se conhecer bastante sobre os seus usos populares, a realização de ensaios bioquímicos e biológicos para a identificação de atividades farmacológicas em espécies amazônicas é uma área pouco desenvolvida. Partindo-se dessa premissa, escolheu-se como objeto deste estudo, o maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth), originário da Amazônia, cujas propriedades terapêuticas praticamente não tinham sido estudadas até o momento. Estudos já comprovaram algumas propriedades farmacológicas em outras espécies do gênero *Passiflora*, tais como antiinflamatória, antinociceptiva, ansiolítica, sedativa e antihipertensiva, as quais foram relacionadas principalmente à presença de compostos flavonoídicos (SOULIMANI et al., 1997; DI STASI et al., 2002; DHAWAN; SHARMA, 2002b, 2003; DHAWAN et al., 2004; BENINCÁ et al., 2007). Tendo em vista o potencial terapêutico do gênero, realizaram-se ensaios visando elucidar alguns aspectos fitoquímicos, farmacológicos e de toxicidade da *Passiflora nitida* Kunth.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae, possui cerca de 70 gêneros e 600 espécies vegetais. Mais da metade dessas espécies está incluída no gênero *Passiflora*, tendo distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais e uso popular em diversas áreas (HOPKINS; SOUZA, 1999; DI STASI et al., 2002; DHAWAN et al., 2004; SANTOS et al., 2005; MOBOT - MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2008).

Várias espécies do gênero *Passiflora*, denominadas popularmente como maracujá, são empregadas extensivamente na medicina popular em muitos países, sob diversas formas farmacêuticas. Algumas espécies deste gênero e suas respectivas utilizações estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Espécies do gênero *Passiflora* e suas respectivas utilizações

Espécie	Utilização	Parte da planta	Forma utilizada
<i>Passiflora actinia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sedação³³ 	Folha	Extratos hidro-alcoólico e metanólico
<i>P. alata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aterogenicidade, cardioproteção¹⁹ • Hipnose²¹ • Inflamação³⁸ 	Folha	Extrato aquoso
	<ul style="list-style-type: none"> • Insônia¹⁵ 		Extrato etanólico
	<ul style="list-style-type: none"> • Ansiedade^{4, 31} • Hipnosedação³¹ • Antioxidação³² 		Extrato hidro-alcoólico ³¹
	<ul style="list-style-type: none"> • Algumas condições dolorosas, ansiedade, distúrbios nervosos da menopausa, insônia, irritação da mucosa respiratória, tosse seca¹⁵ 	-	Solução líquida de uso oral (3 x dia)
	<ul style="list-style-type: none"> • Dor, redução da atividade motora espontânea¹⁵ 	-	-

(continuação da Tabela 1)

Espécie	Utilização	Parte da planta	Forma utilizada
<i>P. caerulea</i>	• Indução de vômito, pneumonia (antimicrobiano moderado) ¹⁵	Folha	-
	• Ansiedade, sedação ¹⁵	Fruto	
	• Diurético, sedação, verminose ¹⁵	Raiz	
	• Espasmo, insônia (devida diversas condições nervosas, mas não à dor) ¹⁵	-	
<i>P. capsularis</i>	• Emenagogo ¹⁵	-	-
<i>P. coccinia</i>	• Problemas cardíacos, sedação ¹⁸	Folha	Chá
	• Conjuntivite ²⁵	Galho	Seiva
<i>P. contrayerva</i>	• Antídoto, obstrução, revigoração ¹⁵	-	-
<i>P. coriacea</i>	• Antioxidante ⁵	Casca, caule e folha	Extrato hexânico
<i>P. edulis</i>	• Hipertensão ²⁶	Casca	Extrato metanólico
	• Disenteria, hipertensão ¹⁵	Folha	Chá
	• Inflamação ^{6, 29, 38}		Extrato aquoso
	• Leishmaniose ⁷		Extrato etanólico
	• Dor, febre, inflamação ³⁴		
	• Hipnose, sedação ³⁶		
	• Cicatrização de feridas e inflamação ^{8, 22-24, 35}		Extrato hidro-alcoólico
	• Antioxidante ³²		
	• Calmante (preparador para o sono tranquilo) ⁹		Infusão: 2 colheres (sopa) de folhas secas de maracujá para 1 xícara de água (tomar uma xícara no começo da noite e outra no momento de deitar-se para dormir), suco
	• Ansiedade, nervosismo ⁴		-
• Carcinoma gástrico, constipação, estimulação digestiva ¹⁵	Fruto		-
• Insônia ¹⁵	Partes aéreas	Pós preparados em solução hidro-alcoólica (etanol:água - 4:6), usando dióxido de silício coloidal, Aerosil 200®, como adjuvante de secagem	
• Ansiedade, sedação ⁹		-	
• Estresse, insônia, malária, taquicardia, tosse nervosa ⁹	-	-	
• Antifúngico moderado contra <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Chrysosporium tropicum</i> , <i>Trichophyton terrestre</i> , helmintíase, cólicas de crianças, diarreia, diurético, estimulante, sedação, sintomas da menopausa, tônico ¹⁵			

(continuação da Tabela 1)

Espécie	Utilização	Parte da planta	Forma utilizada
<i>P. foetida</i>	• Atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i>	Casca, caule e folha	Extrato hexânico
	• Asma, irritabilidade ⁷	Folha	Decocto
	• Histeria, insônia ¹⁵		Infusão
	• Emenagogo e, quando aplicada na cabeça, para dor de cabeça e vertigem ¹⁵		-
	• Indução de vômito ¹⁵	Fruto	-
	• Doenças de pele com inflamação, como por exemplo, erisipela ¹⁵	-	Loção, cataplasma
	• Fortificante ²⁵	-	-
<i>P. glandularis</i>	• Vomitiva, ténica (em pequenas doses, pois é considerada um veneno poderoso) ²⁵	Raiz	-
<i>P. incarnata</i>	• Ansiedade ^{12, 15}	Caule, flor, folha, planta inteira	Extrato metanólico
	• Ansiedade, distúrbios nervosos, insônia, tensão muscular ^{1, 30}	Flor, folha e fruto	Extrato hidro-alcoólico (Passipay TM)
	• Convulsão ³⁰		
	• Inflamação ¹⁰	Flor, fruto	Extrato etanólico
	• Tosse ¹⁶	Folha	Extrato metanólico
	• Sedação ³		Infusão (4-8 g), tintura (1:8)
	• Tratamento homeopático de diversas doenças sexualmente transmitidas, inclusive da AIDS ¹⁵		Tintura (Herpes) contendo <i>Astragalus membranose</i> e <i>Lomatium dissectum</i>
	• Sedação ^{15, 37}	Parte aérea	Extrato aquoso
	• Ansiedade ^{11, 13, 15, 37}		Extratos metanólico ^{11, 13, 14, 17} e hidro-alcoólico ^{15, 37}
	• Redução de dependência produzida por substâncias propensas ao vício como, por exemplo, álcool etílico, canabinóides, morfina e nicotina ¹⁴		
• Estimulação sexual ¹⁷			
• Úlcera dolorosa ¹⁵	-	Extrato aquoso	
• Redução de dependência produzida por opiáceos, como por exemplo, morfina e codeína ²		Extrato	
• Ansiedade, asma, convulsão, diarreia, dismenorréia, dor, epilepsia, espasmo (inclusive em meningite), excesso de trabalho mental, fobia e medo relacionados ao estresse em pacientes com câncer, hemorróida, histeria, inquietude da febre tifóide e do tétano, insônia, irritabilidade nervosa resultante de doenças prolongadas, manifestações nervosas em problemas menstruais (inclusive na menopausa), narcótico, neuralgia, neurastenia, neurose, queimadura, redução de dependência produzida por morfina ¹⁵		-	-

(continuação da Tabela 1)

Espécie	Utilização	Parte da planta	Forma utilizada
<i>Cont. P. incarnata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Terapia de reposição de estrogênio em mulheres na pós-menopausa, verminose¹⁵ • Sedação^{15, 18} 	-	-
<i>P. laurifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Verminose²⁵ 	Raiz	Decocção salificada consumida a frio
	<ul style="list-style-type: none"> • Taquicardia¹⁵ 	-	-
<i>P. macrocarpa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Insônia¹⁸ 	-	-
<i>P. maliformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Febre intermitente¹⁵ 	-	Suco
<i>P. mollissima</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperglicemia²⁰ 	Folha	Extrato etanólico
<i>P. nitida</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante, atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> 	Casca, caule e folha	Extrato hexânico
	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas gastrointestinais²⁷ 	-	-
<i>P. palmeri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante, atividade antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> 	Casca, caule e folha	Extrato hexânico
<i>P. pedunculata</i>		Caule	
<i>P. sexflora</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Picada de cobra¹⁵ 	Partes aéreas	-
<i>P. vitifolia</i>		-	
<i>P. quadrangularis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes, pressão alta¹⁵ 	Folha	Chá
	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensão²⁸ 		
	<ul style="list-style-type: none"> • Dor de cabeça, sedação¹⁵ 	-	-
<i>P. suberosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Banho para doenças de pele¹⁵ 	Folha	
	<ul style="list-style-type: none"> • Emenagogo, histeria¹⁵ 	Raiz	Decocto
<i>P. tenuifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante⁵ 	Casca, caule e folha	Extrato hexânico

¹ AKHONDZADEH et al., 2001a

² AKHONDZADEH et al., 2001b

³ ANVISA, 2000

⁴ BARBOSA, 2006

⁵ BENDINI et al., 2006

⁶ BENINCÁ et al., 2007

⁷ BEZERRA, Jeamile et al., 2006

⁸ BEZERRA, José et al., 2006

⁹ BORRÁS, 2003

¹⁰ BORRELLI et al., 1996

¹¹ DHAWAN et al., 2001a

¹² DHAWAN et al., 2001b

¹³ DHAWAN et al., 2001c

¹⁴ DHAWAN et al., 2003

¹⁵ DHAWAN et al., 2004

¹⁶ DHAWAN; SHARMA, 2002a

¹⁷ DHAWAN; SHARMA, 2002b

¹⁸ DI STASI et al., 2002

¹⁹ DOYAMA et al., 2005

²⁰ EDWIN et al., 2007

²¹ FENNER, 2006

²² GARROS et al., 2006

²³ GOMES et al., 2006

²⁴ GONÇALVES-FILHO et al., 2006

²⁵ GRENAND et al., 1987

²⁶ ICHIMURA et al., 2006

²⁷ IPGRI; CIRAD - INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE; CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT, 2006

²⁸ LANS, 2006

²⁹ MONTANHER et al., 2007

³⁰ NASSIRI-ASL et al., 2007

³¹ PROVENSÍ, 2007

³² RUDNICKI et al., 2007

³³ SANTOS et al., 2005

³⁴ SILVA et al., 2001

³⁵ SILVA et al., 2006

³⁶ SILVA; FREIRE, 2000

³⁷ SOULIMANI et al., 1997

³⁸ VARGAS et al., 2007

2.1.1 *Passiflora nitida* Kunth

Passiflora nitida (Figura 1), conhecida popularmente como maracujá-do-mato, maracujá-de-cheiro, maracujá-de-rato e maracujá-suspiro, é uma espécie silvestre originária da Amazônia e está dispersa por todo o norte da América do Sul (MORAES et al., 2002; INPI - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL, 2006; JUNQUEIRA et al., 2007).

Sobre sua morfologia externa apresentada na Figura 1, trata-se de uma herbácea ou lenhosa de folhas de superfície cartáceas a coriáceas, opacas e envernizadas. Apresenta nervuras terciárias distintamente percurrentes, retas e oblíquas. Suas nervuras secundárias apresentam glândulas terminais um pouco proeminentes. As margens são levemente dentadas (HOPKINS; SOUZA, 1999).

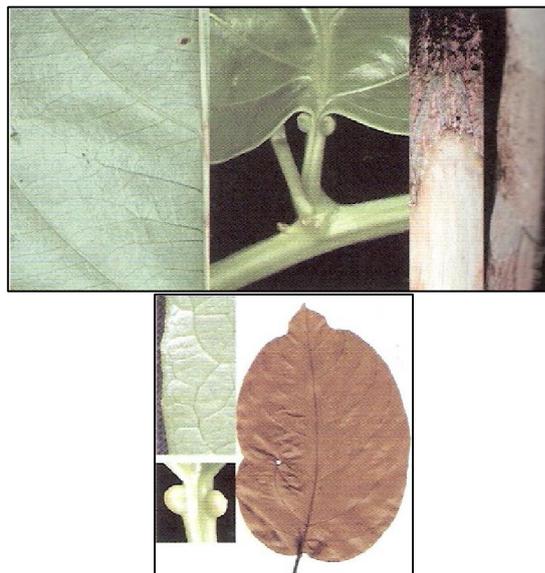


Figura 1 - Morfologia externa do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth).
FONTE: HOPKINS; SOUZA, 1999

A planta cresce espontaneamente em vegetação secundária, beira de rios e estradas e seus frutos (Figura 2) são consumidos *in natura* pela população local (HOPKINS; SOUZA, 1999; MORAES et al., 2002; INPI, 2006). Uma das principais utilizações medicinais da espécie é em distúrbios gastrointestinais (IPGRI; CIRAD, 2006).

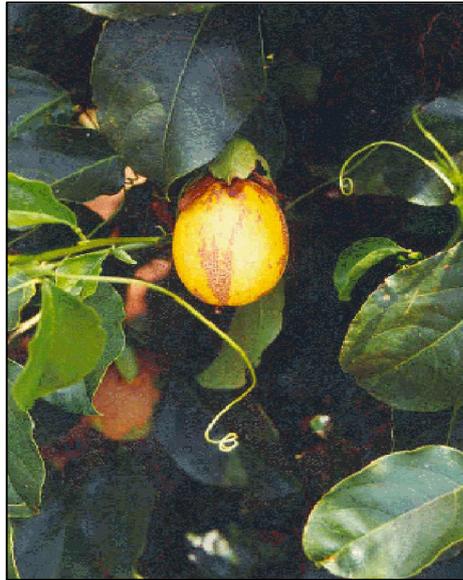


Figura 2 - Fruto do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth).

FONTE: Retirado de

<http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_america/frutales/Ficha%20Passiflora%20nitida.htm>. Acesso em: 26 abr. 2006

2.1.2 Atividades farmacológicas

A atividade antiinflamatória de espécies do gênero *Passiflora* foi comprovada cientificamente para a *P. incarnata* (BORRELLI et al., 1996), *P. edulis* (SILVA et al., 2001; BEZERRA, José et al., 2006; GARROS et al., 2006; GOMES et al., 2006; GONÇALVES-FILHO et al., 2006; SILVA et al., 2006; BENINCÁ et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007) e *Passiflora alata* (VARGAS et al., 2007). A atividade antinociceptiva, por sua vez, foi comprovada para a *P. edulis* (SILVA et al., 2001).

Neste estudo, além dessas atividades antiinflamatória e antinociceptiva, foram enfocadas as propriedades antiagregante plaquetária e coagulante/anticoagulante, que ainda não haviam sido relatadas para o gênero.

Os flavonóides, glicosídeos, alcalóides, compostos fenólicos e componentes cianogênicos têm sido relatados como os principais fitocomponentes das espécies de *Passiflora*. No entanto, as atividades farmacológicas destas espécies têm sido geralmente atribuídas aos componentes flavonoídicos, por exemplo, benzoflavonas tri-substituídas, crisina e vitexina (OGA et al., 1984; RHAMAN et al., 1997; SOULIMANI et al., 1997; DHAWAN et al., 2001a, 2003, 2004; DI STASI et al., 2002; DHAWAN; SHARMA, 2002b, 2003; DOYAMA et al., 2005; FENNER, 2006; BENINCÁ et al., 2007; BÔAS, 2007; PROVENSI, 2007).

Na coagulação sangüínea, os flavonóides previnem a redução da forma oxidada de vitamina K (HAVSTEEN, 2002).

As atividades antiinflamatória e antiagregante plaquetária dos flavonóides são atribuídas, em parte, à inibição da ciclooxygenase (COX), da 5-lipoxigenase (5-LOX) e da fosfolipase A₂ (PLA₂) no metabolismo do araquidonato, reduzindo a concentração de prostanóides e leucotrienos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Quanto à atividade analgésica, os flavonóides têm um efeito de alívio de dor imediato em ferimentos de pele após picadas de inseto ou de cobra, queimaduras ou corte. Este mecanismo pode facilmente ser explicado pela inibição da formação de prostaglandina (PG). Alguns flavonóides estimulam macrófagos, impedem a produção adicional de eicosanóides, alguns dos quais liberam peptídeos indutores de dor, p. ex., substância P e bradicinina; e destroem o excesso de oxidantes. Dessa forma, eles sustentam a retomada do estado normal no tecido inflamado (HAVSTEEN, 2002).

Os estudos de *Passiflora nitida* presentes na literatura, dizem respeito à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e à atividade antioxidante (BENDINI et al., 2006).

2.2 Avaliação da Coagulação Sangüínea e da Agregação Plaquetária

A hemostasia é um processo fisiológico envolvido com a fluidez do sangue e com o controle de sangramento quando ocorre lesão vascular. Depende da ação integrada de três componentes fundamentais: parede vascular, plaquetas e sistema de coagulação. Distúrbios da hemostasia são freqüentes na prática e responsáveis por inúmeras condições patológicas (GUYTON; HALL, 2002; METZE, 2006).

As plaquetas passam pelas etapas de adesão, secreção e agregação, com a finalidade de cumprir seu papel na hemostasia, ou seja, formar o trombo plaquetário. A agregação é iniciada pela liberação de adenosina difosfato (ADP) e é o processo em que as plaquetas aderem umas às outras e formam um agregado. Entre as plaquetas desgranuladas, forma-se fibrina filamentosa, que juntamente com as próprias plaquetas, constitui o tampão plaquetário. A agregação plaquetária ocorre constantemente para reparar pequenos defeitos que ocorrem nos vasos sangüíneos durante toda a vida. Além de formar esses tampões hemostáticos, a agregação é também importante na coagulação do sangue, pois após sua ativação há aumento dos fosfolipídeos com carga negativa na superfície plaquetária que aceleram a formação da trombina. A agregação é estimulada por vários fatores, sobretudo ADP, tromboxano A₂ (TXA₂) e trombina. O óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI₂) são inibidores da agregação (BERNE et al., 2004; METZE, 2006).

Admitem-se, hoje, duas vias possíveis, uma extrínseca e outra intrínseca, capazes de ativar a coagulação sangüínea e que confluem ativando o fator X e liberando os fosfolipídios

complexos. Este conjunto, unindo-se ao fator V e na presença de íons cálcio (Ca^{++}), leva à passagem de protrombina para trombina (BARRETO-NETTO et al., 2004).

Os testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) são destinados a medir quedas da velocidade da coagulação provocadas por tendências hemorrágicas ou pelo uso de medicação anticoagulante. Por serem ambos econômicos, rápidos e relativamente precisos, são métodos muito convenientes para as rotinas médicas (TERRA, 2004).

Particularmente, o TP é utilizado para detectar graus clinicamente significativos de carências de fatores da via extrínseca da coagulação (fator VII) e, como prova de função hepática, enquanto o TTPa é utilizado para a via intrínseca (fatores VIII, IX, XI, XII). O método coagulométrico (método da turbidez) foi utilizado para avaliar o TP e o TTPa. A trombina catalisada da conversão de fibrinogênio para fibrina é a reação final na cascata de coagulação. A formação da fibrina resulta em aumento da turbidez na amostra que é detectada pelo fotômetro e o tempo entre o início da detecção fotométrica e o “ponto de viragem” da curva de reação é o resultado, o qual é descrito em segundos (OSONIYI; ONAJOBI, 2003; TERRA, 2004).

Segundo Bernardi e Moreira (2005), o teste de agregação plaquetária tem por finalidade avaliar a função das plaquetas frente à exploração de diferentes vias de ativação plaquetária *in vitro*, podendo ser realizado em um agregômetro de plaquetas, o qual mensura uma combinação de absorção e dispersão de luz, podendo realizar leituras nefelométricas ou fotométricas.

A avaliação da agregação plaquetária pelo método de Born e Cross (1963) baseia-se nas seguintes etapas: a) após centrifugação (rápida e em baixa rotação) de sangue citratado do paciente, obtém-se plasma rico em plaquetas (PRP); b) juntando-se a este plasma um agente indutor de agregação plaquetária (ADP, colágeno, ADR, trombina e ácido araquidônico),

provoca-se a agregação das plaquetas; c) os grumos formados deixam o solvente mais transparente, ou melhor, menos turvo do que a suspensão original; d) determina-se a diferença entre as leituras registradas pelo sistema fotoelétrico antes e após a agregação. Um agregômetro é, portanto, em última instância, um fotômetro capaz de efetuar leituras turbidimétricas. O mesmo registra alterações na transmissão da luz, pois ao adicionar agentes indutores de agregação plaquetária, tem-se um decréscimo dessa devido à mudança na forma das plaquetas, que passam de discóides a esféricas, sendo que a agregação plaquetária contínua permite com que o meio fique mais claro, possibilitando assim uma maior transmissão da luz (TERRA, 2004; BERNARDI; MOREIRA, 2005).

O teste de agregação plaquetária permite avaliar parâmetros temporais, semi-quantitativos e qualitativos da função das plaquetas frente a vários agentes agregantes, podendo-se utilizar o PRP ou o sangue total. Essa técnica tem sido descrita como representando o melhor auxílio diagnóstico laboratorial na verificação dos distúrbios qualitativos adquiridos ou congênitos das plaquetas, comparativamente aos outros testes que avaliam a hemostasia primária (TERRA, 2004; BERNARDI; MOREIRA, 2005).

2.3 Avaliação da Inflamação e da Nocicepção

Quando ocorre lesão tecidual, seja ela causada por bactérias, traumatismo, substâncias químicas, calor ou qualquer outro fenômeno, os tecidos lesados liberam múltiplas substâncias que provocam alterações radicais secundárias nos tecidos. Todo o complexo das alterações teciduais observadas é denominado inflamação. A inflamação caracteriza-se por: (1) vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, com conseqüente excesso de fluxo sanguíneo local: (2) aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo o extravasamento de grande quantidade de líquido nos espaços intersticiais: (3) com freqüência, coagulação do líquido nos

espaços intersticiais, devido à quantidade excessiva de fibrinogênio e de outras proteínas que extravasam dos capilares; (4) migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido; e (5) edema das células. Alguns dos inúmeros produtos teciduais que causam essas reações incluem histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, diferentes produtos de reação do sistema do complemento, produtos de reação do sistema da coagulação sangüínea e múltiplas substâncias, denominadas linfocinas, que são liberadas pelos linfócitos T sensibilizados (GUYTON; HALL, 2002; PEREIRA; BOGLIOLO, 2006).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2008) define dor como uma “experiência desagradável, de natureza sensorial, cognitiva e emocional, associada a dano tissular real ou potencial”. Essa definição engloba não apenas a dor inflamatória, mas também a dor neurogênica resultante da estimulação direta do nociceptor e a dor neuropática derivada de anormalidade neurofisiológicas ou morfológicas, envolvendo fibras sensoriais.

Apesar dos animais não apresentarem a capacidade de comunicar verbalmente a ocorrência da dor, quando são submetidos a um estímulo reconhecidamente nociceptivo eles exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. A partir da avaliação destes parâmetros, pode-se inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica, avaliar sua intensidade e estudar como drogas potencialmente analgésicas interferem no processo, por comparação com drogas-padrão (LAPA et al., 2005).

Todavia, dada as limitações cognitivas que os estudos desta natureza apresentam, é aconselhável não usar o termo “dor” quando o sujeito experimental não pode definir verbalmente a resposta. Assim torna-se preferível a utilização do termo “resposta nociceptiva” neste contexto. O termo “nocicepção” engloba as respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, dissociando-as do caráter cognitivo-afetivo da resposta. A percepção de estímulos nóxicos, denominada de “nocicepção”, não é, portanto, a mesma coisa que dor,

que é experiência subjetiva e inclui um forte componente emocional (afetivo). A quantidade de dor que um estímulo particular produz depende de muitos outros fatores além do próprio estímulo. A intensidade de uma resposta nociceptiva, por sua vez, é resultante da ação combinada de numerosos mediadores químicos que, atuando em sítios periféricos, medulares ou centrais, exacerbam ou modulam esta resposta (RANG et al., 2004; LAPA et al., 2005).

O efeito sobre a inflamação avaliado pelo teste do edema de pata em roedores, consiste em induzir o edema pela injeção subplantar (s.pl.) de carragenina, que é um agente flogógeno que induz uma resposta inflamatória na pata. A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos. O pletismômetro mede o volume líquido deslocado e o traduz de forma digital (WINTER et al., 1962; LAPA et al., 2005).

A quantificação da reação animal à estimulação dolorosa é um dos desafios na pesquisa farmacológica e diversas metodologias têm sido propostas. O teste de Randall e Selitto (1957) é um dos mais usados mundialmente nas determinações de rotina de respostas nociceptivas de animais. Em geral, este teste é baseado na determinação da resposta limiar à estimulação dolorosa através da pressão da pata de roedores, usando animais normais, assim como, animais que tiveram inflamação induzida por algum dos métodos disponíveis.

O efeito sobre a nocicepção avaliado pelo teste de contorções abdominais em roedores, decorre da aplicação de um estímulo nociceptivo por via intraperitoneal (i.p.). A contagem do número de contorções (caracterizada por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras) ocorridas em um intervalo de tempo pré-determinado é tomada como índice da resposta nociceptiva em função do tempo. O estímulo utilizado na maioria dos testes envolvendo este método é o ácido acético, que é

conveniente para os testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação dos vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção. Assim, este modelo será sensível a substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica dotadas dos mais variados mecanismos de ação (COLLIER et al., 1968; LAPA et al., 2005).

A quantificação da reação animal à estimulação térmica pode ser avaliada pelo teste da placa quente, no qual a colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50 graus Celsius (°C) determinará uma resposta característica, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés (“sapateia”), levanta, anda rápido ou lambe uma das patas. A latência para o desaparecimento desta resposta, cronometrado em segundos, pode ser considerada como indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico. A redução da temperatura da placa quente para 46-49 °C, associada à aplicação de um estímulo inflamatório intraplantar, fornece um modelo simples e sensível para a avaliação da hiperalgesia térmica (LAPA et al., 2005).

2.4 Toxicidade

Toxicidade é a capacidade de substâncias exógenas provocarem efeitos nocivos em organismos vivos, podendo estes se manifestar após uma única exposição ou após repetidas exposições. Para a avaliação da capacidade tóxica, inclusive de produtos de origem vegetal, são recomendados estudos de relação dose/resposta utilizando preferencialmente a via oral como via de administração, porém, a escolha da via pode ser baseada na utilização planejada para o produto. Os resultados desses estudos conduzem ao cálculo da dose letal 50 (DL₅₀), que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50 % dos animais de uma população, útil para identificar a toxicidade relativa da substância (OGA, 1996).

Neste tipo de estudo é muito utilizado o microcrustáceo *Artemia salina* Leach (camarão de salmoura), dada a alta sensibilidade desse organismo às variações de ambiente. Os resultados deste teste servem ainda de parâmetro de atividade farmacológica, visto que esta pode se manifestar como toxicidade ao camarão. Já existem trabalhos que indicam uma relação entre a DL₅₀ calculada no teste de *Artemia salina* e determinadas atividades biológicas: substâncias cuja DL₅₀ estiver na faixa entre 80 µg/mL e 250 µg/mL podem apresentar atividade tripanossomicida, por outro lado, substâncias com toxicidade menor que 145 µg/mL podem apresentar atividade anti-tumoral (DOLABELA, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar propriedades fitoquímicas, farmacológicas e toxicológicas de extratos das folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth).

3.2 Específicos

3.2.1 Investigar as características fitoquímicas das folhas da espécie;

3.2.2 Estudar os efeitos dos extratos brutos sobre a coagulação sanguínea, agregação plaquetária, inflamação e nocicepção;

3.2.3 Averiguar o possível efeito tóxico dos extratos brutos.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental que averiguou algumas propriedades químicas das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (maracujá-do-mato), assim como o efeito sobre a coagulação sanguínea, agregação plaquetária, inflamação, nocicepção e a toxicidade dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH), através de ensaios fitoquímicos, biológicos e bioquímicos.

4.2 Procedimentos Éticos

O trabalho faz parte do Projeto de Pesquisa do MCT/CNPq/CT-Amazônia, intitulado: “Identificação de espécies botânicas amazônicas como potenciais fitoterápicos: estudos etnobotânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM), Processo 038/2006.

O trabalho foi realizado observando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (1991).

4.3 Equipamentos, Materiais, Fármacos e Reagentes

4.3.1 Equipamentos

- Agregômetro de plaquetas (Qualitem, modelo PA-04, São Paulo, SP, Brasil);
- Analgesímetro (Panlab s.l., modelo LE 7306, Barcelona, Espanha);
- Analisador hematológico (Sysmex; modelo KX-21N, Los Amigos, California, EUA);
- Autoclave (Fanem[®], modelo 415/2, Guarulhos, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica eletrônica (Bioprecisa, TDS, modelo FA - 2104N, Tijucas do Sul, Paraná, Brasil);
- Balança semi-analítica eletrônica (Marte[®], modelo AS 5000C, Santa Rita do Sapucaí, Minas Gerais, Brasil);
- Banho-maria (Kacil, modelo BM-02, Recife, Pernambuco, Brasil);
- Câmara escura (Tecnal, modelo TE-540, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Coagulômetro (Teco, modelo Coatrom M1, Alemanha);
- Espectrômetro de infravermelho (Perkin Elmer[®], modelo Spectrum 3000, Waltham, Massachusetts, EUA);
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Varian, modelo Inova 500, Palo Alto, Canada, EUA);
- Estufa (Fanem[®], modelo 320SE, Guarulhos, São Paulo, Brasil);
- Liofilizador (Terroni[®], LS 3000, São Carlos, São Paulo, Brasil);
- Minicompressor de ar para aquário;
- Moinho de facas;
- Placa quente (Insight[®], Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Pletismômetro (Panlab s.l., modelo LE 7500, Barcelona, Espanha);
- Rotoevaporador (Marconi[®], modelo MA-120, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

4.3.2 Materiais

- Cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel (Merck[®], Darmstadt, Alemanha);
- Materiais, micropipetas e vidrarias (graduadas e não graduadas) usuais de laboratório;
- Materiais para coleta sanguínea.

4.3.3 Fármacos e reagentes

- Ácidos, bases, sais e solventes de alto grau de pureza analítica (P.A.);
- Agentes indutores de agregação plaquetária: adenosina difosfato (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri, EUA) e adrenalina (Chrono-log, Havertown, Pennsylvania, EUA);
- Agente antiinflamatório: carragenina (Fluka, Buchs, Suíça);
- Água deuterada e metanol deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, EUA);
- Kits comerciais para testes de coagulação sanguínea (TP e TTPa): HemoStat Thromboplastin-SI (PT-SI) e HemoStat aPTT-EL (Human; Wiesbaden, Hessen, Alemanha);
- Padrões indometacina (Indocid[®]; Merck; New Jersey, EUA) e citrato de fentanila (Fentanest[®]; Cristália; Itapira, São Paulo, Brasil);
- Reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] e Folin-Ciocalteau (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, Missouri, EUA).

4.4 Operações Preliminares

4.4.1 Coleta da amostra

Folhas de *Passiflora nitida* foram coletadas na comunidade ribeirinha do Careiro-Castanho, município do Careiro no Estado do Amazonas, pelo mateiro Francisco Medeiros Cavalcante, nos meses de janeiro e fevereiro de 2007.

4.4.2 Identificação da espécie

A espécie do gênero *Passiflora* foi taxonomicamente identificada com o auxílio do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foi comparada com a exsicata de número 209547 da coleção armazenada (Figuras 3-5).



Figura 3 - *Passiflora nitida*.
FONTE: Retirado de
<<http://www.florabrasiliensis.cria.org.br>>. Acesso em: 14 abr. 2008



Figura 4 - Espécime de *P. nitida* Kunth da coleção do Herbário do INPA.



Figura 5 - Espécime de *P. nitida* Kunth coletado e comparado.

4.4.3 Preparação da matéria-prima vegetal (MPV)

As folhas de *Passiflora nitida* foram selecionadas, devidamente limpas com flanela e secas em estufa com circulação interna de ar a 40 °C, por um período de sete dias, até que apresentassem aspecto quebradiço. Posteriormente, a amostra foi pulverizada em moinho de facas, constituindo, então, a matéria-prima vegetal (MPV) que foi utilizada nas análises desse estudo, estando o processo ilustrado na Figura 6.

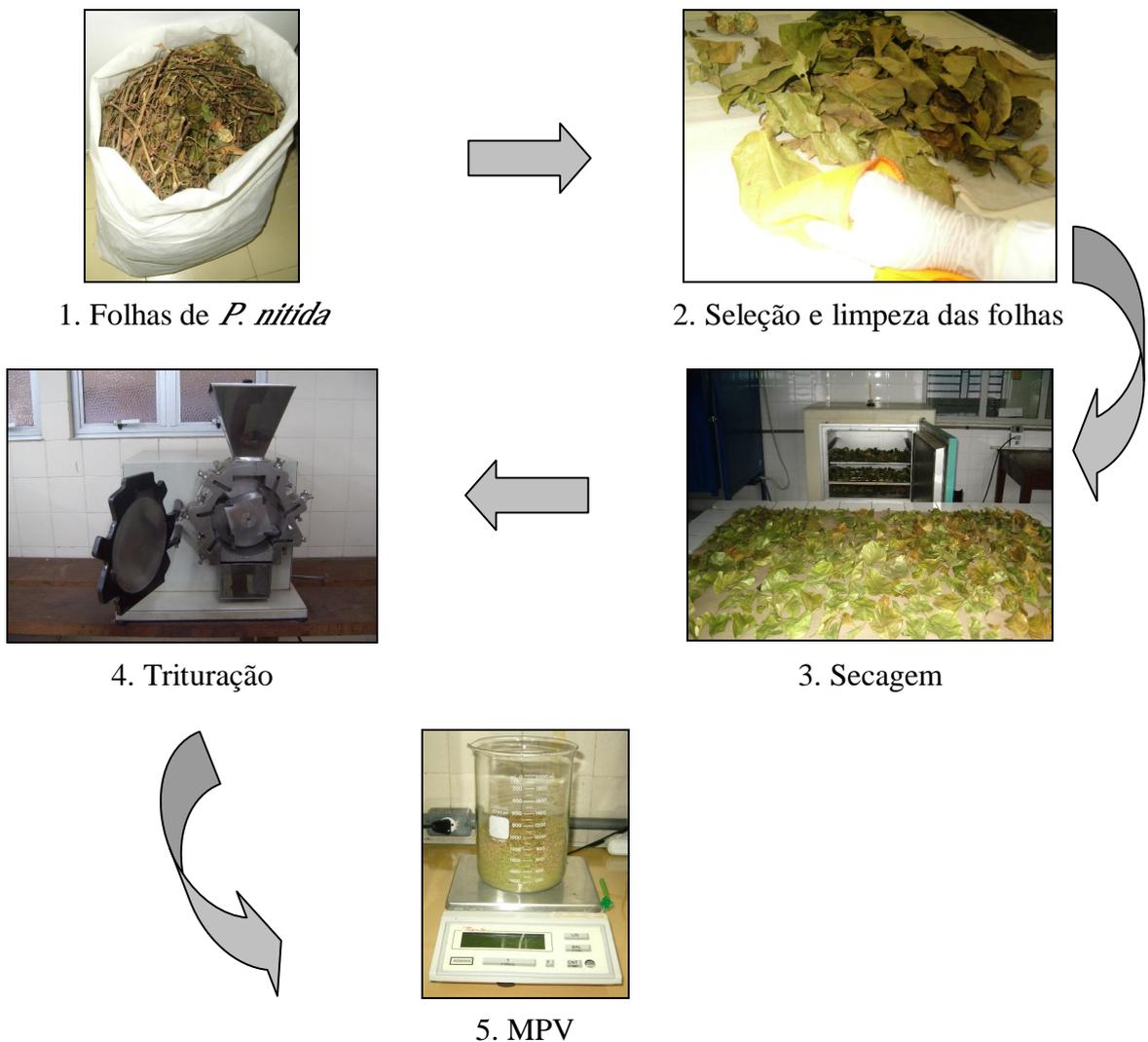


Figura 6 - Processo de preparação da MPV (folhas de *Passiflora nitida* Kunth).

4.4.4 Obtenção dos extratos

Os extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) de *P. nitida* foram obtidos a partir de três alíquotas de 200 gramas (g) de MPV, através do método de maceração estática com 1000 mililitros (mL) de solvente respectivo a cada tipo de extração, à temperatura ambiente, por um período de sete dias.

Após filtrações, o solvente dos extratos EE e EH foram evaporados em rotaevaporador, sob pressão reduzida e baixa temperatura, já o extrato EA foi liofilizado, gerando os extratos brutos da planta, que foram utilizados nos ensaios realizados, conforme o processo ilustrado na Figura 7 (GAILLIOT, 1998; MACIEL et al., 2002; FALKENBERG et al., 2007).

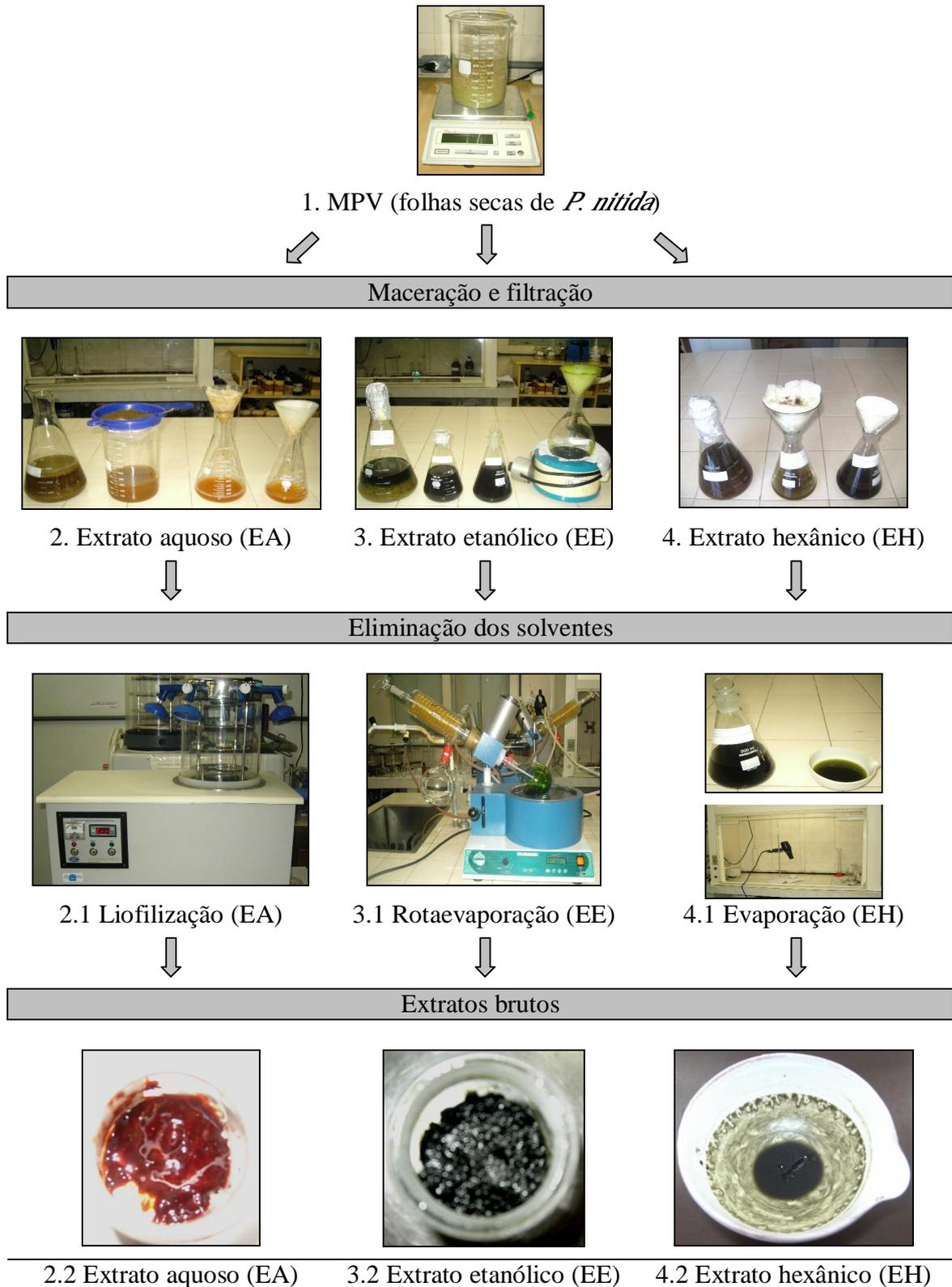


Figura 7 - Processo de concentração dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

4.5 Estudos Fitoquímicos

4.5.1 Investigação fitoquímica preliminar

Esta análise foi fundamentada nas metodologias descritas por Matos (1997), Costa (2001a,b) e Schenkel et al. (2007a). Os fitoconstituintes das folhas de *Passiflora nitida* Kunth, listados na Tabela 2, foram investigados através de vários testes qualitativos, envolvendo reações de precipitação, desenvolvimento de coloração e fluorescência característica para detecção de diferentes compostos.

Tabela 2 - Testes preliminares das folhas de *Passiflora nitida* Kunth

Fitoconstituintes investigados	
Matos (1997)	Subseção
Fenóis e taninos	4.5.1.1
Flavonóides	4.5.1.2, 4.5.1.3 ,4.5.1.4
Xantonas	4.5.1.2, 4.5.1.4
Esteróides e triterpenóides (reação de Lieberman-Burchard)	4.5.1.5
Resinas	4.5.1.6
Cumarinas	4.5.1.7
Heterosídeos cianogênicos	4.5.1.8
Bases quaternárias (reações de Bertrand, Dragendorff, Hager e Mayer)	4.5.1.9
Costa (2001a,b)	Subseção
Alcalóides (reações de Bertrand, Dragendorff, Hager e Mayer)	4.5.1.10
Glicosídeos cardioativos (reações de Liebermann-Burchard, Baljet, Kedde, Legal, Keller-Kiliani e Pesez)	4.5.1.11
Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntraeger)	4.5.1.12
Schenkel et al. (2007a)	Subseção
Saponinas	4.5.1.13

Um extrato hidroalcoólico foi obtido a partir de uma alíquota de 2,5 g de MPV (folhas secas pulverizadas de *P. nitida*) e 100 mL de etanol a 70 % por decocção sob refluxo, durante 5 minutos (min) após fervura. Posteriormente, uma alíquota de 50 mL do extrato foi filtrada para um béquer e após arrefecimento, o volume foi completado com o solvente. Outra alíquota de 50 mL foi reservada para teste posterior (4.5.1.6).

Uma alíquota de 10 mL do extrato hidroalcoólico foi transferida a um béquer e levada à secura em banho-maria e sete alíquotas de 3 mL foram distribuídas em tubos de ensaio. Dessa forma, o extrato foi submetido aos testes de investigação de fitoconstituintes listados na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3 - Testes realizados na investigação fitoquímica preliminar das folhas de *Passiflora nitida* Kunth segundo Matos (1997)

	Fitoconstituintes investigados	Subseção
Tubo 1	Fenóis, taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e taninos flobabênicos (condensados ou catéquicos)	4.5.1.1
Tubo 2	Antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas	
Tubo 3	Antocianinas e antocianidinas	4.5.1.2
Tubo 4	Antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis	
Tubo 5	Leucoantocianidinas e catequinas (taninos catéquicos)	4.5.1.3
Tubo 6	Flavanonas	
Tubo 7	Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	4.5.1.4
Béquer	Esteróides livres e triterpenóides pentacíclicos livres	4.5.1.5

4.5.1.1 Fenóis, taninos pirogálicos (hidrolizáveis) e taninos flobabênicos (condensados ou catéquicos)

Ao tubo 1 foram adicionadas 3 gotas (gts) de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3) e após correta agitação, foi observada qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante e escuro. Água e FeCl_3 foram usados como branco do teste.

Coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo.

Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos) (MATOS, 1997).

4.5.1.2 Antocianinas, antocianidinas e flavonóides

O tubo 2 foi acidulado com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a pH 3, o tubo 3 foi alcalinizado com hidróxido de sódio (NaOH) a pH 8,5 e o tubo 4 foi alcalinizado com hidróxido de potássio (KOH) a pH 11. Foi observada qualquer mudança da coloração do material, conforme a Tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Fitoconstituintes	Cor em meio		
	Tubo 2 Ácido ^(pH 3)	Tubo 3 Alcalino ^(pH 8,5)	Tubo 4 Alcalino ^(pH 11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. púrpura
Flavononóis	-	-	Verm. laranja

FONTE: MATOS, 1997.

4.5.1.3 Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

O tubo 5 foi acidulado com ácido clorídrico (HCl) a pH 1-3 e o tubo 6 foi alcalinizado com NaOH a pH 11. O aparecimento ou intensificação de cores características presentes na Tabela 5 indica a presença desses compostos (MATOS, 1997).

Tabela 5 - Teste para leucoantocianidinas, catequinas (taninos catéquicos) e flavanonas

Fitoconstituintes	Cor em meio	
	Tubo 5 Ácido ^(pH 1-3)	Tubo 6 Alcalino ^(pH 11)
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavanonas	-	Verm. laranja

FONTE: MATOS, 1997.

4.5.1.4 Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Ao tubo 7 foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado e 1 mL de HCl concentrado. Após o término da reação, indicada pelo fim da efervescência, foi observada qualquer mudança de cor da mistura da reação por comparação com o tubo 5 acidificado da reação anterior. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos (MATOS, 1997).

4.5.1.5 Esteróides livres e triterpenóides pentacíclicos livres

O resíduo seco do béquer foi extraído três vezes com 2 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro para um tubo de ensaio bem seco. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e após agitação suave, foram adicionadas 3 gts de H_2SO_4 concentrado cuidadosamente e após nova agitação, foi observado se havia rápido desenvolvimento de cores.

Em caso de reação positiva, há o desenvolvimento de uma coloração azul seguida de verde permanente, que é indicativo da presença de esteróides livres. Em caso de desenvolvimento de coloração parda até avermelhada é indicativo de triterpenóides pentacíclicos (MATOS, 1997).

4.5.1.6 Resinas

A alíquota de 50 mL de extrato hidroalcoólico previamente reservada foi acidulada a pH 4 e filtrada em papel de filtro, com a finalidade de utilizar o resíduo deste, que foi lavado com o menor volume possível de etanol. Posteriormente, uma alíquota de 3 mL foi transferida para um tubo de ensaio e foram adicionados 6 mL de água destilada. Foi observado se havia formação de precipitado floculoso que se aglomera ao agitar e/ou aquecer, indicativo da presença de resinas (MATOS, 1997).

4.5.1.7 Cumarinas

Em um papel de filtro, pingaram-se, separadamente, 2 gts de extrato hidroalcoólico. Uma gota foi utilizada para o controle negativo e a outra para o teste. À gota do teste foi

aplicada 1 gt de KOH N e o papel, após a secagem, foi submetido à luz UV, por cerca de 2 min. O aparecimento de fluorescência característica da gota alcalinizada indica resultado positivo (MATOS, 1997).

4.5.1.8 Heterosídeos cianogênicos

Uma alíquota de 10 g de MPV foi transferida para um erlenmeyer com tampa esmerilhada de 250 mL, onde foram adicionados 50 mL de água destilada e 1 mL de H₂SO₄ N. Posteriormente, uma fita de papel de picrato de sódio foi presa à tampa do erlenmeyer, evitando contato com o líquido. A mistura foi mantida a 60 °C em banho-maria, durante 2 horas (h). Após este período, foi observado se havia coloração vermelho-castanha na fita, indicativo da presença de heterosídeos cianogênicos.

O papel de picrato de sódio foi preparado utilizando tiras de papel de filtro de 1 cm x 8 cm. Cada tira foi mergulhada, inicialmente, em uma placa de Petri contendo solução de ácido pícrico a 10 %. O excesso de solução foi retirado prensando as tiras entre duas folhas de papel de filtro e mergulhando-as em seguida em solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 10 %. O excesso da solução foi novamente retirado e as tiras foram utilizadas ainda úmidas (MATOS, 1997).

4.5.1.9 Bases quaternárias

Um extrato ácido foi obtido a partir de uma alíquota de 1 g de MPV e 20 mL de HCl a 10 % por decocção sob refluxo, durante 5 min após fervura. Posteriormente, o extrato foi filtrado para um funil de separação e alcalinizado a pH 11 com hidróxido de amônio

(NH₄OH). Foram adicionados 10 mL de éter etílico, seguidos de agitação. Após a separação das fases, a fase etérea foi descartada, enquanto a fase aquosa foi acidulada com HCl a 10 %.

Posteriormente, a fase aquosa foi distribuída em cinco tubos de ensaio de 10 mL. Um tubo foi utilizado para o controle negativo e aos outros quatro tubos foram adicionadas 3 gts dos reagentes de Bertrand, Dragendorff, Hager e Mayer, respectivamente, observando se havia formação de precipitado floculoso, indicativo da presença de bases quaternárias (MATOS, 1997).

4.5.1.10 Alcalóides

Um extrato ácido foi obtido a partir de uma alíquota de 1 g de MPV e 20 mL de HCl a 10 % por decocção sob refluxo, durante 5 min após fervura. Posteriormente, cinco alíquotas de 4 mL do extrato foram distribuídas em tubos de ensaio de 10 mL. Um tubo foi utilizado para o controle negativo e aos outros quatro tubos foram adicionadas 3 gts dos reagentes de Bertrand, Dragendorff, Hager e Mayer, respectivamente, observando se havia formação de precipitado floculoso, indicativo da presença de alcalóides (COSTA, 2001a).

4.5.1.11 Glicosídeos cardioativos

Uma alíquota de 5 g de MPV foi fervida em 20 mL de etanol a 50 % e 10 mL da solução de acetato de chumbo a 10 %, durante 2 min. Após arrefecimento, a mistura foi centrifugada 3500 rotações por minuto (rpm) por 5 min.

Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um funil de separação e foram adicionados 15 mL de clorofórmio (CHCl₃) seguidos de agitação, com a finalidade de

separar as fases. Esta operação foi repetida por mais duas vezes, reunindo as fases clorofórmicas em um mesmo béquer.

Seis alíquotas da fase clorofórmica foram distribuídas em cinco tubos e foram evaporadas à secura em banho-maria. Após este processo, os tubos foram submetidos às seguintes reações:

4.5.1.11.1 Reações com o núcleo esteroidal

- **Liebermann-Burchard**

O resíduo foi dissolvido com 1 mL de reativo, que foi preparado no momento do uso, misturando 5 mL de anidrido acético e 0,1 mL de H₂SO₄ concentrado. Após 5 min, foi observado se havia desenvolvimento das cores castanho ou verde na zona de contato entre as duas camadas (COSTA, 2001b).

4.5.1.11.2 Reações com o anel lactônico pentagonal

- **Reação de Kedde**

Ao resíduo foram adicionados 2 mL de etanol a 50 %, 2 mL de água destilada, 2 mL de reativo, preparado no momento do uso dissolvendo 100 mg de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 10 mL de álcool comum, e 2 mL de KOH N. Após 5 min, foi observado se havia desenvolvimento de coloração vermelho-castanha ou vermelho-violeta na solução ou na zona de contato (COSTA, 2001b).

- **Reação de Baljet**

Ao resíduo foram adicionados 2 mL de reativo, preparado no momento do uso dissolvendo 1 g de ácido pícrico em 100 mL de etanol a 50 %, e 3 gts de KOH N. Após 5 min, foi observado se havia desenvolvimento de cor laranja (COSTA, 2001b).

4.5.1.11.3 Reações com o grupo carbonilo

- **Reação de Legal**

Ao resíduo foram adicionados 1 mL de piridina, 0,5 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de NaOH a 10 % e 0,5 mL de reativo, preparado no momento do uso, dissolvendo 30 mg de nitroprussiato de sódio em 9,9 mL de água destilada. Após 5 min, foi observado se havia desenvolvimento de cor vermelha (COSTA, 2001b).

4.5.1.11.4 Reações com desóxi-açúcares

- **Reação de Keller-Kiliani**

O resíduo foi dissolvido com 3 mL de reativo, que foi preparado no momento do uso, misturando 6 mL da solução de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução de FeCl₃ a 9 %. O conteúdo do tubo foi transferido cuidadosamente para outro tubo contendo 3 mL de H₂SO₄ concentrado, sem agitação. Após 5 min, foi observado se havia desenvolvimento de coloração vermelho-castanha na zona de contato ou azul-esverdeada na camada acética (COSTA, 2001b).

- **Reação de Pesez**

Ao resíduo foram adicionados 3 gts de ácido fosfórico (H_3PO_4), que foram misturadas cuidadosamente com bastão de vidro e posteriormente, observadas sob luz UV. O aparecimento de fluorescência característica indica resultado positivo (COSTA, 2001b).

4.5.1.12 Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntraeger)

Uma alíquota de 2 g de MPV foi fervida em 10 mL de NaOH 2N e posteriormente filtrada para um tubo de ensaio. Após arrefecimento, foi adicionado HCl 2N até aparecimento de cor amarela, seguido de igual volume de benzeno e agitação.

Uma alíquota da fase benzênica foi transferida a outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 2-3 mL de amônia diluída. Após a separação das fases, foi observado se havia desenvolvimento de coloração rósea ou vermelho-cereja na fase amoniacal e ligeiramente amarelada na fase benzênica (COSTA, 2001b).

4.5.1.13 Saponinas

Um extrato aquoso foi obtido a partir de uma alíquota de 2 g de MPV e 100 mL de água destilada por decocção sob refluxo, durante 5 min após fervura. Posteriormente, o extrato foi filtrado e uma alíquota de 10 mL foi transferida para um tubo de ensaio, onde foi adicionada 1 gt de HCl diluído, seguida de agitação firme e constante, durante 3 min. Após um período de 15 min, foi observado se havia formação persistente de espuma, indicativo da presença de saponinas (SCHENKEL et al., 2007a).

4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel foi realizada utilizando-se pequenas alíquotas dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *P. nitida* solubilizadas em quantidade suficiente de metanol. Utilizou-se como sistemas de eluição acetato de etila/acetona 2:3, metanol puro e butanol/ácido acético/água (BAW) 4:0,5:0,5 (ZWEIG; SHERMA, 1987; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Após a saturação da cuba com o eluente, as cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel, contendo os extratos EA, EE e EH recém-aplicados, foram eluídas. Após eluição, as placas foram reveladas com os reagentes apresentados na Tabela 6, específicos para detecção de agentes antioxidantes e de compostos fenólicos. As leituras foram efetuadas em câmara escura sob luz branca e UV nos comprimentos de onda λ_{254} e λ_{365} nanômetros, conforme processo ilustrado na Figura 8 (página 54).

Tabela 6 - Reagentes empregados na detecção de compostos antioxidantes e fenólicos dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth

Reagentes	Coloração	Especificidade
2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	Branco-amarelado sobre um fundo púrpura	Antioxidantes
Iodo ressublimado	Amarelo onde há substâncias com duplas ligações	Geral – ligações duplas
Sulfato cérico [Ce(SO ₄) ₂]	Diversas cores	Geral – substâncias oxidáveis
Cloreto de alumínio (AlCl ₃) 1 % alcoólico	Fluorescência no UV	Todos os flavonóides
Hidróxido de sódio (NaOH) 2 %, hidróxido de amônio (NH ₄ OH), carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃) 0,2 %	Diversas cores	Diversos compostos fenólicos
Cloreto férrico (FeCl ₃) 1 % alcoólico	Azul, verde, marrom ou vermelho	Diversos compostos fenólicos
Reagente de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato-fosfotungstato)	Azul	Todos os compostos fenólicos

FONTE: ZWEIG; SHERMA, 1987; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007.

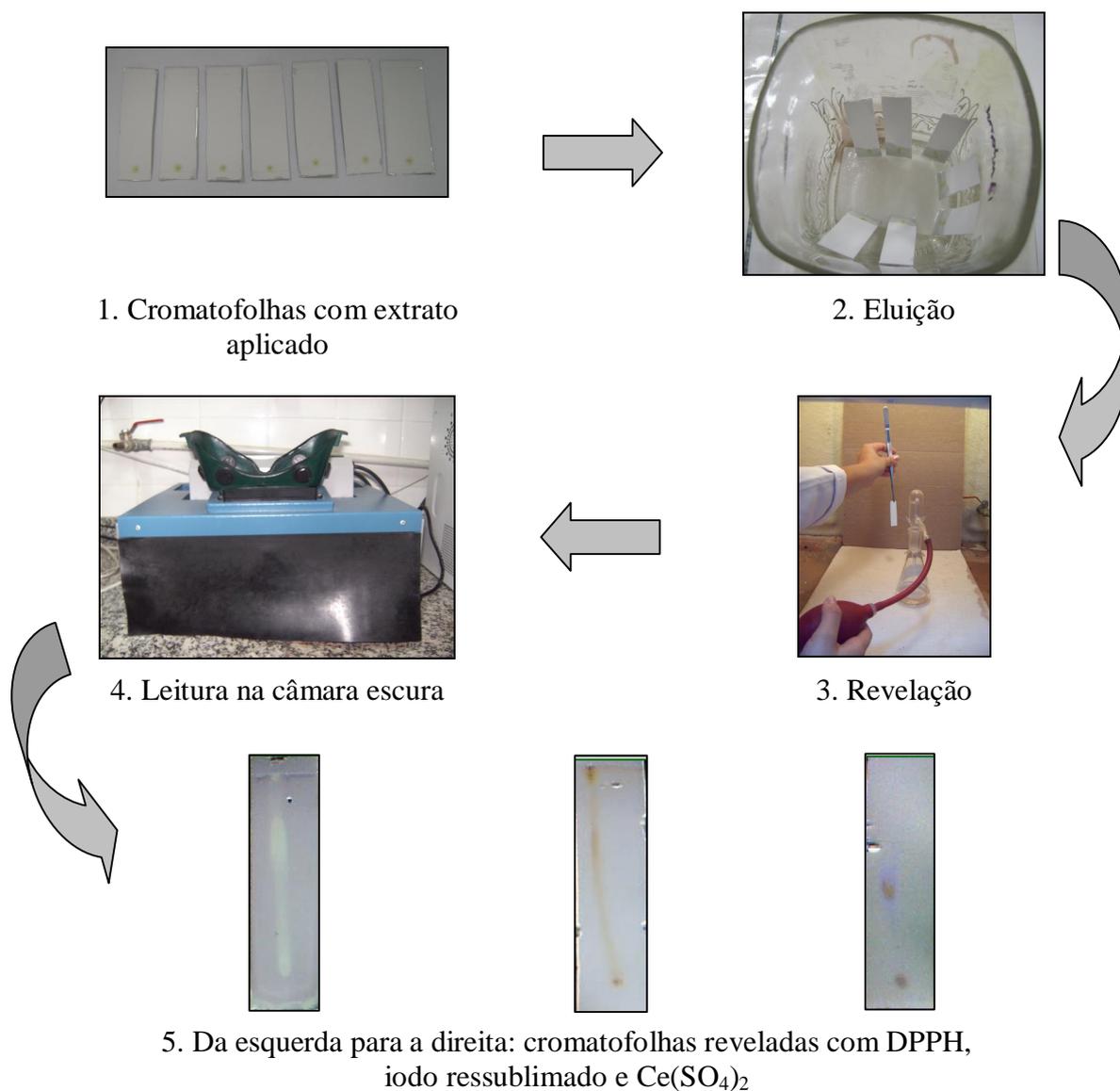


Figura 8 - Processo de CCD dos extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

Os estudos fitoquímicos até aqui descritos foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM (FCF/UFAM), com exceção do teste de cromatografia, realizado no Laboratório de Bioprospecção da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais do INPA (CPPN/INPA).

4.5.3 Espectrometria no infravermelho (IV)

O espectro do extrato etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* no infravermelho (IV), empregando suporte KBr (brometo de potássio), foi obtido na Central Analítica da UFAM (Figura 9). O comprimento de onda variou entre 4000 a 400 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2007a).



Figura 9 - Espectrômetro de IV.

4.5.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

O extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* foi submetido à análise por ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H), sendo que inicialmente uma alíquota da amostra foi dissolvida em 600 microlitros (μL) de metanol deuterado (CD_3OD). Uma vez que a análise dos espectros não revelou a presença de substâncias aromáticas, nova análise foi feita, desta vez dissolvendo outra alíquota em mesma quantidade de água deuterada (D_2O). Todos os espectros foram obtidos na frequência de 500 megahertz (MHz) no espectrômetro de RMN (Figura 10) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e os deslocamentos químicos foram obtidos em partes por milhão (ppm), com relação aos solventes (CD_3OD , D_2O) tomados como referência interna (SILVERSTEIN et al., 2007b).



Figura 10 - Espectrômetro de RMN de 500 MHz, instalado no Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA (Foto: Prof. Dr. Massayoshi Yoshida).

4.6 Estudos Farmacológicos

4.6.1 Unidades experimentais

Nos estudos farmacológicos foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, variedade albina, de ambos os sexos, com peso variando entre 170 e 300 g e camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB-c, de ambos os sexos, com peso variando entre 18 e 35 g e nos estudos toxicológicos foram utilizados ovos do microcrustáceo *Artemia salina* Leach com casca (Maramar, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil).

Os animais foram provenientes do Biotério Central da UFAM e mantidos em grupos de 5, utilizando-se gaiolas plásticas com cama de maravalha não tóxica ou odorífera autoclavada, sob temperatura controlada entre 22 e 25 °C, recebendo água e ração apropriada autoclavada “*ad libitum*” (à vontade), e iluminação controlada com ciclo claro/escuro de 12/12 h. Os ovos de *Artemia salina* foram obtidos em lojas de animais.

4.6.2 Efeito sobre a coagulação sangüínea

Os efeitos dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *P. nitida* sobre a coagulação sangüínea foram avaliados em plasma pobre em plaquetas (PPP) pelo método de Brown (1988) modificado por Osoniyi e Onajobi (2003). Foram realizados os testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), utilizando-se um coagulômetro e os kits comerciais HemoStat Thromboplastin-SI (PT-SI) e HemoStat aPTT-EL (Human).

As amostras de sangue fresco, obtidas de voluntários adultos saudáveis e conservadas em citrato de sódio a 3,2 %, foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 5 min para a obtenção do PPP, conforme ilustrado na Figura 11.

Os valores dos testes obtidos a partir da adição de extrato ao PPP foram comparados com os resultados dos testes com os solventes, dimetilsulfóxido para os extratos EE e EH e água Milli-Q para EA. Os testes foram realizados em pelo menos, duplicatas e os resultados foram registrados após a formação de coágulos.

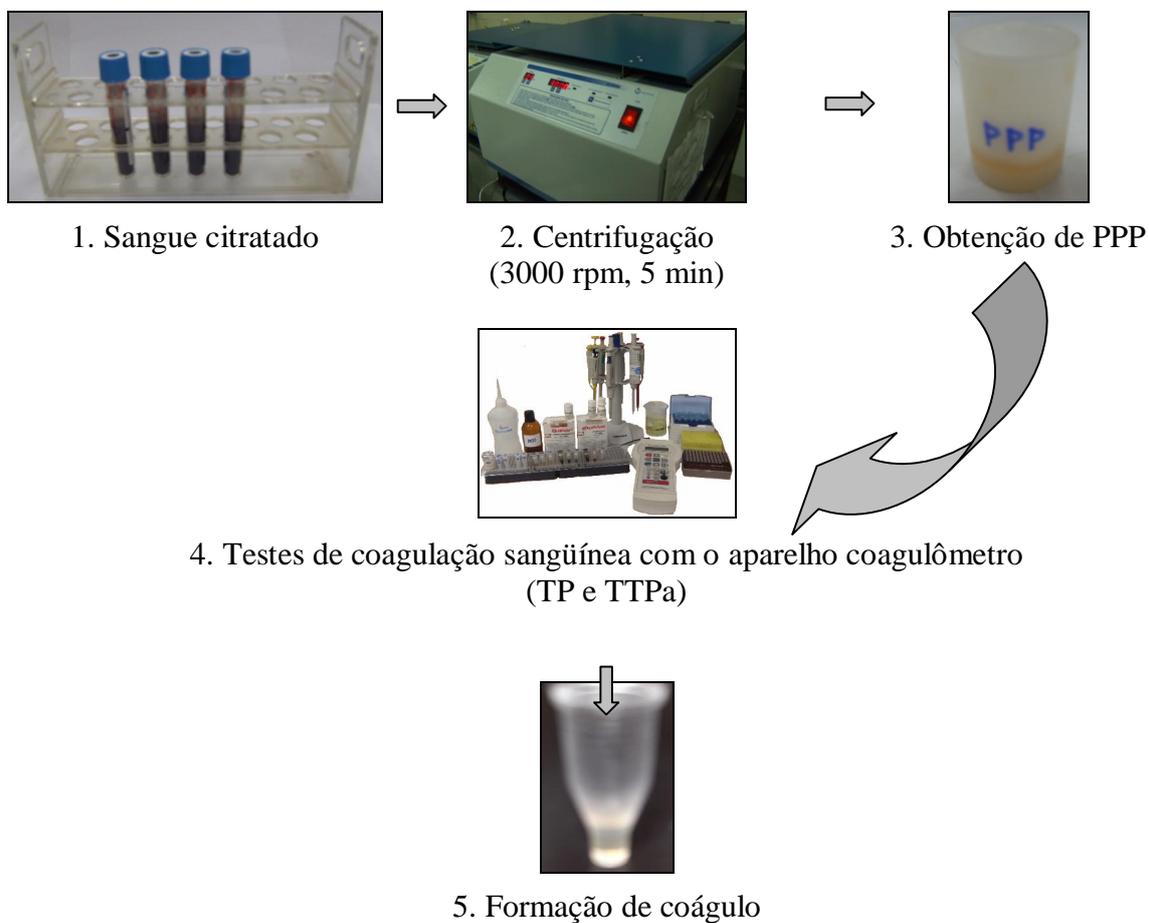


Figura 11 - Testes de coagulação sangüínea (TP e TTPa).

4.6.2.1 Teste de tempo de protrombina (TP)

O reagente Thromboplastin-SI [extrato liofilizado de cérebro de coelho 2,6 % e cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,13 %] foi reconstituído com água destilada e em seguida, pré-aquecido em banho-maria a 37 °C, de acordo com as instruções do fabricante. Antes do início dos testes, a coagulabilidade do PPP foi testada adicionando-se 100 μL de reagente a 50 μL do mesmo.

Para os controles negativos, foram adicionados 96 μL de reagente a 50 μL de PPP previamente incubado com 4 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para os extratos EE e EH e com água Milli-Q para o extrato EA.

Para os testes, foram adicionados 96 μL de reagente a 50 μL de PPP previamente incubado com 4 μL dos respectivos extratos nas concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL.

4.6.2.2 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

A coagulabilidade do PPP foi avaliada adicionando-se 40 μL de CaCl_2 0,02 Mol/litro (M) da Human, pré-aquecido em banho-maria a 37 °C, a 30 μL de PPP previamente incubado em banho-maria com 30 μL de reagente HemoStat aPTT-EL (extrato de cérebro de coelho cloroformizado).

Para o controle negativo, foram adicionados 36 μL de CaCl_2 a 30 μL de PPP previamente incubado com 30 μL de reagente e 4 μL de DMSO para os extratos EE e EH e com água Milli-Q para o extrato EA.

Para os testes, foram adicionados 36 μL de CaCl_2 a 30 μL de PPP previamente incubado em banho-maria com 30 μL de reagente e 4 μL dos respectivos extratos nas concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL.

4.6.3 Efeito sobre a agregação plaquetária

Os efeitos dos extratos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) sobre a agregação plaquetária foram avaliados em plasma rico em plaquetas (PRP) pelo método de Born e Cross (1963) com adaptações, utilizando-se um agregômetro de plaquetas estabilizado na temperatura de 37 °C.

Para os testes foram obtidas amostras de sangue fresco citratado de voluntários adultos saudáveis, submetidas à centrifugação a 1000 rpm por 5 min para a obtenção do PRP, que foi submetido à contagem de plaquetas, utilizando-se um analisador hematológico.

A amostra sanguínea foi submetida a uma nova centrifugação a 3000 rpm por 5 min para a obtenção do PPP, que foi utilizado como branco dos testes e, quando necessário, para ajustar a plaquetometria do PRP para $300.000 \pm 10.000/\mu\text{L}$, usando a fórmula abaixo:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Onde:

C_1 = plaquetometria do PRP;

V_1 = volume do PRP;

C_2 = 300 (valor de plaquetometria estipulado);

V_2 = volume de PPP necessário para a diluição do PRP.

Para testar os efeitos dos extratos EA, EE e EH nas concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL, alíquotas de 485 μL de PRP foram previamente incubadas com 5 μL dos mesmos por 2 min. Em seguida, foram adicionados 10 μL de ADP (0,4 mg/mL) ou ADR (10 micromols por litro, $\mu\text{mol/L}$), os agentes indutores de agregação plaquetária considerados neste estudo. Todos os testes de agregação plaquetária foram realizados em pelo menos, duplicatas e as curvas de agregação foram plotadas dentro de 5 min após a adição dos agentes, conforme processo ilustrado na Figura 12 (BERNARDI; MOREIRA, 2005; TOGNOLINI et al., 2006).

O efeito sobre a curva de agregação foi calculado em relação aos controles negativos (485 μL de PRP e 5 μL de DMSO para os extratos EE e EH ou 5 μL de água Milli-Q para o extrato EA), utilizando os mesmos agentes indutores de agregação plaquetária. A percentagem de inibição (%) foi dada pela fórmula:

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde:

A = agregação do controle;

B = agregação da amostra em teste.

O efeito inibitório dos extratos foi comparado com dados previamente obtidos para o padrão ácido acetilsalicílico (AAS), por meio do cálculo da concentração inibitória 50 % (CI_{50}), utilizada como parâmetro para a avaliação da atividade antiagregante plaquetária (MEKHFI et al., 2004; KIM; LEE, 2006).

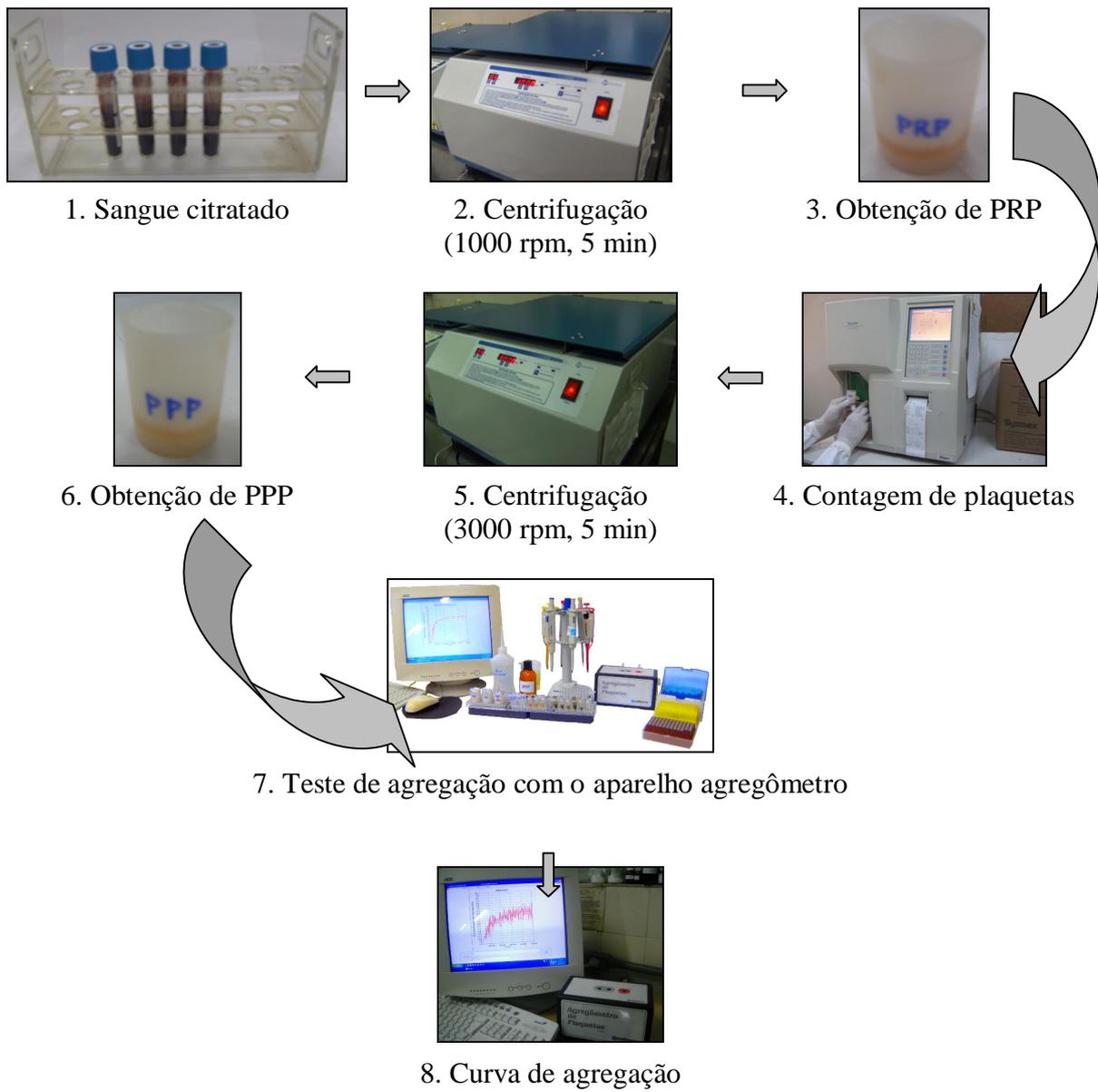


Figura 12 - Teste de agregação plaquetária.

4.6.4 Efeito sobre a inflamação

4.6.4.1 Teste do edema de pata induzido por carragenina

A caracterização da atividade antiinflamatória foi realizada pelo método de Winter et al. (1962) com adaptações, onde ratos foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco [número de amostras (n) = 20].

Uma hora antes da aplicação do agente inflamatório carragenina, os volumes basais de ambas as patas traseiras foram medidos e os animais foram tratados por gavagem (v.o.) com o veículo óleo mineral e Tween[®] 20 a 5 % diluído em salina 0,9 % (0,1 mL; controle negativo), com as diferentes doses do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (50, 100 e 150 miligramas por quilograma, mg/kg) e com o padrão indometacina (Indocid[®], 25 mg/kg; controle positivo).

Para a medida do volume das patas, cada uma delas foi imersa até o maléolo lateral em um pletismômetro, conforme ilustrado na Figura 13.

Após 1 h, os animais receberam uma injeção subplantar (s.pl.) de carragenina 1 % nas patas direitas (0,1 mL/100 g) e igual volume de salina 0,9 % nas patas esquerdas, as quais serviram como controle negativo. Imediatamente após a injeção de carragenina e a cada 30 min até a 5^a h após o estímulo, o volume das patas foi medido.

O valor do edema foi obtido pela média das diferenças dos aumentos das patas injetadas com o estímulo inflamatório.

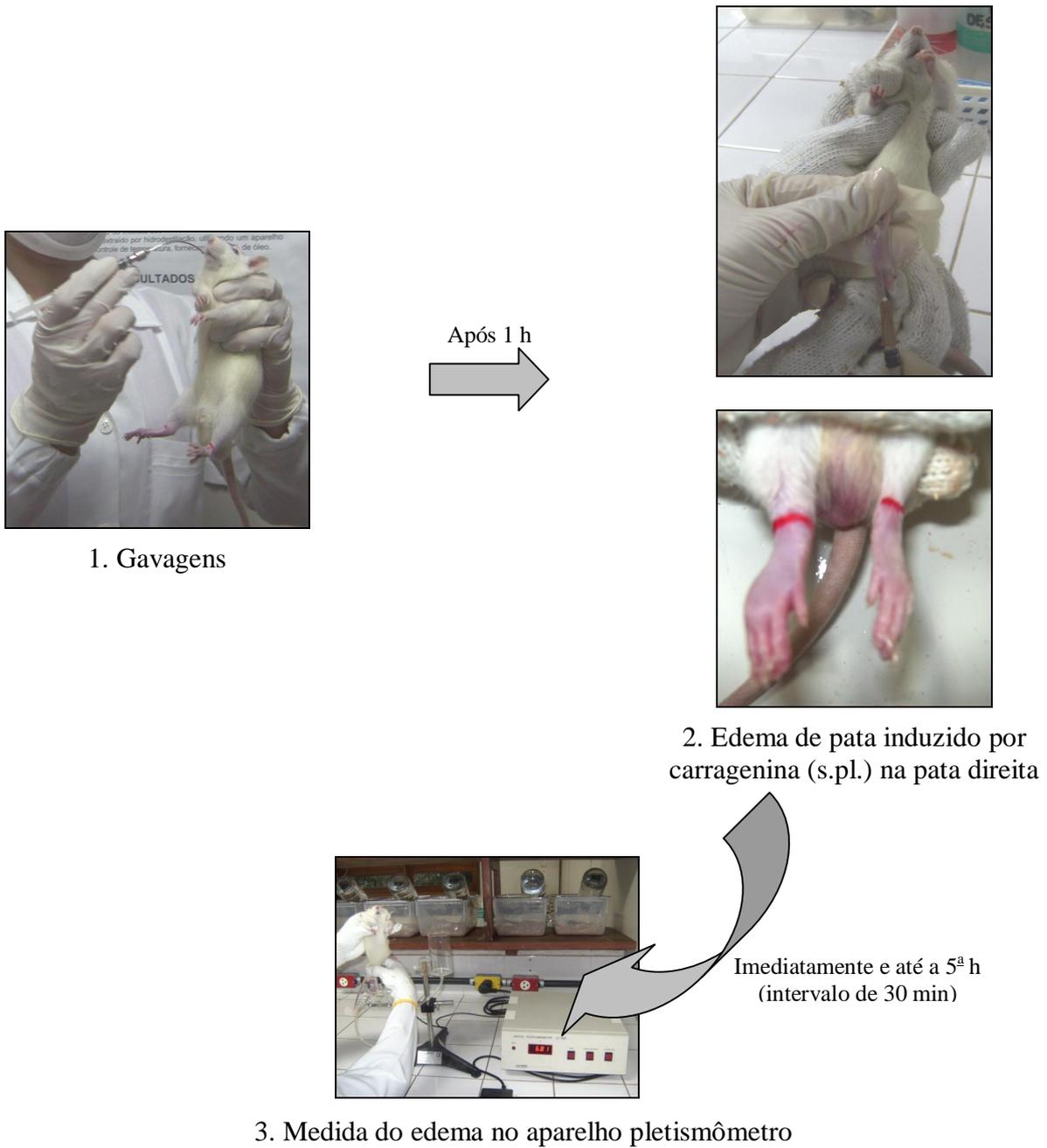


Figura 13 - Teste do edema de pata.

4.6.5 Efeito sobre a nocicepção

4.6.5.1 Teste de contorções

Para este teste foi utilizada a metodologia de Koster et al. (1959) modificada por LAPA et al. (2005), utilizando-se camundongos divididos aleatoriamente em grupos de cinco ($n=20$).

Os animais foram colocados em caixa de vidro e seus comportamentos foram observados por 15 min. Após esse tempo, os animais foram tratados por gavagem, com o veículo Tween[®] 20 a 5 % diluído em salina 0,9 % (10 mililitros por quilograma, mL/kg; controle negativo), com as diferentes doses do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (25 e 50 mg/kg) e com o padrão Indocid[®] (25 mg/kg; controle positivo).

Após 1 h, os animais receberam uma injeção i.p. de ácido acético a 2 % diluído em salina 0,9 % (10 mL/kg).

As contorções abdominais, consideradas como contrações da parede abdominal seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores (Figura 14), foram contadas cumulativamente durante os 30 min subseqüentes à injeção do ácido acético, sendo o número total neste período tomado como índice da resposta nociceptiva. Os resultados foram expressos como a média do número acumulado de contorções.

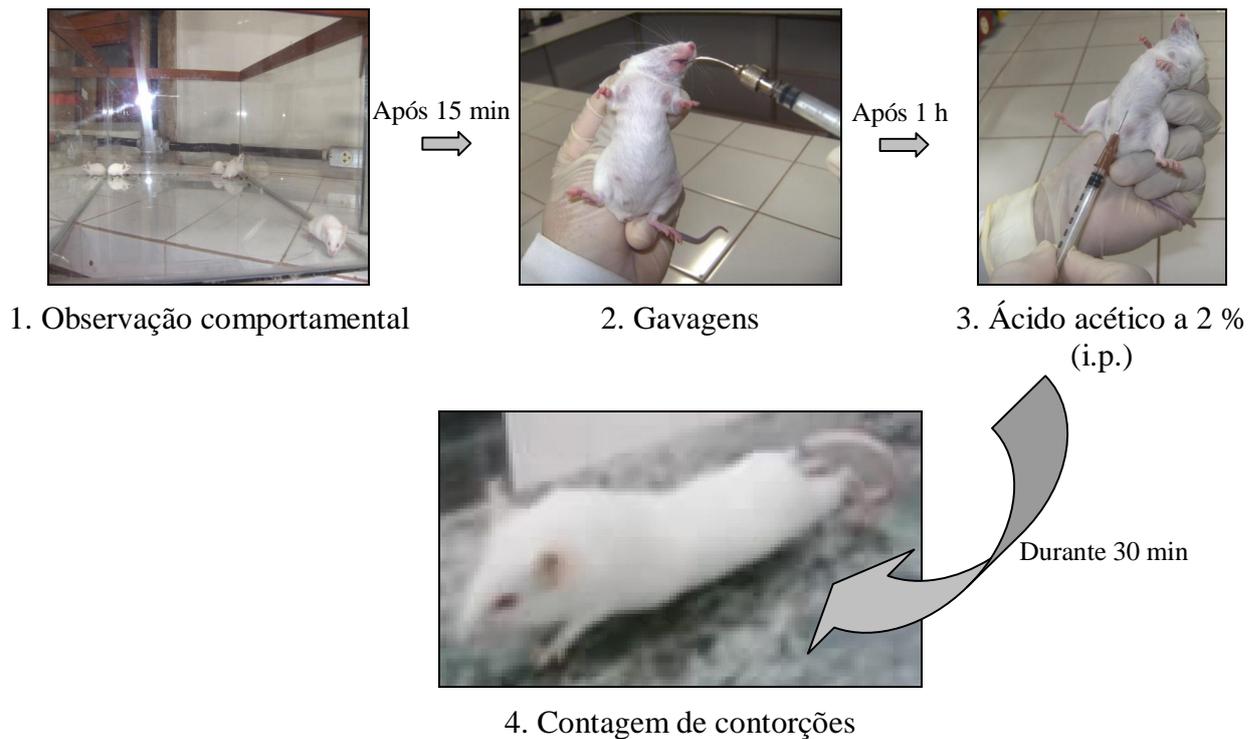


Figura 14 - Teste de contorções.

4.6.5.2 Teste da placa quente

A metodologia utilizada foi a de Woolfe e MacDonald (1944) modificada por Lapa et al. (2005), onde camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos de cinco ($n=20$) e foram colocados individualmente em uma placa quente com a temperatura constante a 53 °C.

Após a obtenção de dois valores basais do volume de ambas as patas traseiras (com intervalos de 30 min e tempo de corte de 15 segundos (s), os animais foram tratados por gavagem, com o veículo óleo mineral (10 mL/kg; controle negativo), com as diferentes doses do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (25 e 50 mg/kg) e com o padrão Fentanest[®] (20 µg/kg; controle positivo).

Reduziu-se a temperatura da placa quente para 48° C e decorridos 30 min, os animais receberam uma injeção s.pl. de carragenina 1 % nas patas direitas (30 μ L/pata) e igual volume de salina 0,9 % nas patas esquerdas e a latência à resposta foi determinada em segundos, aos 30, 60, 120 e 180 min, conforme ilustrado na Figura 15.

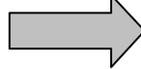
O tempo máximo de contato do animal com a placa quente foi mantido em 12 s (tempo de corte), a fim de evitar lesões nas patas.

Os estudos farmacológicos dos efeitos sobre a coagulação sangüínea e agregação plaquetária foram realizados no Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF/UFAM e os efeitos sobre a inflamação e nocicepção foram realizados em laboratórios da CPPN/INPA.



1. Gavagens

Após 30 min



2. Edema de pata induzido por carragenina (s.pl.) na pata direita



Aos 30, 60, 120 e 180 min



3. Medida da resposta ao estímulo térmico na placa quente

Figura 15 - Teste da placa quente.

4.7 Estudos de Toxicidade

4.7.1 Teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina*

O teste foi realizado pelos métodos de Meyer et al. (1982) e McLaughlin et al. (1998) com adaptações. O meio de cultura (solução salina) foi preparado com sal marinho (38 g/litro de água destilada), onde após filtração, 10 miligramas (mg) de ovos do microcrustáceo *Artemia salina* Leach foram adicionados, deixando-se o sistema sob aeração, luz (minicompressor de ar e lâmpada fluorescente) e temperatura ambiente (25 a 28 °C) durante 48 h.

As soluções para testes foram preparadas por dissolução do extrato aquoso (EA) em água destilada e dos extratos etanólico (EE) e hexânico (EH) em DMSO (30 mg/mL).

Após 48 h, as placas de cultura foram preparadas adicionando-se solução salina contendo larvas de *Artemia salina* ($n = 10$) em cada poço. Volumes de 100 μL (referente à concentração de 1 mg/mL) de cada solução de teste foram transferidos para os poços e completados para 3 mL com solução salina. Os controles negativos foram preparados transferindo-se, no lugar das soluções de teste, 100 μL dos veículos para os poços e utilizando-se solução salina contendo larvas ($n = 10$), conforme ilustrado na Figura 16.

Os testes foram realizados em triplicata e após incubação de 24 h, foi feita a contagem do número de microcrustáceos mortos, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de sobrevivência (\%)} = \frac{\text{Número de larvas vivas em (24 h)}}{\text{Número de larvas vivas em (0 h)}} \times 100$$



1. Ovos de *Artemia salina*

2. Sistema de aeração e luz

3. Placa com testes

Figura 16 - Teste de citotoxicidade dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth frente à *Artemia salina*.

4.7.2 Testes de toxicidade em roedores

Os testes foram realizados de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA (2004b), com adaptações. Os animais (camundongos BALB-c) foram divididos aleatoriamente em grupos de seis.

4.7.2.1 Testes gerais de atividade farmacológica

Inicialmente um grupo recebeu uma dose i.p. de 1 grama por quilograma (g/kg) do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* e em decorrência da morte dos animais, as doses foram reduzidas em ordem exponencial (500, 400, 200, 100 e 10 mg/kg) e, posteriormente fracionadas (475, 465, 460 e 450 mg/kg), tendo sido suficientes para observação de possíveis efeitos adversos e determinação da DL₅₀.

Os grupos tratados com o extrato EE administrado v.o. receberam inicialmente uma dose de 1 g/kg e devido à ausência de morte dos animais, as doses foram aumentadas para 2 e 5 g/kg e permaneceram sem efeito letal.

Um animal de cada grupo serviu de controle, administrando-se o veículo Tween[®] 20 a 5 % diluído em salina 0,9 % (10 mL/kg) aos controles dos grupos tratados via i.p. e óleo mineral e Tween[®] 20 (0,31; 0,22 e 0,6 mL) aos controles dos grupos tratados v.o nas doses de 1, 2 e 5 g/kg, respectivamente.

Após a administração do extrato, os animais foram observados acuradamente por 120 min sobre uma superfície plana e o período de observação foi durante as primeiras 72 h (0, 5, 10, 15, 30 e 60 min, 4, 8, 24, 48 e 72 h) até o 15^o dia após a administração.

4.7.2.2 Toxicidade aguda e determinação da dose letal 50 (DL₅₀)

Para todos os grupos, os sinais de toxicidade, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas, foram registrados em uma ficha de avaliação de atividade exploratória (APÊNDICE A) adaptada originalmente de Malone (1977), onde foi observado o maior número possível de parâmetros, tais como: alterações comportamentais, frequência respiratória, convulsões, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e análise macroscópica dos órgãos, a qual foi realizada nos animais injetados com o extrato EE na dose de 1 g/kg (i.p.) imediatamente após a morte, conforme ilustrado na Figura 17.

O número de animais mortos dentro do período de estudo foi registrado para cada grupo e subseqüentemente, a DL₅₀ das doses do extrato EE via i.p. foi calculada pela análise de probito de Finney (1947) e a porcentagem de mortalidade foi convertida em valores probitos, que juntamente com os logaritmos das concentrações correspondentes foram submetidos à análise por regressão linear. A partir da equação linear resultante, o valor de DL₅₀ foi determinado (CARLINI, 1973).

Os estudos de toxicidade foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e no Laboratório de Farmacologia do CPPN/INPA.

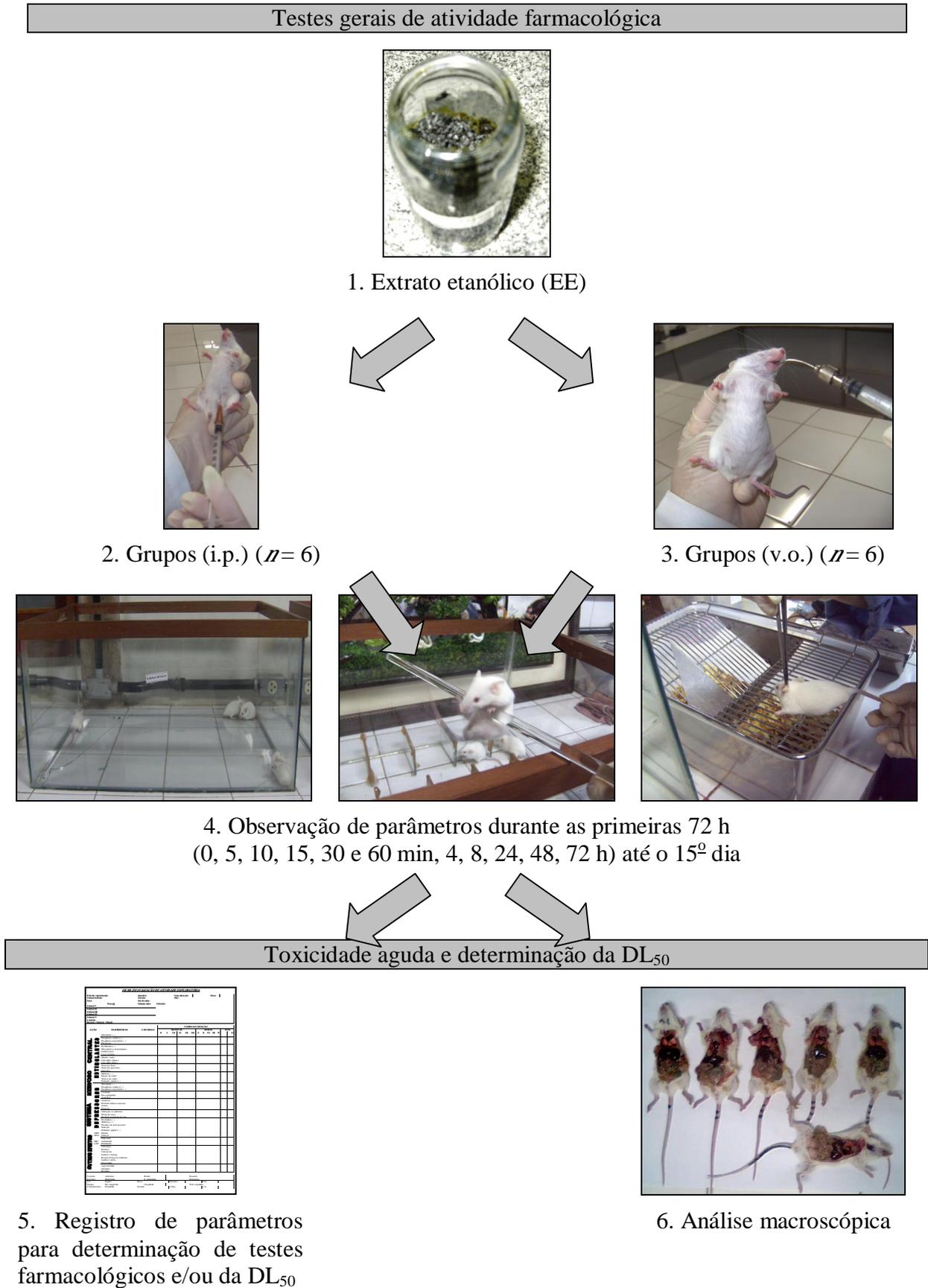


Figura 17 - Testes de toxicidade do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

4.8 Delineamento Experimental

O delineamento experimental desse estudo está demonstrado na Figura 18.

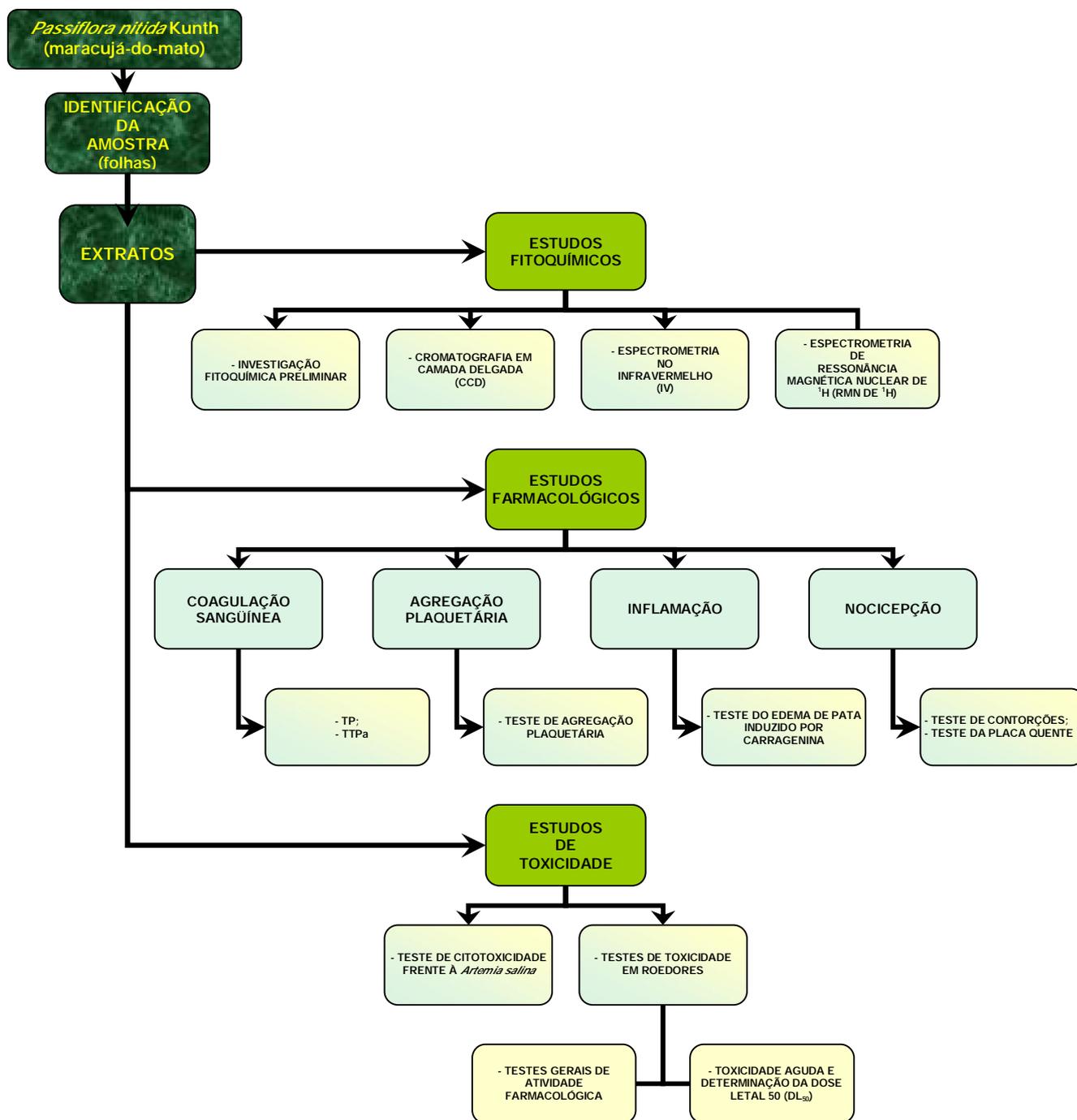


Figura 18 - Delineamento experimental.

4.9 Análise dos Resultados

Os resultados dos efeitos sobre a coagulação sanguínea, a inflamação e a nocicepção foram analisados com o programa SigmaStat (versão 3.5 para Windows; Systat Software, San Jose, California, EUA) e foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), verificando-se a normalidade através do teste de Kolmogorov Smirnov e utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações entre tratamentos, complementada pelo testes de Student-Newman-Keuls ou pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados indicativos de significância.

A determinação da CI_{50} do efeito sobre a agregação plaquetária foi realizada pelo método de regressão linear, usando o programa Origin[®] (versão 8.0; Micronal Software, Northampton, Massachusetts, EUA).

A análise de probito de Finney (1947) para a determinação da DL_{50} , foi realizada com o programa probit.exe MS-DOS.

Os gráficos foram elaborados com o programa Excel (Microsoft[®]; Seattle, Washington, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Estudos Fitoquímicos

5.1.1 Investigação fitoquímica preliminar

Os resultados obtidos na investigação de fitoconstituintes das folhas de *Passiflora nitida* Kunth estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da abordagem fitoquímica das folhas de *Passiflora nitida* Kunth

Grupos de flavonóides testados	Resultado
Antocianidinas	-
Antocianinas	-
Auronas	-
Catequinas	-
Flavanonas	±
Flavanonóis	-
Flavonas	++
Flavonóides livres (agliconas)	+
Flavonóis	++
Outros metabólitos testados	Resultado
Alcalóides	-
Bases quaternárias	-
Chalconas	-
Cumarinas	+++
Esteróides	++
Fenóis	++
Heterosídeos cianogênicos	+
Glicosídeos antraquinônicos	-
Glicosídeos cardioativos	++
Leucoantocianidinas	++
Resinas	-
Saponinas	+
Taninos	+++
Triterpenóides	-
Xantonas	++

- = Negativo; ± = Traços; + = Pequena quantidade; ++ = Maior quantidade e +++ = Grande quantidade.

5.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os resultados dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *P. nitida* obtidos por CCD, referentes às revelações com os reagentes específicos para antioxidantes e compostos fenólicos, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Revelações cromatográficas dos extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth frente aos reagentes específicos para compostos antioxidantes e fenólicos

Reagente	EA ^a	EE ^b	EH ^c
Iodo ressublimado	+	+	+
Ce(SO ₄) ₂	+	+	+
DPPH	++	++	+
AlCl ₃ 1 % alcoólico	+	+	+
NaOH 2 %, NH ₄ OH, Na ₂ CO ₃ 0,2 %	+	+	+
FeCl ₃ 1 % alcoólico	+	+	+
Folin-Ciocalteau	+	+	+

^a EA - Extrato aquoso das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

^b EE - Extrato etanólico das folhas de *P. nitida* Kunth.

^c EH - Extrato hexânico das folhas de *P. nitida* Kunth.

+ = positivo; ++ = completamente branco, significando intensa atividade antioxidante.

5.1.3 Espectrometria no infravermelho (IV)

A Figura 19 apresenta o espectro na região do infravermelho (IV) do extrato bruto EE das folhas de *P. nitida*. A absorção em 3398 cm^{-1} é atribuída a estiramentos de ligações O–H. As absorções intensas em 2925 e 2854 cm^{-1} e médias em 1450 e 1376 cm^{-1} são atribuídas às vibrações C–H de grupos alquila. As absorções em 1712 e 1245 cm^{-1} são atribuídas a estiramentos de ligações C = O e C–O, respectivamente. A absorção em 1658 cm^{-1} é atribuída a estiramentos de sistemas olefínicos (SILVERSTEIN et al., 2007a).

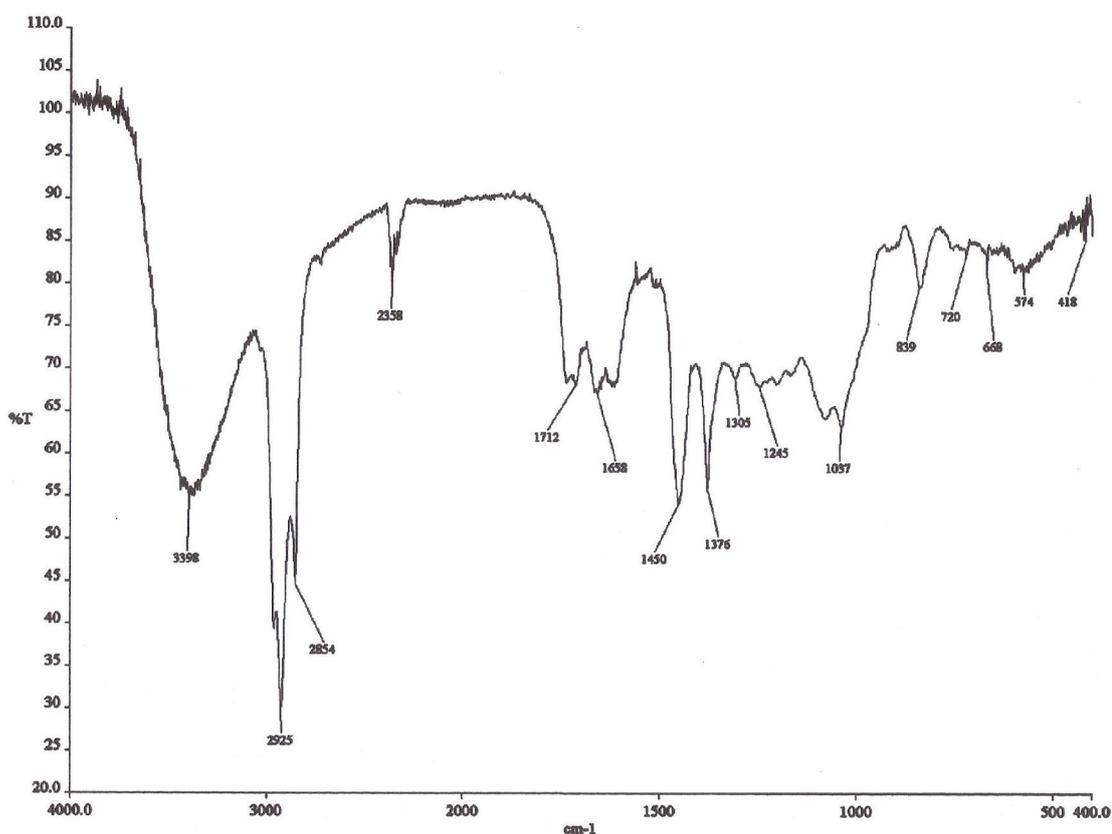
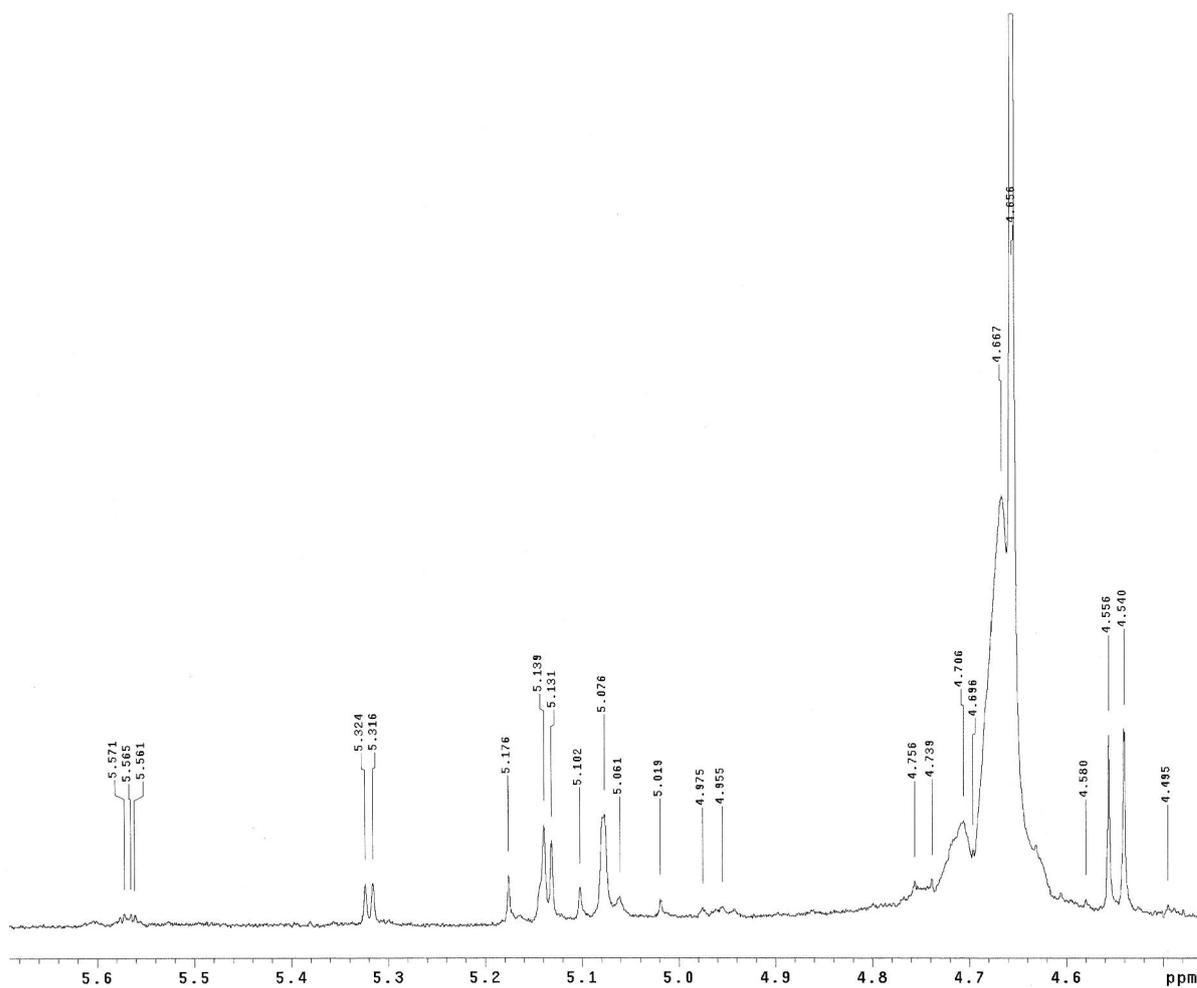


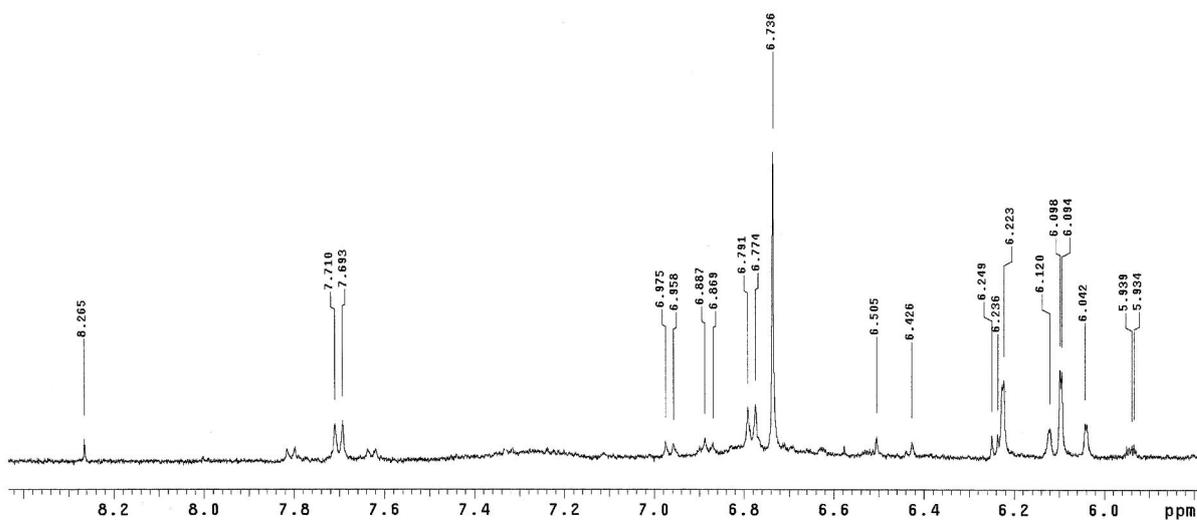
Figura 19 - Espectro na região do IV do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

5.1.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

Uma vez que o extrato havia apresentado atividade antioxidante e revelou também a presença de substâncias aromáticas, sendo possivelmente flavonóides, o mesmo foi então submetido à análise por RMN de ^1H , usando D_2O . Conforme apresentado na Figura 20, os sinais entre 0,7-0,9 ppm são atribuídos a hidrogênios em carbonos alifáticos. Os sinais em ~1,10 ppm são atribuídos a CH_2 alifáticos. O sinal em ~4,6 ppm é atribuído a hidrogênio ligado ao carbono anomérico de açúcar, como o J (constante de acoplamento) = 8 hertz (Hz), referente à configuração β , possivelmente β -glicose. Os diversos sinais entre 3 e 4 ppm sugerem a confirmação da presença de açúcares. Os sinais entre 5-5,2 e 5,9-6,2 ppm são atribuídos a ligações duplas isoladas. Os sinais entre 6,7-6,9 e 7,6-7,7 ppm são atribuídos a compostos aromáticos (SILVERSTEIN et al., 2007b).



A



B

Figura 20 - Expansões nas regiões entre: (A) δ_H 4,46-5,68 e (B) δ_H 5,8-8,4 do espectro de RMN de ¹H do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (D₂O, 500 MHz).

5.2 Estudos Farmacológicos

5.2.1 Efeito sobre a coagulação sanguínea

Os efeitos dos extratos brutos aquoso (EA), etanólico (EE) e hexânico (EH) das folhas de *P. nitida* sobre a coagulação sanguínea estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Efeitos de extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth nos testes de TP e TTPa

Amostra	Concentração (mg/mL)		TP (s)	TTPa (s)
	TP	TTPa		
Controle	Água Milli-Q		16,9 ± 0,2	38,0 ± 4,0
EA ^a	1,3	2	15,9 ± 0,1	34,9 ± 2,4
	0,7	1	15,3 ± 0,2*	38,1 ± 1,0
	0,3	0,5	16,5 ± 0,3	39,4 ± 5,2
			19,5 ± 0,5	59,8 ± 1,9
Controle	DMSO		19,5 ± 0,5	59,8 ± 1,9
EE ^b	1,3	2	7,8 ± 0,7*	65,2 ± 2,6
	0,7	1	19,6 ± 0,1	70,4 ± 3,0*
	0,3	0,5	19,6 ± 0,4	61,3 ± 1,2
			8,6 ± 0,7*	53,5 ± 1,1
EH ^c	1,3	2	8,6 ± 0,7*	53,5 ± 1,1
	0,7	1	19,2 ± 0,2	51,8 ± 1,1
	0,3	0,5	20,0 ± 0,3	52,9 ± 0,5

Os resultados foram expressos como média ± EPM com $n = 2-7$.

* $P < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey).

^a EA - Extrato aquoso das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

^b EE - Extrato etanólico das folhas de *P. nitida* Kunth.

^c EH - Extrato hexânico das folhas de *P. nitida* Kunth.

5.2.2 Efeito sobre a agregação plaquetária

Os efeitos dos extratos brutos EA, EE e EH das folhas de *P. nitida* sobre a agregação plaquetária e os valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀) estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 10 - Efeitos de extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth na agregação plaquetária induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	ADP (0,4 mg/mL)		ADR (10 $\mu\text{mol/L}$)	
		Agregação	Inibição	Agregação	Inibição
Controle	Água Milli-Q	62,2 \pm 1,8	-	84,7 \pm 5,8	-
EA ^a	500	n.d.	n.d.	25,5 \pm 0,5*	69,9 \pm 0,6
	250	48,3 \pm 2,1*	22,3 \pm 3,5	73,0 \pm 0,0	13,8 \pm 0,0
	125	55,5 \pm 1,5	10,8 \pm 2,4	84,5 \pm 0,5	0,2 \pm 0,6
Controle	DMSO	69,0 \pm 1,1	-	67,0 \pm 4,0	-
EE ^b	500	36,3 \pm 3,2*	47,3 \pm 4,6	41,0 \pm 4,0*	38,8 \pm 5,9
	250	36,5 \pm 1,5*	47,1 \pm 2,2	46,5 \pm 2,5*	30,6 \pm 3,7
	125	47,0 \pm 2,0*	31,9 \pm 2,9	51,5 \pm 0,5	23,1 \pm 0,8
Controle	DMSO	72,0 \pm 0,4	-	57,0 \pm 4,0	-
EH ^c	500	31,5 \pm 1,5*	56,3 \pm 2,0	32,5 \pm 1,5*	42,9 \pm 2,6
	250	38,5 \pm 0,5*	46,5 \pm 0,7	42,5 \pm 1,5	25,4 \pm 2,6
	125	56,5 \pm 0,5*	21,5 \pm 0,7	55,5 \pm 1,5	1,8 \pm 2,6

Os resultados foram expressos como média \pm EPM com $n = 2-5$.

* $P < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey).

Obs.: n.d.: não determinado.

^a EA - Extrato aquoso das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

^b EE - Extrato etanólico das folhas de *P. nitida* Kunth.

^c EH - Extrato hexânico das folhas de *P. nitida* Kunth.

Tabela 11 - Valores de CI_{50} dos extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth na agregação plaquetária induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR

Amostra	Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	
	ADP (0,4 mg/mL)	ADR (10 $\mu\text{mol/L}$)
EA ^b	450,5 \pm 50,7	438,7 \pm 5,2
EE ^c	511,2 \pm 35,5	21,0 \pm 1,9
EH ^d	394,4 \pm 8,9	546,9 \pm 49,9
AAS ^e	21,5 \pm 1,4	11,7 \pm 0,3

Cada valor representa a média \pm EPM para três experimentos (125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$).

^a Concentração ($\mu\text{g/mL}$) exigida para produzir 50 % de inibição de agregação plaquetária induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR.

^b EA - Extrato aquoso das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

^c EE - Extrato etanólico das folhas de *P. nitida*.

^d EH - Extrato hexânico das folhas de *P. nitida*.

^e AAS - Ácido acetilsalicílico.

5.2.3 Efeito sobre a inflamação

Os efeitos do extrato bruto EE das folhas de *P. nitida* sobre a inflamação, através do teste do edema de pata em ratos *Wistar*, estão apresentados na Figura 22.

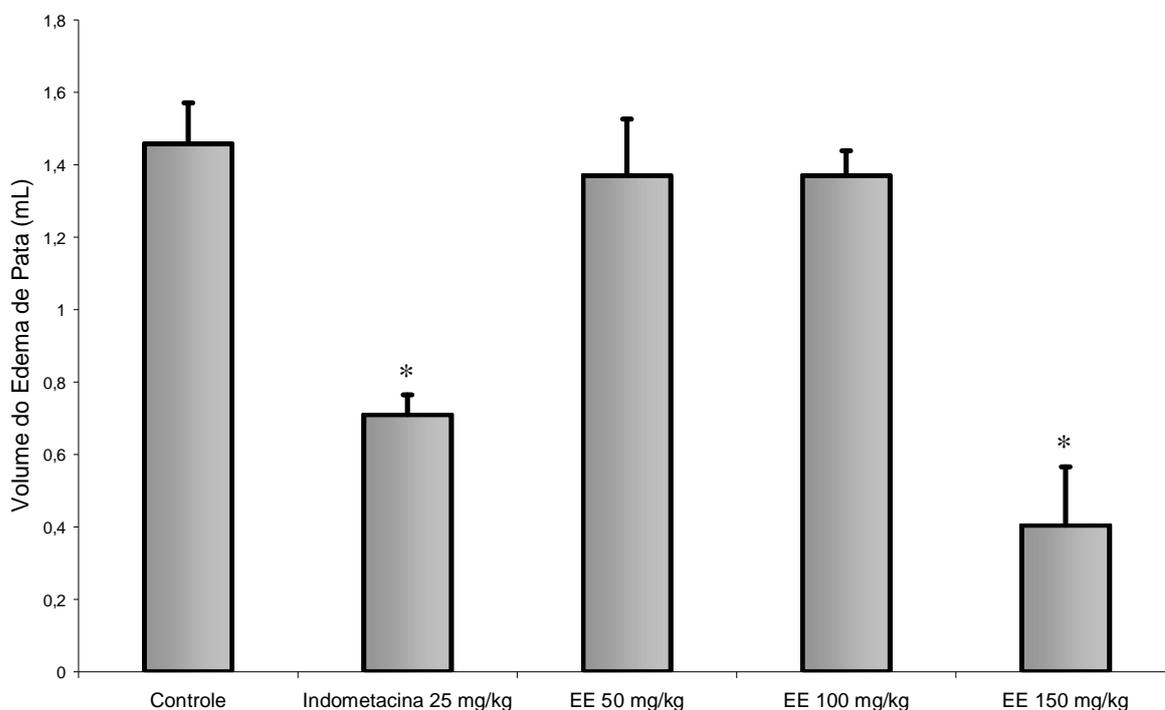


Figura 21 - Inibição do volume do edema de pata produzida pela indometacina (25 mg/kg; controle positivo; v.o.) e pelo extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (50, 100 e 150 mg/kg; v.o.) após 2 horas da aplicação s.pl. de carragenina 1 % (0,1 mL/100 g) em ratos *Wistar*. Cada coluna representa a média com EPM de 5 camundongos. (*) significa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) do grupo controle (óleo mineral e Tween[®] 20; 0,1 mL) pela ANOVA, complementada pelo teste de Tukey.

5.2.4 Efeito sobre a nocicepção

Os efeitos do extrato bruto EE das folhas de *P. nitida* sobre a dor, através dos testes de contorções e da placa quente em camundongos BALB-c estão apresentados nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

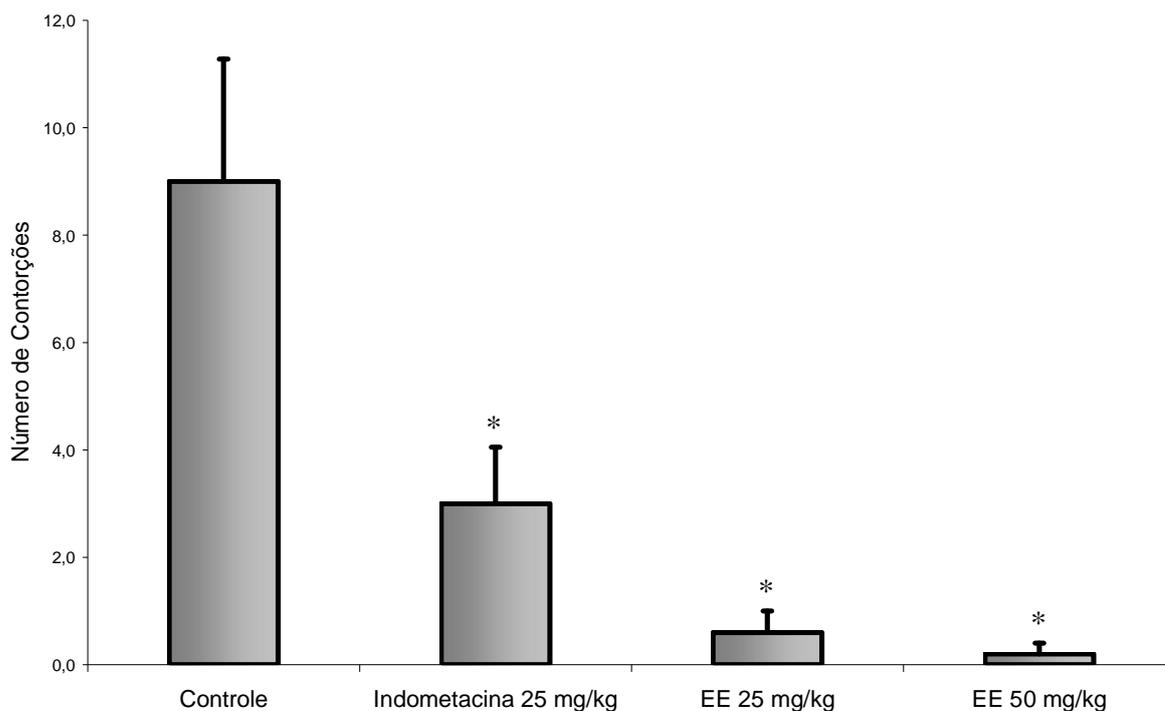


Figura 22 - Inibição de contorções produzida pela indometacina (25 mg/kg; controle positivo; v.o.) e pelo extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (25 e 50 mg/kg; v.o.) após 1 hora da aplicação i.p. de ácido acético 2 % diluído em salina 0,9 % (10 mL/kg) em camundongos BALB/c. Cada coluna representa a média com EPM de 5 camundongos. (*) significa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) do ao grupo controle (Tween[®] 20 a 5 % diluído salina 0,9 %, 10mL/kg) pela ANOVA, complementada pelo de Student-Newman-Keuls.

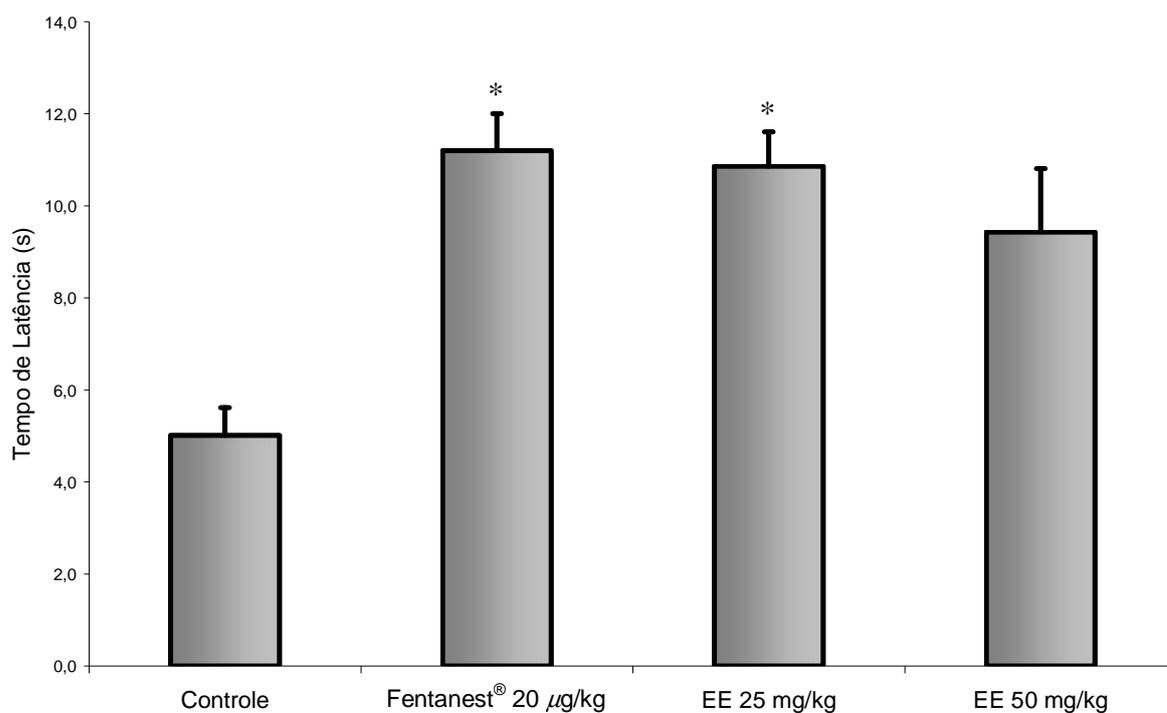


Figura 23 - Limiar nociceptivo térmico ao estímulo doloroso (teste da placa quente) produzida pelo Fentanest® (20 µg/kg; controle positivo; v.o.) e pelo extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *P. nitida* (25 e 50 mg/kg; v.o.) após 2 horas da aplicação s.pl. de carragenina 1 % (30 µg/mL) em camundongos BALB/c. Cada coluna representa a média com EPM de 5 camundongos. (*) significa diferenças estatísticas ($P < 0,05$) do grupo controle (óleo mineral e Tween® 20, 10 mL/kg) pela ANOVA, complementada pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.3 Estudos de Toxicidade

5.3.1 Teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina*

Os efeitos dos extratos brutos EA, EE e EH das folhas de *P. nitida* frente à *Artemia salina* estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Atividade citotóxica de extratos brutos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth frente à *Artemia salina*

Amostra	Concentração (mg/mL)	Letalidade (%)
Controle	Salina	0
Controle	Salina e água destilada	0
EA ^a	1	33,3
Controle	Salina e DMSO	0
EE ^b	1	23,3
Controle	Salina, Tween [®] 20 (5 %) e água destilada	0
EH ^c	1	13,3

^a EA - Extrato aquoso das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

^b EE - Extrato etanólico das folhas de *P. nitida* Kunth.

^c EH - Extrato hexânico das folhas de *P. nitida* Kunth.

5.3.2 Testes gerais de atividade farmacológica, toxicidade aguda e determinação da dose letal 50 (DL₅₀)

Os efeitos do extrato bruto EE das folhas de *P. nitida* em camundongos BALB-c estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. A análise macroscópica de camundongos tratados com o EE e a DL₅₀ estão apresentados nas Figuras 24 e 25 (página 88), respectivamente.

Tabela 13 - Toxicidade do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth em camundongos

Amostra	Dose (mg/kg)	Via de administração	Sobreviventes	Taxa de sobreviventes (%)
Controle	Salina 0,9 % e Tween [®] 20 (5 %)	i.p.	7/7	100,0
EE ^a	10		5/5	100,0
	100		5/5	100,0
	250		5/5	100,0
	400		5/5	100,0
	450		5/5	100,0
	460		4/5	80,0
	465		2/5	40,0
	475		0/5	0
	500		0/5	0
	1000		0/5	0
Controle	Óleo mineral	v.o.	3/3	100,0
EE ^a	1000		5/5	100,0
	2000		5/5	100,0
	5000		5/5	100,0

^a EE - Extrato etanólico das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.

Tabela 14 - Efeitos gerais do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth em camundongos

Amostra	Dose (mg/kg)	Via de administração	Parâmetros observados
Controle	Salina 0,9 % e Tween [®] 20 (5%)	i.p.	Lambida das patas, da barriga e do dorso, coceira do focinho, diminuição da motilidade, piloereção, micção aumentada, reclusão.
EE ^a	10 - 450		Frequência cardíaca aumentada, frequência respiratória aumentada, convulsão clônica, analgesia, ataxia, dispnéia, hiperemia na orelha, contorções.
	460 - 1000		Frequência cardíaca aumentada, frequência respiratória aumentada, exoftalmia, movimentos extereotipados, convulsão clônica, convulsão tônica, tremores finos, tremores grosseiros, catatonía, ataxia, dispnéia, perda da apreensão da pata, cianose na orelha, hiperemia na orelha, contorções, morte por paralisia cardiorespiratória.
Controle	Óleo mineral	v.o.	Frequência cardíaca aumentada, frequência respiratória aumentada, lambida das patas e do dorso, coceira do focinho, dispnéia, diminuição da motilidade, piloereção, tremores finos, reclusão.
EE ^a	1000 - 5000		Frequência cardíaca aumentada, frequência respiratória aumentada, piloereção, lambida das patas, coceira do focinho, convulsão clônica, tremores finos, motilidade diminuída, ataxia, dispnéia, contorções, lambida da barriga, reação de fuga ao ambiente, lambida do dorso, reclusão.

^a EE - Extrato etanólico das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.



Figura 24 - Análise macroscópica de camundongos tratados com extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth na dose de 1 g/kg (i.p.).

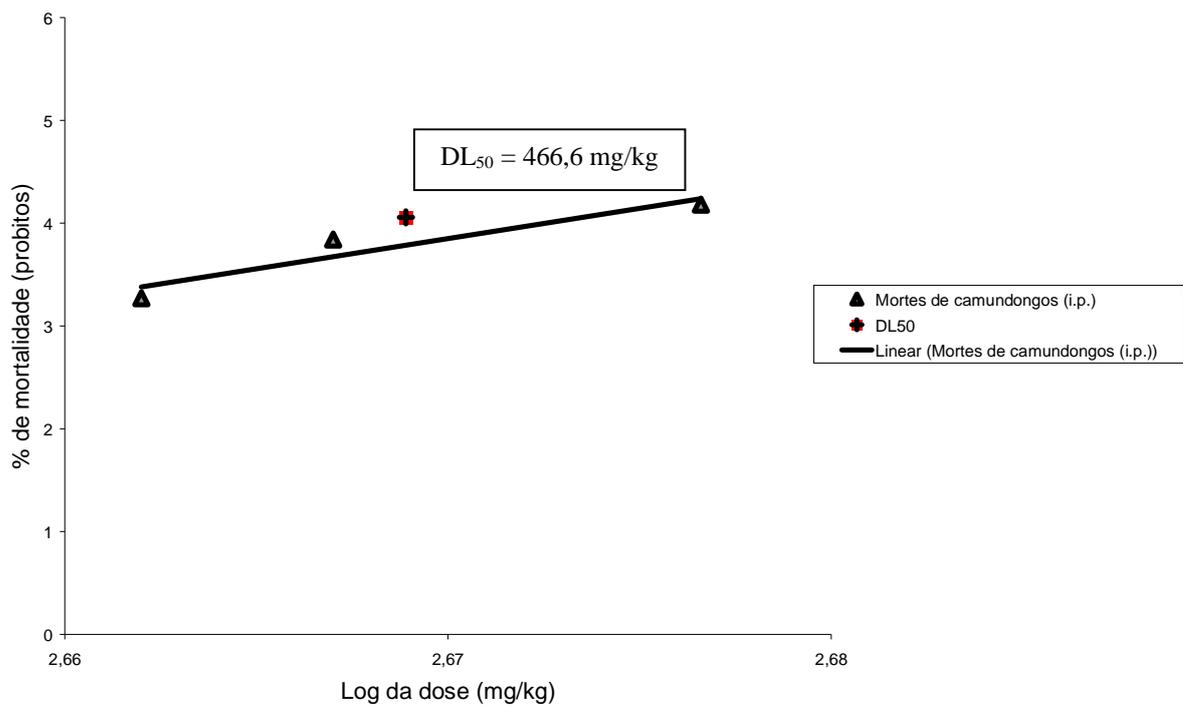


Figura 25 - DL₅₀ do extrato bruto etanólico (EE) das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (i.p.) nas doses de 460, 465 e 475 mg/kg em camundongos BALB-c. A Figura 25 mostra a correlação linear entre os logaritmos das doses e o percentual de morte em probitos.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho realizou estudo fitoquímico e de atividade farmacológica e toxicológica das folhas de *Passiflora nitida* Kunth. Os principais resultados encontrados foram concernentes aos efeitos sobre a inflamação, dor e à determinação da DL₅₀, encontrados na literatura somente para outras espécies deste gênero.

Não há relatos de trabalhos sobre o efeito na coagulação sanguínea, na agregação plaquetária e de citotoxicidade frente à *Artemia salina* para o gênero *Passiflora*, sendo este o primeiro estudo desta natureza. Vale ressaltar também que a determinação da DL₅₀ foi realizada pela primeira vez para esta espécie. Na literatura consultada, encontrou-se descrição de DL₅₀ somente para as espécies *P. alata* (OGA et al., 1984) e *P. mollissima* Bailey (EDWIN et al., 2007).

Inicialmente, realizou-se a prospecção fitoquímica, que foi compatível com estudos similares de outras espécies do gênero *Passiflora* (DI STASI et al., 2002; RUDNICKI et al., 2007), conforme apresentado na Tabela 7 (página 75).

Na CCD, utilizando-se reveladores específicos para determinadas classes de compostos, os extratos brutos EA, EE e EH das folhas de *P. nitida* foram positivos para substâncias antioxidantes, compostos fenólicos e sugestivo para flavonóides, conforme demonstrado na Tabela 8 (página 76). Tais resultados estão de acordo com trabalhos descritos na literatura que relatam a presença de flavonóides e, inclusive, de saponinas, observados por meio de CCD (OGA et al., 1984; SOULIMANI et al., 1997; DHAWAN et al., 2001a; DOYAMA et al., 2005; FENNER, 2006; BENINCÁ et al., 2007; BÔAS, 2007; PROVENSI, 2007).

A análise do espectro no IV foi sugestiva da presença de vários grupos funcionais, compatíveis com os resultados observados na prospecção fitoquímica e na CCD, conforme

demonstrado na Figura 19 (página 77) e com dados obtidos da literatura (DHAWAN et al., 2003, 2004; DHAWAN; SHARMA, 2002b, 2003).

Os espectros de RMN de ^1H do EE, obtidos com D_2O , apresentaram boa resolução, com sinais finos e desdobramentos em doubletos, quartetos, etc (Figura 20, página 79). Por se tratar de um extrato bruto contendo ainda muitas substâncias, é possível que nem todas tenham sido solubilizadas, uma vez que, pela observação dos testes anteriormente elaborados, o extrato sugere ser rico em substâncias alifáticas, alcanos, ésteres e alguns açúcares ligados ou não a essas cadeias. No espectro no IV (Figura 19, página 77) não houve sinais intensos na região de substâncias aromáticas, no entanto, de acordo com a prospecção fitoquímica há compostos aromáticos, inclusive com predominância de substâncias flavonoídicas. Além desse dado, no espectro de RMN de ^1H (Figura 20, página 79) há sinais entre δ_{H} 7,6-8,3, região atribuída à presença de compostos aromáticos.

O extrato EE apresentou efeitos farmacológicos, porém, pelas análises realizadas, não podemos afirmar qual ou quais são as substâncias responsáveis pelas atividades. Para tal, é necessário que sejam isoladas as substâncias e, novamente, testadas farmacologicamente.

Após a investigação fitoquímica preliminar e obtenção dos extratos brutos, estes foram testados quanto ao efeito sobre a coagulação sanguínea, utilizando os testes TP e TPPa. Quando examinados pelo teste TP, os extratos brutos EA, EE e EH das folhas de *P. nitida* apresentaram atividade coagulante estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Os dados sugerem que essa atividade seja devida à interferência dos extratos na via extrínseca da coagulação (fator VII). O extrato EE, por sua vez, apresentou atividade anticoagulante estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no teste TTPA, o que sugere que ele inibe um ou mais fatores da via intrínseca da coagulação (fatores VIII, IX, XI, XII). Todos os resultados dos testes de coagulação estão apresentados na Tabela 9 (página 80). A atividade do extrato EE sobre a coagulação sanguínea está em consonância com as propriedades farmacológicas de inibição

da coagulação, relatadas na literatura para flavonóides e cumarinas, sugestivamente presentes na prospecção fitoquímica da espécie (KUSTER; ROCHA, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Uma possível explicação para o comportamento do extrato EE, estaria no fato de o mesmo fator agir como um procoagulante e como um anticoagulante sob condições diferentes. Por exemplo, mostrou-se que a trombina age como um procoagulante ao clivar o fibrinogênio, promovendo a formação de um coágulo de fibrina. Mas, age como um anticoagulante ao ativar a proteína C na presença do co-fator trombosmodulina (OSONIYI; ONAJOBI, 2003; KUMAR et al., 2005; PEREIRA; BOGLIOLO, 2006).

A baixa expressividade de atividade coagulante e anticoagulante dos extratos EA, EE e EH e pode ser benéfica por não vir a potencializar o efeito de fármacos anticoagulantes, evitando desta forma, o risco de hemorragias e confirma, em parte, o uso popular do gênero *Passiflora* contra picadas de cobra (DHAWAN et al., 2004).

Os extratos também foram testados quanto ao efeito sobre a agregação plaquetária. Os extratos EA, EE e EH inibiram a agregação induzida pelos agentes indutores de agregação plaquetária ADP e ADR, conforme resultados apresentados na Tabela 10 (página 81). Os valores de CI_{50} presentes na Tabela 11 (página 81) apresentaram uma atividade não seletiva por agentes indutores de agregação. A espécie estudada apresentou efeito inibitório mais acentuado quanto ao extrato EE induzido por ADR ($CI_{50} = 21,0 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$), quando comparado ao padrão AAS ($CI_{50} = 11,7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$).

A atividade antiagregante da *P. nitida* pode ser atribuída, em parte, à presença de flavonóides e cumarinas, sugestivamente presentes na prospecção fitoquímica da espécie e que segundo a literatura, podem inibir a agregação plaquetária (KUSTER; ROCHA, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Estudos sugerem efeitos benéficos dos flavonóis, flavonas e lignanas sobre DCV e têm mostrado que algumas flavonas atuam como um agente

antiagregante, inibindo a atividade da enzima COX de plaquetas humanas (SILVA et al., 2002; ARTS; HOLLMAN, 2005).

No estudo do efeito sobre a inflamação, o extrato EE apresentou atividade antiinflamatória, de acordo com a Figura 21 (página 82), onde grupos de ratos *Wistar* tratados com doses orais de 50, 100 e 150 mg/kg apresentaram inibição do volume do edema de pata de 6,0; 6,0 e 72,2 %, respectivamente, após 2 h da aplicação s.pl. de carragenina, em relação ao controle. Os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados na literatura para outras espécies deste gênero, porém, com exceção da *P. incarnata* administrada v.o. (BORRELLI et al., 1996), as demais espécies foram testadas utilizando-se outras vias de administração. Por exemplo: *P. alata* (VARGAS et al., 2007) e *P. edulis*, via i.p. (SILVA et al., 2001; BEZERRA José et al., 2006; GONÇALVES-FILHO et al., 2006; BENINCÁ et al., 2007; MONTANHER et al., 2007; VARGAS et al., 2007), sendo que para a última também foi testada a via dérmica (GARROS et al., 2006; GOMES et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Isto indica que, provavelmente, os seus constituintes podem inibir diferentes aspectos, onde estão envolvidos vários mediadores químicos da inflamação, tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (BRAGGIO et al., 2002; LAPA et al., 2005).

A atividade antiinflamatória do EE pode ser devida à presença de compostos fenólicos, de acordo com estudo que utilizou a metodologia do edema de pata induzido por carragenina, no qual diversas flavanonas, flavonas e flavonóis exibiram atividade antiinflamatória quando da administração via oral (KIM et al., 2004).

Os flavonóides provavelmente têm múltiplos mecanismos celulares agindo em vários lugares da maquinaria celular, mas um dos mecanismos importantes parece ser a inibição de eicosanóides, gerando enzimas como a PLA₂, COX e LOX, reduzindo desta forma, as concentrações de prostanóides e de leucotrienos. Estudos demonstram claramente que alguns flavonóides inibem a COX-1, para os quais se atribui alta margem de segurança, por não

produzirem efeitos colaterais, como ulcerogenicidade (MUNIAPPAN; SUNDARARAJ, 2003; CARVALHO, 2004; KIM et al., 2004).

Quanto ao estudo do efeito sobre a dor, resultados diversos são descritos para o gênero *Passiflora*. No estudo de Silva et al. (2001), o extrato etanólico das folhas de *P. edulis* promoveu analgesia, o que não foi demonstrado pelo extrato da *P. alata* nos estudos de Oga et al. (1984).

No presente trabalho, os grupos tratados com o extrato EE nas doses orais de 25 e 50 mg/kg apresentaram menores estímulos dolorosos nos modelos de nocicepção realizados em camundongos BALB-c. No teste de contorções induzidas por ácido acético, os grupos apresentaram menor número de contorções ($0,6 \pm 0,4$ e $0,2 \pm 0,2$) para as doses de 25 e 50 mg/kg, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($9,0 \pm 2,3$), conforme demonstrado na Figura 22 (página 83). A dose de 25 mg/kg aumentou o tempo de latência no teste de placa quente, comparada ao grupo controle ($10,9 \pm 0,7$; $5,0 \pm 0,6$ s, respectivamente), conforme demonstrado na Figura 23 (página 84). Resultados semelhantes foram descritos na literatura para a espécie *P. edulis* (SILVA et al., 2001), porém utilizando doses consideravelmente maiores (0,5; 1,0 e 2,0 g/kg), via intraperitoneal.

A intensidade de uma resposta nociceptiva é resultante da ação combinada de numerosos mediadores químicos que, atuando em sítios periféricos, medulares ou centrais, exacerbam ou modulam esta resposta (LAPA et al., 2005). O extrato EE testado, possivelmente, está exercendo ações antinociceptivas sobre o sistema nervoso periférico pela inibição dos mediadores endógenos (VILLALBA et al., 2007).

Quanto às doses estudadas, os resultados apresentados sugerem a presença de compostos químicos característicos aos agentes antiinflamatórios não-esteroidais, em razão das atividades antiinflamatória e analgésica dose-dependentes, ou seja, os AINE são bons analgésicos e antipiréticos em baixas doses e tem melhor efeito antiinflamatório em doses

maiores, que inibem a COX do ácido araquidônico (AA) nas células inflamatórias e reduzem a síntese de prostanóides (BOTTING; BOTTING, 2000; SILVA et al., 2001; BRAGGIO et al., 2002; CERDA; ARRAU, 2002; RANG et al., 2004; BEZERRA et al., 2006; GARROS et al., 2006; GOMES et al., 2006; SILVA et al., 2006).

O resultado da *P. nitida* sobre a inflamação e a dor foi comparado a outros estudos, onde a ação da planta foi, provavelmente, semelhante à do AINE indometacina, que é o padrão utilizado como controle positivo nos testes de edema de pata e de contorções (SILVA et al.; 2001; SOUSA et al., 2007). Porém testes adicionais são necessários para comprovar tal fato.

A fim de verificar a toxicidade da espécie estudada, realizou-se o teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina*, de toxicidade aguda e a determinação da DL₅₀. Segundo Meyer et al. (1982) considera-se que um composto é ativo no teste frente à *Artemia salina* quando se encontra valores de concentração letal (CL₅₀) abaixo de 1 mg/mL. Os extratos EA, EE e EH não apresentaram efeito citotóxico após o período de avaliação padrão de 24 h, conforme a Tabela 12 (página 85).

Nos testes gerais de atividade farmacológica, os grupos tratados com o extrato EE via i.p. apresentaram parâmetros de toxicidade apresentados na Tabela 14 (página 87) e observou-se efeito letal em doses acima de 460 mg/kg (i.p.). As mortes ocorreram dentro de 24 h e os animais sobreviventes (Tabela 13, página 86) pareciam estar recuperados dos efeitos da droga dentro deste período. No entanto, segundo parâmetros de comportamento observados na Tabela 14 (página 87), este extrato não foi letal até a dose máxima de 5 g/kg (v.o.) no mesmo modelo animal.

Os animais que receberam a administração do extrato EE via i.p na dose de 1 g/kg apresentaram convulsão e cianose precedendo o óbito. Os parâmetros utilizados para avaliar a depressão respiratória foram: frequência respiratória inferior a 60 respirações por minuto e

cianose de extremidades (cauda, patas e focinho), os quais precediam a parada cardiorrespiratória.

Na análise macroscópica da cavidade abdominal observou-se que o fígado de coloração escura e os intestinos delgado e grosso mantiveram suas colorações semelhantes as do grupo controle. Na cavidade torácica observamos pulmões hiperêmicos, vasos dilatados e o coração escuro quando comparados com as mesmas estruturas do grupo controle.

A DL₅₀ do extrato EE foi estimada em 466,6 mg/kg nas doses avaliadas via i.p. em camundongos BALB/c, conforme apresentado na Figura 25 (página 88) e serviu como base para estabelecer as doses nos experimentos farmacológicos deste estudo. O efeito letal apresentado para a via i.p. pode dever-se à toxicidade provocada por heterosídeos cianogênicos, cumarinas, glicosídeos cardioativos e/ou saponinas observados na prospecção fitoquímica (KUSTER; ROCHA, 2007; RATES; BRIDI, 2007; SCHENKEL et al., 2007a,b), conforme a Tabela 7, página 75. Considerando a existência de componentes cianogênicos em espécies de *Passiflora*, os testes de toxicidade não devem ser excluídos (DHAWAN et al., 2004).

Comparando com dados da literatura sobre toxicidade do gênero *Passiflora*, alguns frutos imaturos de espécies de *Passiflora* (por exemplo, *P. adenopoda*) podem ser tóxicos e até fatais quando ingeridos (BÔAS, 2007). Dos frutos e folhas de *P. edulis* caracterizou-se a ausência de toxicidade. Porém, outros trabalhos relatam a presença de efeito tóxico como a promoção de um quadro de hepatodistrofia quando do uso de dose superior à preconizada pela população e efeitos tóxicos nos sistemas hepático e pancreático (MALUF et al., 1991; DI STASI et al., 2002).

No estudo de Oga et al. (1984), o extrato bruto das folhas de *Passiflora alata* submetido ao teste de toxicidade aguda em camundongos, revelou que o efeito letal é causado em doses acima de 432 mg/kg. Todos os animais apresentaram sintomas depressivos com

sonolência e em doses letais, as mortes ocorreram dentro de 24 h, tendo o valor de DL₅₀ sido estimado como 456 mg/kg. Contudo, foi revelada a ausência de toxicidade dos extratos de *P. alata* e *P. edulis* na gestação de roedores, com o tratamento oral de 800 mg/kg/dia (AMARAL et al., 2001).

Devido à inexistência de dados científicos sobre as ações no SNC, aconselha-se utilizar *Passiflora nitida* com cautela, especialmente quando o uso for feito concomitantemente com depressores ou estimulantes do SNC, tendo em vista a atividade depressora e a atividade estimulante presente na literatura para outras espécies do gênero (DHAWAN et al., 2004).

Os extratos brutos EA, EE e EH das folhas de *P. nitida* sugerem possuir constituintes ativos com potencialidades para fins terapêuticos, como demonstrado nos métodos empregados. Os resultados aqui obtidos contribuem, portanto, para a validação do uso popular do gênero *Passiflora*. No entanto, os mecanismos exatos das atividades terapêuticas dos extratos da *P. nitida* ainda são desconhecidos, devendo estes estudos ser acrescidos de fracionamento, isolamento e testes farmacológicos adicionais, visando à obtenção de princípios ativos e elucidação dos mecanismos de ação, a fim de garantir o uso seguro pela população.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Na análise das folhas de *Passiflora nitida* Kunth, os flavonóides destacaram-se como classe majoritária de compostos químicos, à qual podem ser atribuídos, em parte, os efeitos farmacológicos estudados.
- Os extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas de *P. nitida* apresentam moderadas atividades coagulante e anticoagulante.
- O extrato etanólico apresenta efeitos antiagregante plaquetário mais significativo, antiinflamatório e antinociceptivo.
- Os extratos aquoso, etanólico e hexânico não apresentam citotoxicidade frente à *Artemia salina*.
- O extrato etanólico não é tóxico quando da aplicação via oral até a dose máxima de 5 g/kg. A DL₅₀ é de 466,6 mg/kg, quando administrado via intraperitoneal.
- As folhas de *P. nitida* possuem constituintes ativos, com potencialidades para fins terapêuticos e são promissores para futuros estudos, visando, por exemplo, a elaboração de fitoterápicos.
- Os efeitos farmacológicos apresentados contribuem para futura elaboração de produtos biotecnológicos derivados desta fonte natural local, haja vista o potencial econômico que uma planta ou substância com algumas dessas atividades podem trazer para a região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHONDZADEH, S.; NAGHAVI, H.R.; VAZIRIAN, M.; SHAYEGANPOUR, A.; RASHIDI, H.; KHANI, M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 26, n. 5, p. 363-7, 2001a.

_____. Passionflower in the treatment of opiates withdrawal: a double-blind randomized controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 26, n. 5, p. 369-73, 2001b.

AMARAL, Karine Medeiros; SCHENKEL, Eloir; LANGELOH, Augusto. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims em ratas *Wistar*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 20, n. 3, p. 215-20, 2001.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 fev. 2000.

_____. Resolução - RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 mar. 2004a.

_____. Resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a determinação da publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 mar. 2004b.

ARTS, Ilja C.W.; HOLLMAN, Peter C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, n. 1 (Supplement), p. 317S-25S, 2005.

BARBOSA, Paulo Roberto. *Estudo da ação psicofarmacológica de extratos de Passiflora alata Dryander e Passiflora edulis Sims*. Criciúma: UNESC, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2006.

BARRETO-NETTO, Manoel; SANTOS, João Lobato; MONTENEGRO, Mario Rubens. Perturbações circulatórias. In: MONTENEGRO, Mario Rubens; FRANCO, Marcello (eds). *Patologia: processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

BENDINI, Alessandra; CERRETANI, Lorenzo; PIZZOLANTE, Luca; TOSCHI, Tullia Gallina; GUZZO, Flávia; CEOLDO, Stefania; MARCONI, Andrea Maria; ANDREETTA, Filippo; LEVI, Marisa. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research Technology*, v. 223, n. 1, p. 102-9, 2006.

BENINCÁ, Jucélia Pizzetti; MONTANHER, Ana Beatriz; ZUCOLOTTI, Silvana Maria; ESCHENKEL, Eloir Paulo; FRÖDE, Tânia Silvia. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, v. 104, n. 3, p. 1097-105, 2007.

BERNARDI, Patrícia Sigilló Mazzoni; MOREIRA, Haroldo Wilson. Perfil agregante em cardíacos em uso do ácido acetil salicílico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n. 1, p. 31-4, 2005.

BERNE, Robert M.; LEVY, Matthew N.; KOEPPEN, Bruce M.; STANTON, Bruce A. Hemostasia e coagulação. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

BEZERRA, Jeamile L.; COSTA, Graciomar C.; LOPES, Thaiana C.; CARVALHO, Izabelle C.D.S.; PATRÍCIO, Fernando J.; SOUSA, Sanara M.; AMARAL, Flávia M.M.; REBELO, José Manuel M.; GUERRA, Rosane N.M.; RIBEIRO, Maria Nilce S.; NASCIMENTO, Flávia R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16 (Suplemento), p. 631-7, dez. 2006.

BEZERRA, José Antonio Ferreira; CAMPOS, Antonio Carlos L.; VASCONCELOS, Paulo Roberto Leitão; NICARETA, Jean Ricardo; RIBEIRO, Elaine Rossi; SEBASTIÃO, Ana Paula Martins; URDIALES, Akihito Inca A.; MOREIRA, Marlus; BORGES, Alessandra Miguel. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de anastomose colônica em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21 (Supl. 3), p. 16-25, 2006.

BÔAS, Larissa de Biaggi Villas. *Estudo dos constituintes químicos ansiolíticos e sedativos de Passiflora actinia Hook, Passifloraceae*. Curitiba: UFPR, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2007.

BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. The aggregation of blood platelets. *Journal of Physiology*, v. 168, p. 178-95, 1963.

BORRÁS, Maria Rosa Lozano. *Plantas da Amazônia: medicina ou mágicas? - Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*. Manaus: Valer / Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A.A., MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. *Phytotherapy Research*, v. 10 (Suppl 1), p. 104S-6S, 1996.

BOTTING, R.M.; BOTTING, J.H. Pathogenesis and mechanisms of inflammation and pain: an overview. *Clinical Drug Investigation*, v. 19 (Suppl 2), p. 1-7, 2000.

BRAGGIO, M.M.; LIMA, M.E.L.; VEASEY, E.A., HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 4, p. 49-53, out./dez. 2002.

CARLINI, E.A. *Farmacologia prática sem aparelhagem*. São Paulo: Sarvier, 1973.

CARVALHO, José Carlos Tavares. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CERDA, Osses Haydeé; ARRAU, Mario Poblete. *Manejo de dolor postoperatorio*. Revista Chilena de Anestesia, v. 31, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.socanestesia.cl/rev_anestesia/0202/manejo.asp>. Acesso em: 16 jun. 2008.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. ***Princípios Éticos na Experimentação Animal***, 1991. Disponível em: <<http://www.unb.br/ib/ceua/COBEA.htm>>. Acesso em: 08 ago. 2008.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. ***British Journal of Pharmacology and Chemotherapy***, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COSTA, Aloísio Fernandes. Fármacos com alcalóides. In: _____. ***Farmacognosia: Farmacognosia Experimental*** rev. atual. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001a. 3 V.

_____. Fármacos com heterósidos. In: _____. ***Farmacognosia: Farmacognosia Experimental*** rev. atual. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001b. 3 V.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; CHHABRA, Sumit. Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic. ***Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences***, v. 6, n. 2, p. 215-22, 2003.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam. *Passiflora*. a review update. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, Kamaldeep; KUMAR, Suresh; SHARMA, Anupam. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 78, n. 2-3, p. 165-70, 2001a.

_____. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. ***Fitoterapia***, v. 72, n. 8, p. 922-6, 2001b.

_____. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. ***Fitoterapia***, v. 72, n. 6, p. 698-702, 2001c.

DHAWAN, Kamaldeep; SHARMA, Anupam. Antitussive activity of the methanol extract of *Passiflora incarnata* leaves. ***Fitoterapia***, v. 73, n. 5, p. 397-9, 2002a.

_____. Prevention of chronic alcohol and nicotine-induced azospermia, sterility and decreased libido, by a novel tri-substituted benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linneaus in healthy male rats. ***Life Sciences***, v. 71, n. 26, p. 3059-69, 2002b.

_____. Restoration of chronic- Δ^9 -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. ***British Journal of Pharmacology***, v. 138, n. 1, p. 117-20, 2003.

DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko; GONZALES, Fabiana Gaspar; PORTILHO, Wagner Gomes. Violaes medicinais. In: DI STASI, Luiz Claudio; HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko. ***Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica***. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Ed. da UNESP, 2002.

DOLABELA, Maria Fâni. *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-T. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*. Belo Horizonte: UFMG, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEGAS, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, n. 3, p. 371-4, 2005.

EDWIN, E.; SHEEJA, E.; DHANABAL, S.P.; SURESH, B. Antihyperglycemic activity of *Passiflora mollissima* Bailey. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 69, n. 4, p. 570-1, 2007.

FALKENBERG, Miriam de Barcellos; SANTOS, Rosana Isabel; SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

FENNER, Raquel. *Avaliação do efeito hipnótico/sedativo e ansiolítico de um extrato seco nebulizado de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae)*. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

FINNEY, David J. *Probit analysis. a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge: Cambridge University Press, 1947.

GAILLIOT, F. Patrick. Initial extraction and product capture. In: CANNELL, Richard J.P. *Natural Products Isolation*. Totowa: Humana Press, 1998.

GARCIA, Eloi Silva; SILVA, Ana Célia Pessoa; GILBERT, Benjamin; CORRÊA, Cristiana Borghert Vial; CAVALHEIRO, Maria Virgínia Silva; SANTOS, Ricardo Ribeiro; TOMASSINI, Teresinha. *Biodiversidade: perspectivas e oportunidades*. BDT - Base de Dados Tropical. Campinas: BDT Publicações, 1995, cap. 10. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

GARROS, Inaldo de Castro; CAMPOS, Antonio Carlos L.; TÂMBARA, Elizabeth Milla; TENÓRIO, Sérgio Bernardo; TORRES, Orlando Jorge Martins; AGULHAM, Miguel Ângelo; ARAÚJO, Allan Cezar Faria; SANTIS-ISOLAN, Paola Maria Brolin; OLIVEIRA, Rohnelt Machado; ARRUDA, Elaine Cristina de Moraes. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21 (Supl. 3), p. 55-65, 2006.

GOMES, Cálide Soares; CAMPOS, Antonio Carlos L.; TORRES, Orlando Jorge Martins; VASCONCELOS, Paulo Roberto Leitão; MOREIRA, Ana Tereza Ramos; TENÓRIO, Sérgio Bernardo; TÂMBARA, Elizabeth Milla; SAKATA, Kenji; MORAES-JÚNIOR, Hugo; FERRER, André Luiz S. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21 (Supl. 2), p. 9-16, 2006.

GONÇALVES-FILHO, Antonio; TORRES, Orlando Jorge Martins; CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki; TÂMBARA-FILHO, Renato; ROCHA, Luiz Carlos de Almeida; THIEDE, Arnulf; LUNEDO, Sandra Maria Corrêa; BARBOSA, Raimundo Eri de Araújo; BERNHARDT, Joel Antonio; VASCONCELOS, Paulo Roberto Leitão. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21 (Supl. 2), p. 3-8, 2006.

GRENAND, Pierre; MORETTI, Christian; JACQUEMIN, Henri. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane*. Créoles, Palikur, Wayãpi. Paris: Orstom, 1987.

GULLO, Vincent P.; MCALPINE, James; LAM, Kin S.; BAKER, Dwight; PETERSEN, Frank. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 7, p. 523-31, 2006.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. Hemostasia e coagulação sangüínea. In: _____. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HOPKINS, Michael J. G.; SOUZA, Maria Anália D. Passifloraceae. In: RIBEIRO, José Eduardo L. da S.; HOPKINS, Michael J. G.; VICENTINI, Alberto; SOTHERS, Cynthia A.; COSTA, Maria Auxiliadora da S.; BRITO, Joneide M.; SOUZA, Maria Anália D.; MARTINS, Lúcia Helena P.; LOHMANN, Lúcia G.; ASSUNÇÃO, Paulo Apóstolo C. L.; PEREIRA, Everaldo da C.; SILVA, Cosmo Fernandes; MESQUITA, Mariana R.; PROCÓPIO, Lílian C. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA, 1999.

IASP - INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. *Pain terminology*. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org>>. Acesso em: 20 abr. 2008.

ICHIMURA, Toshiaki; YAMANAKA, Akiko; ICHIBA, Toshio; TOYOKAWA, Tetsuya; KAMADA, Yasuhiro; TAMAMURA, Takako; MARUYAMA, Susumu. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 3, p. 718-21, 2006.

INPI - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. *Relação: frutas da Amazônia*. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/frutas_amazonia/frutas.htm>. Acesso em: 09 mai. 2006.

IPGRI; CIRAD - INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE; CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT. *Passiflora nitida (H.B.K.) (Passifloraceae)*. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

JUNQUEIRA, Keize Pereira; FALEIRO, Fábio Gelape; RAMOS, José Darlan; BELLON, Graciele; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; BRAGA, Marcelo Fideles. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 571-5, dez. 2007.

KIM, Hyun Pyo; SON, Kun Ho; CHANG, Hyeun Wook; KANG, Sam Sik. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 96, n. 3, p. 229-45, 2004.

KIM, Moo-Sung; LEE, Kyung-Ae. Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, n. 3, p. 342-5, 2006.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson (eds). Inflamação aguda e crônica. In: _____. *Robbins & Cotran, Patologia - bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUSTER, Ricardo Machado; ROCHA, Leandro Machado. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

LANS, Cheryl A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 2, p. 45, 2006.

LAPA, Antonio José; SOUCCAR, Caden; LIMA-LANDMAN, Maria Teresa R.; CASTRO, Maria Salete de A.; LIMA, Thereza Cristina M. *Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais*. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2005.

MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; VEIGA-JÚNIOR, Valdir F.; GRYNBERG, Noema F.; ECHEVARRIA, Aurea. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MALONE, M.H. Pharmacological approaches to natural products, screening and evaluation. In: WAGNER, H.; WOLFF, P. *New natural products and plants drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin: Springer-Verlag, 1977.

MALUF, E.; BARROS, H.M.T.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BENTI, R.; LEITE, J.R. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*, v. 5, n. 6, p. 262-6, 1991.

MATOS, F.J. Abreu. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 4. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1997.

McLAUGHLIN, Jerry L.; ROGERS, Lingling L.; ANDERSON, Jon E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, v. 32, p. 513-24, 1998.

MEKHFI, Hassane; EL HAOUARI, Mohammed; LEGSSYER, Abdelkhaleq; BNOUHAM, Mohammed; AZIZ, Mohammed; ATMANI, Fouad; REMMAL, Adnane; ZIYYAT, Abderrahim. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 2-3, p. 317-22, 2004.

METZE, Konradin. Distúrbios da circulação. In: BRASILEIRO-FILHO, Geraldo. *Bogliolo Patologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006.

MEYER, R.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 45, n. 1, p. 31-4, 1982.

MOBOT - Missouri Botanical Garden. *Passifloraceae Juss. ex Roussel*. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000124>>. Acesso em: 08 ago. 2008.

MONTANHER, Ana Beatriz; ZUCOLOTO, Silvana Maria; SCHENKEL, Eloir Paulo; FRÖDE, Tânia Silvia. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 2, p. 281-8, 2007.

MORAES, Michel C.; VIEIRA, Maria Lúcia C.; NOVAES, Quelmo S.; REZENDE, Jorge A.M. Susceptibilidade de *Passiflora nitida* ao *Passion fruit woodiness virus*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, n. 1, p. 108, jan./fev. 2002.

MUNIAPPAN, M.; SUNDARARAJ, T. Antiinflammatory and antiulcer activities of *Bambusa arundinacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 88, n. 2-3, p. 161-7, 2003.

NASSIRI-ASL, Marjan; SHARIATI-RAD, Schwann; ZAMANSOLTANI, Farzaneh. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 7, n. 26, 2007.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

OGA, Seizi. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996.

OGA, Seizi; FREITAS, Paulo Chanel; SILVA, Antonio C. Gomes; HANADA, Seico. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, v. 50, n. 4, p. 303-6, 1984.

OSONIYI, Omolaja; ONAJOBI, Funmi. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, n. 1, p. 101-5, 2003.

PEREIRA, Fausto Edmundo Lima; BOGLIOLO, Luigi. Inflamações. In: BRASILEIRO-FILHO, Geraldo. *Bogliolo Patologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006.

PROVENSI, Gustavo. *Investigação da atividade ansiolítica de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae)*. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, v. 111, n. 4, p. 409-19, 1957.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RATES, Stela Maria Kuze. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-13, 2001.

RATES, Stela Maria Kuze; BRIDI, Raquel. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

RUDNICKI, Martina; OLIVEIRA, Marcos Roberto; PEREIRA, Tiago da Veiga; REGINATTO, Flávio Henrique; DAL-PIZZOL, Felipe; MOREIRA, José Cláudio Fonseca. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 719-24, 2007.

SANTOS, K.C.; SANTOS, C.A.M.; OLIVEIRA, R.M.W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 3, p. 306-9, 2005.

SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; ATHAYDE, Margareth Linde. Saponinas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007a.

SCHENKEL, Eloir Paulo; ZANNIN, Marlene; MENTZ, Lilian Auler; BORDIGNON, Sérgio Augusto de Loreto; IRGANG, Bruno. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007b.

SILVA, Bárbara Tereza Fonseca; FREIRE, Sônia Maria de Farias. Estudos farmacológicos do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) em ratos e camundongos. *Revista de Ciências da Saúde (UFMA)*, v. 2, n. 2, p. 21-4, 2000.

SILVA, Bárbara Tereza Fonseca; NUNES, Sandra Fernanda Loureiro de Castro; FREIRE, Sônia Maria de Farias. Efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético do extrato etanólico de folhas de *Passiflora edulis* var. flavicarpa (maracujá amarelo). *Cadernos de Pesquisa (UFMA)*, v. 12, n. 1/2, p. 28-37, jan./dez. 2001.

SILVA, José Ribamar Sousa; CAMPOS, Antonio Carlos Ligoeki; FERREIRA, Lydia Masako; ARANHA-JÚNIOR, Ayrton Alves; THIEDE, Arnulf; ZAGO-FILHO, Luiz Alberto; BERTOLI, Lyrio César; FERREIRA, Marcelo; TRUBIAN, Paula Suzin; FREITAS, Alexandre Coutinho Teixeira. Efeito do extrato da *Passiflora edulis* na cicatrização de gastrorrafias em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21 (Supl. 2), p. 52-60, 2006.

SILVA, Karina Luize; CECHINEL-FILHO, Valdir. Plantas do gênero *Bauhinia* composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 449-54, 2002.

SILVA, Rosimar R.; OLIVEIRA, Tânia T.; NAGEM, Tanus J.; LEÃO, Maria A. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina*, v. 35, n. 2, p. 127-33, abr./jun. 2002.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. Espectrometria no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007a.

_____. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007b.

SOULIMANI, Rachid; YOUNOS, Chafique; JARMOUNI, Salah; BOUSTA, Dalila; MISSLIN, René; MORTIER, François. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 11-20, 1997.

SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p.51-6, 2007.

TERRA, Paulo. **Coagulação: interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TOGNOLINI, M.; BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; CHIAVARINI, M.; IMPICCIATORE, M. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**, v. 78, n. 13, p. 1419-32, 2006.

TOLEDO, Ana Cristina Oltramari; HIRATA, Lilian Lúcio; BUFFON, Marilene da Cruz M.; MIGUEL, Marilis Dallarmi; MIGUEL, Obdulio Gomes. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta-Universidade de São Francisco**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, n. 2, p. 112-9, 2007.

VILLALBA, Milcíades A.; CARMO, Maria I.; LEITE, Magda N.; SOUSA, Orlando V. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 236-41, abr./jun. 2007.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-7, 1962.

ZUANAZZI, José Angelo Silveira; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonóides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMAN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.

ZWEIG, Gunter; SHERMA, Joseph (eds). **CRC handbook of Chromatography: general data and principles**. Boca Raton: Editora CRF Press, Inc., 1987. 2 V.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha de Avaliação de Atividade Exploratória.

FICHA DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

Data do experimento:		Amostra:		Concentração:		Dose:	
Animal testado:		Veículo:		Obs.:			
Sexo:		Via de adm.:		Cálculos:			
Peso (g)		Volume (mL)					
Animal I							
Animal II							
Animal III							
Animal IV							
Animal V							
Controle							
Horário (T inicial - T final):							

AÇÃO	PARÂMETROS	CONTROLE	TEMPO DE INJEÇÃO																			
			MINUTOS						HORAS					DIAS								
			0	5	10	15	30	60	4	8	24	48	72				15					
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	ESTIMULANTES	Motilidade ()																				
		Frequência cardíaca ()																				
		Frequência respiratória ()																				
		Piloereção																				
		Exoftalmia ()																				
		Movimentos extereotipados																				
		Lamber patas																				
		Coçar focinho																				
		Morder cauda																				
		Convulsão clônica																				
		Convulsão tônica																				
		Tremores finos																				
		Tremores grosseiros																				
		Sialorréia																				
		Midríase ()																				
		Ereção da cauda																				
		Tremor da cauda																				
		Diâmetro pupilar ()																				
		SISTEMA NERVOSO CENTRAL	DEPRESSORES	Motilidade ()																		
				Frequência cardíaca ()																		
Frequência respiratória ()																						
Catatonía																						
Prose palpebral																						
Analgesia																						
Anestesia																						
Perda de reflexo corneano																						
Ataxia																						
Dispneia																						
Alienação ao ambiente																						
Tônus da costa																						
Perda de apreensão da pata																						
Exoftalmia ()																						
Midríase ()																						
Paralisia do trem posterior																						
Sedação																						
Diâmetro pupilar ()																						
OUTROS EFEITOS	ORE			Palidez																		
				LHA	Cianose																	
		Hiperemia																				
	MIC	Aumentada																				
		ÇÃO	Diminuída																			
			Coloração																			
	Diarréia																					
	Contorções																					
	Lamber a barriga																					
	Reação de fuga do ambiente																					
	Lamber o dorso																					
	Passividade																					
	Agressividade																					
	Grunidos																					
	Reclusão																					

Coração:	Arritmico		Sístole		Diástole	
Intestino:	Motilidade		S/ motilidade		Hiperemia	
Cor:	Fígado		Baço		Pulmões	Rim
Sangue:	Pré-coagulado		Coagulado		Não coagulado	
Vesícula biliar:	Estendida		Normal		Cheia	Cor