



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DAYSE KARINE RODRIGUES HOLANDA

ESTUDO QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E EFEITO NEUROPROTETOR DO
MARACUJÁ ALHO (*Passiflora tenuifila* Killip)

FORTALEZA

2019

DAYSE KARINE RODRIGUES HOLANDA

ESTUDO QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E EFEITO NEUROPROTETOR DO MARACUJÁ
ALHO (*Passiflora tenuifila* Killip)

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa

Coorientador: Dr. Nédio Jair Wurlitzer

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- H669e Holanda, Dayse Karine Rodrigues.
Estudo químico, toxicológico e efeito neuroprotetor do maracujá alho (*Passiflora tenuiflora* Killip) /
Dayse Karine Rodrigues Holanda. – 2019.
113 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa.
Coorientação: Prof. Dr. Nédio Jair Wurlitzer.
1. Componentes funcionais. 2. Antioxidante. 3. Ansiolítico. 4. Toxicidade. 5. Doença de Parkinson. I.
Título.

CDD 664

DAYSE KARINE RODRIGUES HOLANDA

ESTUDO QUÍMICO, TOXICOLÓGICO E EFEITO NEUROPROTETOR DO MARACUJÁ
ALHO (*Passiflora tenuifila* Killip)

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal.

Aprovada em: 25/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Nédio Jair Wurlitzer (Coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria Tropical/CE

Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria Tropical/CE

Profª. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profª. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Denise Josino Soares
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar e iluminar meu caminho, por me dar saúde, força e tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e pelo apoio à minha participação no doutorado.

À todos os professores do PPGCTA, por contribuir com a minha formação e pelos ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos no curso de doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Isabella Montenegro Brasil (*in memoriam*), minha orientadora, que infelizmente não pode estar presente até a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos pela orientação nos dois primeiros anos de doutorado, e por todo apoio, confiança, colaboração e dedicação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Machado de Sousa, meu orientador, agradeço a confiança que depositou em mim e por ter aceito me orientar mesmo com o projeto já em andamento, além do apoio, disponibilidade e contribuição.

Ao meu coorientador, Dr. Nédio Jair Wurlitzer, pelo incentivo e ensinamentos que foram fundamentais no decorrer desses últimos 4 anos, por estar sempre disponível e disposto a ajudar, pela dedicação, acolhimento, boa vontade, colaboração na condução deste trabalho. Gratidão pelo profissionalismo e pela orientação durante toda a minha caminhada no mestrado e no doutorado.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção e por todas as valiosas considerações e sugestões para a melhoria deste trabalho.

Ao Paulo, secretário do PPGCTA, por toda a atenção prestada e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos da UFC, Bruno, Jorgiane, Mayla, Ana Cristina, Jéssica, Larissa, Denise, Leilane, Alessandra, pela amizade, torcida e por todos os momentos de descontração.

À Profa. Dra. Geanne Matos e ao Francisco Arnaldo do Laboratório de Neurociência e Comportamento da UFC, pela atenção e por toda a ajuda nas análises.

À Profa. Dra. Kalyne Leal e a doutoranda Talita do Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos da UFC, pela atenção e colaboração nos experimentos com neutrófilos.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a realização da presente pesquisa.

Aos amigos e companheiros de laboratório na Embrapa, John, Mayara, Larissa, Bruno, Carol L., Carol G., Lidiane, Claudia, Monique e Gabriel, pelo convívio diário, pela grande ajuda e torcida na condução dos experimentos, além da amizade contruída e de todos os momentos felizes de descontração. Em especial a Mayara, pela dedicação, presteza, por estar sempre disposta a ajudar e por toda a colaboração nas análises.

Aos analistas e técnicos da Embrapa Agroindústria Tropical, Claudia, Arthur, Ídila, Márcia, Lorena e Paulo, pelos ensinamentos e por todo o apoio nas análises.

À Universidade de Fortaleza (UNIFOR) pela infraestrutura disponibilizada para realização dos testes experimentais *in vivo*. Em especial, ao Prof. Dr. Renato Moreira e as Profas. Dras. Adriana Rolim e Ana Cristina Moreira, por toda a colaboração neste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da UNIFOR, Robson, Tânia e Reuria pela atenção e presteza, e aos bolsistas, José de Maria, Talita, Sacha, Andressa, Ernani, João Ronielly, Francisco e Nydy, por todos os ensinamentos e apoio nos experimentos.

Aos meus pais, Antonio e Margarida, pelo amor incondicional, carinho, motivação, por serem meu porto seguro e por sempre me incentivarem e torcerem pela minha vitória. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Katiane e Diego, pelo amor, apoio, incentivo, torcida, companheirismo e por estarem sempre presentes na minha vida. Obrigada! Amo vocês!

Ao Bruno, meu esposo e companheiro de todas as horas, por todo o amor, carinho, incentivo, torcida, conselhos, por fazer meus dias mais felizes mesmo quando tudo dava errado, por me apoiar em todos os momentos com a maior paciência e preocupação e por me presentear com a Laís, que ainda nem chegou ao mundo, mas já deu um sentido muito especial as nossas vidas e é a nossa maior motivação. Amo você e a baby Laís muito!

À Cacau, pelo carinho, alegria proporcionada e por me fazer companhia nos longos momentos de escritas da tese.

E, por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, a minha gratidão!

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la.” (Augusto Cury)

RESUMO

Diversas espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas por suas propriedades sedativas e calmantes. *Passiflora tenuifila* Killip é uma espécie de maracujá não comercial, conhecida por maracujá alho e está entre as menos conhecidas, existindo poucos estudos científicos na literatura relatando suas propriedades funcionais. Este trabalho teve por objetivo caracterizar os componentes químicos presentes nos frutos de maracujá alho e avaliar a toxicidade e os efeitos funcionais no Sistema Nervoso Central (SNC) em modelos animais. Os frutos foram triturados inteiros e liofilizados. Para caracterização foram realizadas análises físicos-químicas e fitoquímicas. A toxicidade foi avaliada em modelos *in vitro* e *in vivo*. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* com neutrófilos humanos. A avaliação do efeito ansiolítico, antidepressivo, sedativo e anticonvulsivante foi realizada em modelo comportamental utilizando camundongos *Swiss* e a avaliação do efeito antiparkinsoniano foi realizada com ratos *Wistar*, utilizando rotenona como agente indutor dos sintomas de *Parkinson*. O maracujá alho apresentou teor umidade de 4,99%, 6,29% de cinzas, 8,77% de proteínas, 10,93% de lipídios e de 69,19% de carboidratos, destes 48,40% correspondem ao conteúdo de fibra alimentar total. Em relação ao conteúdo de polifenóis totais e atividade antioxidante total apresentou 1151,34 mg EAG/100 g e 109,71 μ M Trolox/g, respectivamente. Na avaliação da composição química por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram identificados açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos e por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides. Não apresentou toxicidade *in vitro* e os testes *in vivo* evidenciaram que as concentrações de maracujá alho testadas não causaram nenhum sinal de toxicidade. Não foi observada atividade anti-inflamatória em neutrófilos humanos nas doses utilizadas. Na avaliação de efeito funcional, os animais tratados com maracujá alho (200 e 400 mg/kg) apresentaram uma diminuição na atividade locomotora no teste do campo aberto e sem alterações na coordenação motora no teste do rota rod, indicando uma ação sedativa sem relaxamento muscular. Além disso, houve aumento no comportamento de *head dips* no teste da placa perfurada, indicando uma atividade ansiolítica. O teste do nado forçado foi realizado para avaliar a atividade do tipo antidepressiva, mas não foi observado efeito significativo nas doses testadas. O maracujá alho potencializou o sono induzido por éter etílico, mostrando uma atividade hipnótico-sedativa. No teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol, observou-se que o maracujá alho (400 mg/kg) exerceu um efeito protetor, diminuindo a severidade das convulsões e não causando a morte dos animais. Na avaliação do efeito anti-parkinsoniano, os testes comportamentais indicaram que o consumo de maracujá alho causou uma melhoria e

possível efeito de recuperação dos danos induzidos pela rotenona no SNC, e além disso, provocou um aumento no nível de dopamina no cérebro dos animais na dose de 400 mg/kg. Pode-se concluir que o maracujá alho não apresentou toxicidade, sendo seguro para o consumo humano, e apresentou efeito funcional promissor como agente ansiolítico, hipnótico-sedativo, anticonvulsivante e antiparkinsoniano, possivelmente relacionado com os compostos fenólicos presentes.

Palavras-chave: Componentes funcionais. Antioxidante. Ansiolítico. Toxicidade. Doença de *Parkinson*.

ABSTRACT

Several species of the genus *Passiflora* are its sedative and soothing properties. *Passiflora tenuifila* is a type of non-commercial passion fruit known as garlic passion fruit and is among the least known, with few scientific studies in the literature with their different properties. The aim was to characterize the ingredients present in passion fruit and to evaluate the toxicity and effects on the Central Nervous System (CNS) in the animal models. The fruits were ground whole and lyophilized. After, were characterized in the physical-chemical and phytochemical analytics. Toxicity was evaluated in *in vitro* and *in vivo* models. Anti-inflammatory activity was evaluated *in vitro* with human neutrophils. Anxiolytic, antidepressive, sedative and anticonvulsant effects were evaluated in a behavioral model using *Swiss* mice and the evaluation of the antiparkinsonian effect was performed with *Wistar* rats using rotenone as an inducing agent for Parkinson's symptoms. Garlic passion fruit presented a moisture content of 4.99%, 6.29% of ash, 8.77% of proteins, 10.93% of lipids and 69.19% of carbohydrates, of these 48.40% correspond to the content of total dietary fiber. Regarding the total polyphenol content and total antioxidant activity, 1151.34 mg EAG.100 g⁻¹ and 109.71 μM Trolox.g⁻¹, respectively. In the chemical composition by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were identified sugars, organic acids and amino acids and by Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC), phenolic compounds, mainly phenolic acids and flavonoids. There was no *in vitro* toxicity and *in vivo* tests showed that the administrations of garlic passion fruit used did not cause any signs of toxicity in relation to the evaluated parameters. Anti-inflammatory activity was no observed in human neutrophils at the doses used. In the functional effect, the animals treated with garlic passion fruit (200 and 400 mg.kg⁻¹) showed a decrease in the locomotor activity in the open field test and without alterations in the motor coordination in the test of the routed rod, indicating a sedative activity without muscle relaxation. In addition, they also showed an increase in the behavior of head dips in the hole board test, indicating an anxiolytic activity. The forced swimming test was performed to assess antidepressant activity, but no significant effect was observed at the doses used. Garlic passion fruit (200 and 400 mg.kg⁻¹) potentiated sleep induced by ethyl ether, showing a hypnotic-sedative activity. In the seizure test induced by pentylenetetrazol, it was observed that the garlic passion fruit (400 mg.kg⁻¹) exerted a protective effect, reducing the severity of the seizures and not causing the death of the animals. In the anti-parkinsonian effect, behavioral tests indicated that consumption of garlic passion fruit caused an improvement and possible recovery effect of rotenone-induced damage in the CNS, and in addition, caused an increase in the level of dopamine in the brains

of animals in the dose of 400 mg.kg⁻¹. It can be concluded that garlic passion fruit presented no toxicity, being safe for human consumption, and presented promising functional effect as anxiolytic agent, hypnotic-sedative, anticonvulsive and antiparkinsonian, possibly related to the phenolic compounds present.

Keywords: Functional compounds. Antioxidant. Anxiolytic. Toxicity. *Parkinson's* disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | – Frutos de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip)..... | 23 |
| Figura 2 | – Aparência dos frutos de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) em 7 estádios de maturação..... | 24 |
| Figura 3 | – Maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) liofilizado..... | 30 |
| Figura 4 | – Ração elaborada com maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip)..... | 39 |
| Figura 5 | – Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos..... | 44 |
| Figura 6 | – Espectro de RMN ¹ H dos frutos de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) liofilizado..... | 50 |
| Figura 7 | – Cromatografia e espectrometria de massa dos frutos liofilizados de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS ^E no modo negativo..... | 52 |
| Figura 8 | – Gráficos de sobrevivência das larvas de <i>Artemia salina</i> após 24 h de exposição a solução salina contendo diferentes concentrações do maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e extrato dialisado)..... | 61 |
| Figura 9 | – Efeito das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de fibroblastos (linhagem CCD 1059 SK) determinado pelo teste do <i>Alamar Blue</i> | 62 |
| Figura 10 | – Efeito das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de neutrófilos humanos determinado pelo teste do MTT..... | 64 |
| Figura 11 | – Avaliação da citotoxicidade das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) em neutrófilos humanos através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH)..... | 65 |
| Figura 12 | – Peso corpóreo e consumo de ração dos ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho durante 90 dias de tratamento..... | 67 |
| Figura 13 | – Avaliação do efeito das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado) sobre a desgranulação de neutrófilos humanos induzida por PMA determinada pela liberação da MPO..... | 69 |

| | | | |
|-----------|---|--|----|
| Figura 14 | – | Comportamento dos camundongos no teste do campo aberto (A – <i>crossing</i> , B – <i>grooming</i> e C – <i>rearing</i>) após tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 72 |
| Figura 15 | – | Comportamento dos camundongos no teste do rota rod após tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 73 |
| Figura 16 | – | Comportamento dos camundongos no teste do labirinto em cruz elevado (A – frequência de entrada, B – tempo de permanência nos braços abertos e fechados) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 75 |
| Figura 17 | – | Comportamento dos camundongos no teste da placa perfurada após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 76 |
| Figura 18 | – | Comportamento dos camundongos no teste do nado forçado após o tratamento com maracujá alho, água e fluoxetina..... | 77 |
| Figura 19 | – | Comportamento dos camundongos no teste do tempo de sono induzido por éter etílico (A – latência do sono, B – tempo de duração do sono) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 79 |
| Figura 20 | – | Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento maracujá alho, água e diazepam..... | 81 |
| Figura 21 | – | Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por cafeína (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 83 |
| Figura 22 | – | Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por picrotoxina (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam..... | 84 |
| Figura 23 | – | Resultados dos testes comportamentais (A - teste da corda para força de preensão, B - campo aberto, C - nado forçado) antes e depois de 20 dias de administração de rotenona..... | 86 |
| Figura 24 | – | Resultados do teste da corda para força de preensão após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona..... | 87 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 25 | – Resultados do teste do campo aberto após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona..... | 88 |
| Figura 26 | – Resultados do teste do nado forçado após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona..... | 90 |
| Figura 27 | – Níveis de dopamina (DA) no cérebro (corpo estriado) de ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA..... | 91 |
| Figura 28 | – Níveis de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) no cérebro (corpo estriado) de ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA..... | 92 |
| Figura 29 | – Determinação de nitrito no cérebro (corpo estriado) de ratos <i>Wistar</i> induzidos ao <i>Parkinson</i> por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|-----------|---|---|----|
| Tabela 1 | – | Propriedades funcionais e terapêuticas de espécies de <i>Passifloras</i> relatadas nos últimos 5 anos em estudos com modelos animais..... | 28 |
| Tabela 2 | – | Caracterização físico-química e composição centesimal dos frutos de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) liofilizados..... | 47 |
| Tabela 3 | – | Teor de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total dos frutos de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) liofilizados..... | 48 |
| Tabela 4 | – | Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (<i>Passiflora tenuifila</i> Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS ^E no modo negativo..... | 53 |
| Tabela 5 | – | Percentual de células viáveis das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) obtido pelo teste do <i>Alamar Blue</i> | 63 |
| Tabela 6 | – | Percentual de células viáveis das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) obtido pelo teste do MTT..... | 63 |
| Tabela 7 | – | Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) frente as diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado)..... | 65 |
| Tabela 8 | – | Peso corpóreo dos ratos <i>Wistar</i> antes (dia 0) e após 7 e 14 dias da administração oral de 300, 1000 e 2000 mg/kg de maracujá alho..... | 66 |
| Tabela 9 | – | Peso corpóreo médio dos ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho durante 90 dias de tratamento..... | 67 |
| Tabela 10 | – | Peso dos órgãos dos ratos <i>Wistar</i> (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho após 90 dias da tratamento..... | 68 |
| Tabela 11 | – | Percentual de liberação de MPO frente as diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado)..... | 70 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| 3.1 | Doenças relacionadas ao Sistema Nervoso Central..... | 20 |
| 3.2 | Maracujá..... | 22 |
| 3.2.1 | <i>Passiflora tenuifila Killip.....</i> | 23 |
| 3.3 | Componentes funcionais presentes no maracujá..... | 26 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 | Processamento dos frutos de maracujá alho..... | 30 |
| 4.2 | Caracterização química dos frutos de maracujá alho..... | 31 |
| 4.2.1 | <i>Análise físico-química e composição centesimal.....</i> | 31 |
| 4.2.2 | <i>Determinação de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total.....</i> | 32 |
| 4.2.3 | <i>Avaliação da composição química por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i> | 33 |
| 4.2.4 | <i>Avaliação da composição química por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....</i> | 33 |
| 4.3 | Avaliação da toxicidade dos frutos de maracujá alho..... | 34 |
| 4.3.1 | <i>Toxicidade contra Artemia salina.....</i> | 34 |
| 4.3.2 | <i>Citotoxicidade em fibroblastos.....</i> | 35 |
| 4.3.3 | <i>Citotoxicidade em neutrófilos humanos.....</i> | 36 |
| 4.3.3.1 | <i>Teste do MTT.....</i> | 37 |
| 4.3.3.2 | <i>Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).....</i> | 37 |
| 4.3.4 | <i>Toxicidade in vivo.....</i> | 38 |
| 4.4 | Avaliação da atividade anti-inflamatória do maracujá alho em neutrófilos humanos..... | 40 |
| 4.5 | Avaliação do efeito do maracujá alho sobre o comportamento de camundongos..... | 40 |
| 4.5.1 | <i>Avaliação da atividade locomotora.....</i> | 40 |
| 4.5.1.1 | <i>Teste do campo aberto.....</i> | 40 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.5.1.2 | <i>Teste do rota rod</i> | 41 |
| 4.5.2 | <i>Avaliação da atividade ansiolítica</i> | 41 |
| 4.5.2.1 | <i>Teste do labirinto em cruz elevado</i> | 41 |
| 4.5.2.2 | <i>Teste da placa perfurada</i> | 41 |
| 4.5.3 | <i>Avaliação da atividade antidepressiva</i> | 42 |
| 4.5.4 | <i>Avaliação da atividade sedativa/hipnótica</i> | 42 |
| 4.5.5 | <i>Avaliação da atividade anticonvulsivante</i> | 42 |
| 4.5.5.1 | <i>Convulsão induzida por pentilenotetrazol</i> | 42 |
| 4.5.5.2 | <i>Convulsão induzida por cafeína</i> | 43 |
| 4.5.5.3 | <i>Convulsão induzida por picrotoxina</i> | 43 |
| 4.6 | Avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos | 43 |
| 4.6.1 | <i>Teste da corda para força de preensão (String test for grip strength)</i> | 44 |
| 4.6.2 | <i>Testes do campo aberto e do nado forçado</i> | 44 |
| 4.6.3 | <i>Dosagem de monoaminas</i> | 45 |
| 4.6.4 | <i>Determinação de nítrito</i> | 45 |
| 4.7 | Aspectos éticos | 45 |
| 4.8 | Análise estatística | 46 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 5.1 | Caracterização química dos frutos de maracujá alho | 47 |
| 5.1.1 | <i>Análise físico-química e composição centesimal</i> | 47 |
| 5.1.2 | <i>Determinação de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total</i> | 48 |
| 5.1.3 | <i>Avaliação da composição química por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> | 49 |
| 5.1.4 | <i>Avaliação da composição química por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)</i> | 51 |
| 5.2 | Avaliação da toxicidade dos frutos de maracujá alho | 60 |
| 5.2.1 | <i>Toxicidade contra artemia salina</i> | 60 |
| 5.2.2 | <i>Citotoxicidade em fibroblastos</i> | 62 |
| 5.2.3 | <i>Citotoxicidade em neutrófilos humanos</i> | 63 |
| 5.2.4 | <i>Toxicidade aguda e subcrônica in vivo</i> | 66 |
| 5.3 | Avaliação da atividade anti-inflamatória do maracujá alho em neutrófilos humanos | 69 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 5.4 | Avaliação do efeito do maracujá alho sobre o comportamento de camundongos..... | 71 |
| 5.4.1 | <i>Avaliação da atividade locomotora.....</i> | 71 |
| 5.4.1.1 | <i>Teste do campo aberto.....</i> | 71 |
| 5.4.1.2 | <i>Teste do rota rod.....</i> | 73 |
| 5.4.2 | <i>Avaliação da atividade ansiolítica.....</i> | 74 |
| 5.4.2.1 | <i>Teste do labirinto em cruz elevado.....</i> | 74 |
| 5.4.2.2 | <i>Teste da placa perfurada.....</i> | 75 |
| 5.4.3 | <i>Avaliação da atividade antidepressiva.....</i> | 77 |
| 5.4.3.1 | <i>Teste do nado forçado.....</i> | 77 |
| 5.4.4 | <i>Avaliação da atividade sedativa/hipnótica.....</i> | 78 |
| 5.4.4.1 | <i>Teste do tempo de sono induzido por éter etílico.....</i> | 78 |
| 5.4.5 | <i>Avaliação da atividade anticonvulsivante.....</i> | 80 |
| 5.4.5.1 | <i>Convulsão induzida por pentilenotetrazol.....</i> | 80 |
| 5.4.5.2 | <i>Convulsão induzida por cafeína.....</i> | 82 |
| 5.4.5.3 | <i>Convulsão induzida por picrotoxina.....</i> | 83 |
| 5.5 | Avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos..... | 85 |
| 5.5.1 | <i>Teste da corda para força de preensão (String test for grip strength).....</i> | 86 |
| 5.5.2 | <i>Teste do campo aberto.....</i> | 88 |
| 5.5.3 | <i>Teste do nado forçado.....</i> | 89 |
| 5.5.4 | <i>Dosagem de monoaminas.....</i> | 90 |
| 5.5.5 | <i>Determinação de nitrito.....</i> | 92 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 95 |
| | REFERÊNCIAS..... | 96 |

1 INTRODUÇÃO

Os modelos experimentais de doenças neurológicas com utilização de animais tem desempenhado um papel importante na melhoria da compreensão da patologia da doença e dos mecanismos biológicos, assim como no desenvolvimento de abordagens terapêuticas (RANGASAMY *et al.*, 2017). Dentre as doenças que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) estão os distúrbios sociais e do humor como depressão e ansiedade, as doenças neurodegenerativas como *Alzheimer* e *Parkinson*, dentre outros, afetando na maioria das vezes os idosos (DANON; REEKIE; KASSIOU, 2019).

A doença de *Parkinson* é um distúrbio neurodegenerativo progressivo, em que há perda anormal de neurônios dopaminérgicos nigrostriatais, resultando na perda de terminais nervosos, acompanhada por uma deficiência de dopamina no corpo estriado (MOORE, 2003). Os sintomas motores da doença de *Parkinson* incluem tremor de repouso, instabilidade postural, bradicinesia, rigidez e comprometimento da marcha devido à perda de células dopaminérgicas (HEGARTY *et al.*, 2017). A terapia farmacológica para pacientes com essa doença é baseada no suprimento do neurotransmissor dopamina, que reduz os sintomas clínicos, mas não protege da perda de neurônios dopaminérgicos (CONNOLLY; LANG, 2014).

Diante disso, buscam-se alternativas de produtos naturais para o tratamento dessas doenças relacionadas ao SNC. O gênero *Passiflora* é rico em espécies utilizadas para controle de problemas nervosos. A investigação do perfil de utilização de plantas medicinais pela população brasileira evidenciou que as espécies de *Passifloras* estão entre as mais utilizadas (MARLIÉRE *et al.*, 2008; RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Porém, os estudos farmacológicos concentram-se nas *Passiflora incarnata*, *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, tendo sido verificada a ação calmante e sedativa, normalmente associada à via serotoninérgica e ação antiespasmódica, com mecanismo neurofarmacológico sobre os receptores β -adrenérgicos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Diversas espécies de maracujás apresentam componentes como alcaloides, flavonoides, antocianinas e compostos fenólicos e atividade antioxidante, sendo que em revisão efetuada por Zeraik *et al.* (2010), muitos componentes são relacionados com atividades funcionais ou benéficas à saúde. Apresentam uma ação benéfica sobre o sistema nervoso, podendo atuar no controle da ansiedade, estresse e na prevenção de tremores da idade (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Dentre as *Passifloras*, a *P. tenuifila* está entre as menos conhecidas. Sua cultivar BRS Vita Fruit foi obtida por meio do melhoramento genético convencional, utilizando acessos

e populações de *P. tenuifila* Killip de diferentes origens, principalmente das regiões do Cerrado do Planalto Central, em parceria com a Rede Passitec (Rede de Pesquisa Multidisciplinar para o Desenvolvimento Tecnológico das *Passifloras*) (FALEIRO *et al.*, 2018). É uma espécie de maracujá não comercial, sendo conhecida por maracujá alho devido ao aroma característico de seus frutos. Segundo Duarte, Madalena e Costa (2013), o consumo de chá de frutos de *P. tenuifila* foi recomendado para palpitação, nervosismo e insônia. Porém existem poucos estudos científicos relatando as propriedades químicas, funcionais e nutricionais dessa espécie. Além dos efeitos benéficos, faz-se necessário também o estudo de possíveis efeitos adversos, como a toxicidade.

Nesse contexto, o projeto foi executado visando obter evidências científicas do efeito funcional de *P. tenuifila* no SNC e também caracterizar os componentes químicos possivelmente relacionados a esse efeito. Com a comprovação de efeitos funcionais, esperam-se impactos relacionados a uma terapia alternativa de menor custo para pacientes idosos com sintomas de tremor relacionados a doença de *Parkinson* e outras doenças neurológicas, como a ansiedade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise química dos frutos de maracujá alho, a segurança do seu uso e o seu efeito neuroprotetor.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente;
- Realizar a análise fitoquímica;
- Avaliar a toxicidade;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro*;
- Avaliar o potencial neuroprotetor *in vivo* dos frutos de maracujá alho.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doenças relacionadas ao Sistema Nervoso Central

Segundo Pimenta (2014), tem crescido a busca por moléculas fitoterápicas que atuem sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e que podem alterar as funções cerebrais e assim produzir mudanças transitórias de humor, comportamento e percepção. Há mais de 50 anos vêm sendo utilizados modelos de estudos em grupos de animais com resultados convincentes, estes modelos são largamente utilizados no mundo inteiro e são particularmente úteis na descoberta de fármacos para o tratamento de diversos tipos de distúrbios mentais como ansiedade e depressão (BUCCAFUSCO, 2009; PIMENTA, 2014).

A palavra ansiedade é usada para descrever um estado emocional transitório que varia de intensidade e no tempo e que se caracteriza por um sentimento de tensão ou apreensão e por um aumento na atividade do sistema nervoso, ao qual se associa à ocorrência de tremores, falta de ar, aumento dos batimentos cardíacos, sudorese, alterações gastrointestinais, tonturas, desmaios e outros sintomas (SPIELBERGER, 1972). Os transtornos de ansiedade são caracterizados por ansiedade excessiva, medo persistente e excessivo ou irracional. As pessoas que sofrem com transtornos de ansiedade sentem-se, frequentemente, irritadas e depressivas, pois não tem capacidade de lidar com as alterações fisiológicas que ocorrem com o organismo (GAZZANIGA; HEATHERTON, 2005). Os transtornos de ansiedade mais comuns são: pânico, fobia o transtorno específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo e a desordem de estresse pós-traumático. Essas desordens diferem uma da outra pela natureza do estímulo, provocando a ansiedade (CRYAN; HOLMES, 2005).

A depressão é uma desordem neuropsiquiátrica muitas vezes desencadeada por estresse (MÜLLER, 2014), possuindo o cérebro, como o órgão central do estresse e da adaptação a estressores físicos e sociais, determinando o que é ameaçador, armazenando memórias e regulando as respostas fisiológicas e comportamentais que podem ser protetivas ou prejudiciais (MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015). Está associada a mudanças hormonais e fisiológicas no organismo que podem estar envolvidas em determinadas doenças crônicas (BOING *et al.*, 2012).

A epilepsia é uma das doenças mais comuns e debilitantes no mundo, acomete cerca de 1% da população mundial (KANDEL, 2014), existindo evidências de sua associação a déficit neurológico, disfunção intelectual, psicológicas, problemas comportamentais e sociais (SHEFFER *et al.*, 2017). É definida pela capacidade de gerar crises convulsivas recorrentes e

pode ser classificada clinicamente por qualquer uma das seguintes condições: pelo menos duas convulsões não provocadas ocorrendo em um intervalo maior que 24 h entre as mesmas; uma convulsão não provocada com risco de ocorrência de pelo menos 60% nos próximos 10 anos após as duas convulsões; ou pode ser definida como síndrome epiléptica (FISHER *et al.*, 2014; KANDEL, 2014).

Existem mais de cinco tipos distintos de tremores que podem acometer em idosos, dentre eles o parkinsoniano. Os tremores parkinsonianos (Doença de *Parkinson*) compreendem uma série de manifestações motoras involuntárias onde chama atenção a trilogia de sinais caracterizada por “Tremor, Rigidez e Acinesia”. A intensidade com que esses três elementos estão presentes pode tornar os pacientes altamente incapacitados. Uma prevalência estimada entre 85 e 187 casos por 100.000 habitantes, ou 1% da população com idade superior a 55 anos faz com que o parkinsonismo seja um problema importante de Saúde Pública, sendo que no Brasil estima-se que 200 mil indivíduos sejam portadores da doença (BRASIL, 2016; MENEZES; TEIVE, 2003).

Os achados anatômicos de pacientes com a Doença de *Parkinson* mostraram alterações do tipo degenerativo na região do mesencéfalo conhecida como substância negra, região de alta concentração de neurônios dopaminérgicos. A perda desses neurônios envolve a via nigroestriatal, o que leva a uma queda nas concentrações de dopamina no estriado. O estriado ou corpo estriado é a região do encéfalo onde se concentram estruturas que participam do controle da atividade motora. As tentativas de controle da doença têm sido voltadas para o uso de levodopa (L-dopa), um precursor da dopamina, ou então de substâncias que prolonguem sua permanência no organismo. O controle do sintoma tremor é, geralmente, por meio de cirurgias ablativas com a coagulação de núcleos talâmicos, que promovem a perda de função do membro afetado (BRASIL, 2015; MENEZES; TEIVE, 2003). Apesar da melhora das questões motoras, a terapia com uso de L-dopa está associada a anormalidades graves na realização de movimentos musculares voluntários (discinesia) e funções motoras quando usada consistentemente por mais de cinco anos (JANKOVIC; STACY, 2007).

Um dos modelos utilizados para induzir processos degenerativos relacionados à Doença de *Parkinson* é com uso de neurotoxinas como a rotenona, sendo encontrados diversos trabalhos recentes na literatura (GÜNAYDIN, *et al.*, 2019; CHIARADIA *et al.*, 2019; FAROMBI *et al.*, 2019; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2018; HORST *et al.*, 2018; SHARMA; KUMAR; DESHMUKH, 2018; DARBINYAN *et al.*, 2017). A rotenona tem um efeito neurodegenerativo em neurônios dopaminérgicos, sendo manifestado por características comportamentais e patológicas do parkinsonismo (ALAM; SCHMIDT, 2002). É um pesticida

natural, derivado de raízes ou folhas de certas espécies de plantas, é uma molécula altamente lipofílica e pode atravessar facilmente a membrana mitocondrial e a barreira hematoencefálica, atua como um inibidor específico do complexo I mitocondrial, prejudicando a respiração celular, reduzindo a produção de ATP, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANDERS; GREENAMYRE, 2013; TALPADE *et al.*, 2000) e levando à destruição do DNA mitocondrial o que causa as desordens neurodegenerativas (SUE; SCHON, 2000).

Com disso, buscam-se alternativas de produtos naturais com propriedades terapêuticas para uma melhoria ou prevenção nos sintomas de doenças relacionadas ao SNC, como por exemplo com a utilização do gênero *Passiflora*, uma vez que este é rico em espécies utilizadas para controle de problemas nervosos.

3.2 Maracujá

Com base nos dados do IBGE (2017), o Brasil apresenta destaque como o maior produtor mundial de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims), produzindo cerca de 555 mil toneladas platanadas em uma área de 41 mil hectares. O estado da Bahia é o principal responsável por essa produção com aproximadamente 171 mil toneladas, seguido do Ceará com 95 mil toneladas.

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora*, sendo o maior da família *Passifloraceae*, possuindo alta diversidade genética com mais de 630 espécies de maracujazeiros (BUENO *et al.*, 2013; PREISIGKE *et al.*, 2015) que são encontradas predominantemente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, 2004), com cerca de 141 delas nativas do Brasil (BERNACCI *et al.*, 2015). A palavra maracujá é de origem tupi-guarani e significa “alimento em forma de cuia”, também conhecida como flor ou fruto da paixão (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Segundo Faleiro *et al.* (2008), entre as espécies de *Passifloras* existe grande diferença morfológica em relação às folhas, flores e frutos, observando-se grande variação de tamanho, cor, aroma e sabor dos frutos.

A *Passiflora edulis* é a principal espécie comercial de maracujá e apresenta cerca de um terço de seu peso em suco (polpa), sendo o restante é composto por flavedo (epicarpo), albedo (mesocarpo) e sementes, que são considerados resíduos industriais (OLIVEIRA, 2009). Sua polpa é empregada na elaboração de sucos e concentrados que atendem principalmente o segmento de bebidas e doces, e suas folhas são utilizadas no preparo de chás pelas propriedades calmantes (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). O maracujá é um fruto climatérico, ou seja, é capaz de completar o processo de amadurecimento fora da planta e durante seu desenvolvimento passa

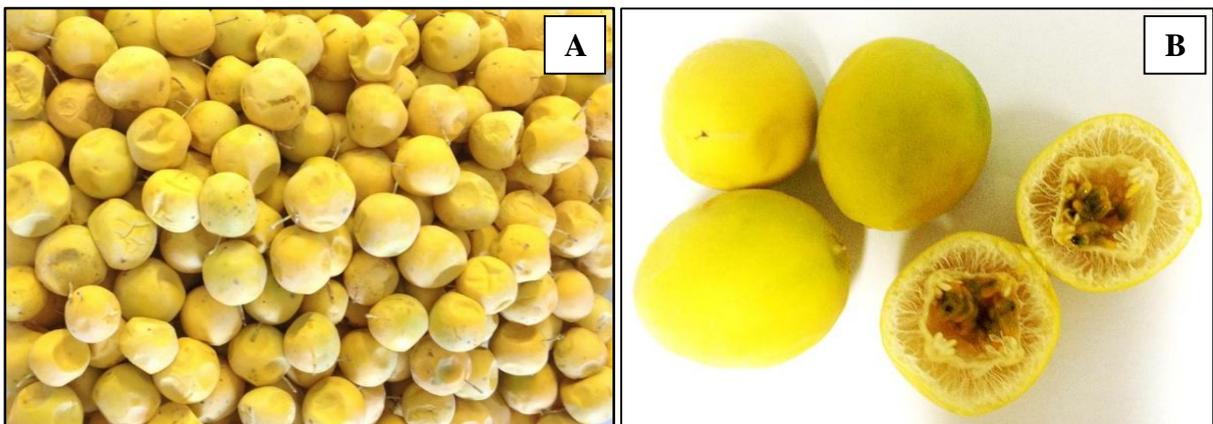
por importantes transformações fisiológicas, ocorrendo um aumento significativo na taxa respiratória e produção de etileno, que levam a alterações nas suas características físicas e físico-químicas (SILVA *et al.*, 2008; WINKLER *et al.*, 2002), dentre elas a mudança na coloração da casca é uma das mais observadas e é o critério mais importante utilizado no momento da colheita e pelo consumidor na hora da compra do fruto (LIMA *et al.*, 2010). A perda de massa e o consequente murchamento, que confere aspecto enrugado ao fruto, são um dos problemas identificados na comercialização dos frutos de maracujá, apresentando também grande susceptibilidade a podridão e a fermentação da polpa, diminuindo a sua vida de prateleira (DURIGAN, 1998; TAVARES *et al.*, 2003).

No Brasil, as espécies mais cultivadas são o maracujá amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e roxo (*P. edulis* Sims). A *P. alata* Curtis (maracujá doce) é a segunda espécie mais cultivada do gênero, sendo relatado também a cultura e o consumo de algumas espécies silvestres, como *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* (CERQUEIRA-SILVA *et al.*, 2014).

3.2.1 *Passiflora tenuifila* Killip

A *Passiflora tenuifila* Killip (FIGURA 1) está entre as espécies de maracujá menos conhecidas. Existem relatos da sua distribuição geográfica por toda América do Sul, incluindo Bolívia e Argentina (BRAGA *et al.*, 2005; DEGINANI; ESCOBAR, 2002).

Figura 1 – Frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip)



Fonte: (A) A autora (2019); (B) Holanda (2015).

A cultivar BRS Vita Fruit, obtida por melhoramento genético convencional, apresentou desempenho agrônômico no Cerrado do Planalto Central (DF), Palmas (TO), Araguari (MG), Campinas (SP), Seropédica (RJ) e na região Nordeste (CE) em parceria com a

Rede Passitec (Rede de Pesquisa Multidisciplinar para o Desenvolvimento Tecnológico das *Passifloras*) da EMBRAPA (FALEIRO *et al.*, 2018). Essa espécie, por ser silvestre, ainda não tem uso comercial no Brasil e é conhecida como maracujá alho. Segundo Faleiro *et al.* (2018) seus frutos apresentam sabor doce e característico que lembram condimentos como o alho, podendo ser empregados como ingredientes no preparo de pratos salgados ou como espessante enriquecedor em compostos antioxidantes.

A colheita dos frutos de *P. tenuifila* ocorre 3 a 5 meses após o plantio definitivo e é feita diretamente na copa da planta, baseando-se no estágio de maturação fisiológica. A produção média desses frutos na cidade de Paraipaba (CE) foi de 1.540 no período 2015 e de 4.068 em 2016, plantados em uma área de 720 m² com 120 plantas de maracujá (PEREIRA; SILVEIRA; COSTA, 2017).

Lima *et al.* (2010) mostra o desenvolvimento dos frutos de *P. tenuifila* com base em indicadores de maturidade e classifica em 7 estádios de maturação (FIGURA 2), considerando o estágio 3 como o melhor ponto para a colheita, apresentando uma coloração amarela em até 20% da casca, uma massa média de frutos de 18,45 g, um teor médio de sólidos solúveis de 26,5, acidez total titulável 0,82% e pH de 4,43. Nesse ponto de colheita, o fruto já alcançou maior desenvolvimento em termos de dimensões e é capaz de completar seu processo de amadurecimento fora da planta.

Figura 2 – Aparência dos frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) em 7 estádios de maturação



Fonte: Lima *et al.*, 2010.

A maioria dos trabalhos científicos encontrados na literatura concentra-se na avaliação da composição de *P. tenuifila*, existindo poucos estudos abordando seus aspectos

funcionais e farmacológicos. A polpa de *P. tenuifila* apresentou valor médio de pH de 5,54, sólidos solúveis de 24,58 °Brix e acidez titulável de 0,49%, contribuindo para um alto grau de doçura, com a relação SS/AT de 50,16 (SILVEIRA *et al.*, 2015). Braga *et al.* (2005) caracterizando frutos de *P. tenuifila*, obteve valores médios de massas de frutos na faixa de 11,16 g, sendo 6,84 g, 3,22 g, 1,81 g e 4,10 g para peso da polpa com semente, do suco, da semente e da casca, respectivamente. Em relação suas características físico-químicas, apresentaram conteúdo de sólidos solúveis totais de 23,60 °Brix, acidez total titulável de 2,33 mL e pH de 6,23.

Figueiredo (2018) caracterizou extratos de sementes de *P. tenuifila* como fonte de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, mostrando uma correlação positiva entre atividade antioxidante e os níveis de compostos fenólicos. Gomes *et al.* (2017) identificou a presença de flavonoides, como isoorientina, orientina e isovitexina em extratos hidroetanólicos de folhas de *P. tenuifila*. Santana (2015) analisando compostos bioativos em sementes de diferentes espécies de *Passifloras*, verificou maiores teores de polifenóis e flavonoides totais em *P. tenuifila*, correlacionando com a maior atividade antioxidante e identificou o composto piceatanol, como o marjoritário entre os polifenóis totais quantificados. Bendini *et al.* (2006) avaliando extratos de folhas, caule e cascas de diferentes espécies de *Passifloras*, dentre elas a *P. tenuifila*, verificou quantidades muito elevadas de flavonas e fenólicos totais nas folhas, mas níveis intermediários de atividade antioxidante, atribuindo ao menor teor de difenóis e galocatequinas em relação ao de fenólicos; além disso, não demonstrou atividade antimicrobiana.

Holanda (2015) desenvolveu uma formulação de sopa enlatada de vegetais e carne a base de *P. tenuifila* e caracterizou como fonte de fibras, de compostos fenólicos e de antioxidantes e Spinosa (2016) elaborou uma sopa desidratada, formulada com a mesma espécie de maracujá.

Balisteiro *et al.* (2017) verificando o efeito de sucos clarificados de frutas nativas brasileiras sobre a glicemia em indivíduos saudáveis, dentre eles a *P. tenuifila*, identificou a presença de polifenóis, como homorientina e isovitexina, e observou redução de 11% nas concentrações séricas de glicose após o consumo do suco de maracujá-alho. Vetore-Neto (2015) analisando extrato hidroalcoólico de *P. tenuifila*, detectou a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, e na avaliação da atividade antiúlcera em modelo de indução aguda não observou efeito positivo nas doses testadas (100, 200 e 400 mg/kg).

Madalena, Costa e Lima (2013) realizando uma avaliação de usos e conhecimentos de maracujás nativos do Distrito Federal como meio definição de estratégias de pesquisa e

transferência de tecnologia, verificaram uma recomendação fitoterápica no consumo de chás dos frutos, e a espécie de *P. tenuifila* foi recomendada para palpitação, nervosismo e insônia, relatando a utilização do fruto maduro picado inteiro (polpa, casca e semente) e também do fruto seco, porém este apresenta sabor extremamente amargo.

3.3 Componentes funcionais presentes no maracujá

Com a mudança progressiva nos hábitos alimentares na última década, os alimentos funcionais promoveram uma crescente demanda pelos consumidores, que buscam por dietas balanceadas, incluindo principalmente frutas e produtos à base de frutas (OLIVEIRA; AMARO; PINTADO, 2018).

A Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os alimentos funcionais como “aqueles que além de nutrir, promovem benefícios para a manutenção da saúde, ou seja, apresentam componentes nutricionais ou não nutricionais importantes para o metabolismo ou fisiologia para o crescimento, desenvolvimento, e que contribua para a manutenção de funções normais do organismo humano”, e para que um alimento seja considerado funcional é necessária a comprovação dos seus benefícios em humanos através de estudos científicos (BRASIL, 1999). Os bioativos que promovem alegações de saúde pertencem à categoria dos antioxidantes, fibras ou ácidos graxos, sendo assim, com a presença destes compostos na sua composição em quantidade suficiente para a manutenção da saúde, o alimento pode receber a alegação funcional (BRASIL, 1999).

A polpa de maracujá amarelo ou azedo tem coloração laranja ou amarelada como consequência da presença de carotenoides, precursores de vitamina A e C, cálcio, fósforo e vitaminas (AMARAL *et al.*, 2014) e atuam como antioxidantes, retardando doenças e processos de envelhecimento (NUNES, 2018). A casca do maracujá é rica em fibras insolúveis e solúveis, principalmente pectina (CORDOVA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2010) e é fonte de compostos fenólicos e atividade antioxidante (INFANTE *et al.*, 2013). Apresenta, em sua composição, substâncias flavonoides, como naringina (NACIMENTO *et al.*, 2003) e hisperidina (SANTANA *et al.*, 2011), que conferem sabor amargo a casca. Alguns autores relatam que o gosto amargo da casca do maracujá pode ser removido através da maceração (DIAS *et al.*, 2011; ISHIMOTO *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2011; SPANHOLI; OLIVEIRA, 2009). Já as sementes do maracujá são fontes de ácidos graxos essenciais, podendo

ser usadas nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (CARVALHO; STENZEL; AULER, 2015).

A maioria das substâncias presentes na casca e na polpa do maracujá, como os alcalóides, flavonoides, carotenóides, minerais, provitamina A e vitamina C, pode contribuir para efeitos benéficos da saúde, como atividade antioxidante, anti-hipertensão e níveis mais baixos de glicose e colesterol no sangue (ZERAİK *et al.*, 2010).

Em termos do efeito farmacológico e químico da maioria das espécies e variedades do gênero *Passiflora*, as informações provêm basicamente das espécies: *P. incarnata*, *P. edulis*, *P. alata* e *P. caerulea* (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; PEREIRA; VILEGAS, 2000). Estas espécies são ricas em flavonoides (vitexina, isovitexina, neohesperidina, saponarina, crisina, BZF), estigmasterol, sitosterol, lignanos (ácido caféico e ferrúlico), cianoglicosídeos, entre outros, havendo diferenças quantitativas de espécie para espécie (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005).

Nas espécies de *Passiflora*, dentre os componentes químicos que apresentam ampla distribuição no gênero, estão os flavonoides C-glicosilados, orientina, isorientina, vitexina e isovitexina (GOMES, 2013).

As categorias dos bioativos encontrados nas *Passifloras* associados às respostas neurofarmacológicas e anti-inflamatórias são as dos flavonoides, amins bioativas, ácidos fenólicos e alcaloides (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; BOMTEMPO, 2011; SANTANA, 2015; VETORE-NETO, 2015).

Verificou-se que o metabolismo dos alcaloides da categoria dos harmanos (alcaloide com um núcleo β -carbolínico) está relacionado à sintomatologia dos tremores essenciais (LOUIS *et al.*, 2010). Estes componentes foram encontrados em concentrações baixas em diferentes partes da planta e polpa de espécies de *Passiflora* e foram associados, também à propriedade antiestresse atribuídas ao gênero (VIEIRA; GENOVESI, 2011).

A atividade ansiolítica e antidepressiva de extrato de folhas de *P. alata* foi relatada por Romanini *et al.* (2006), confirmando o efeito sedativo dessa espécie. Estudos realizados com *P. edulis* mostraram que esta possui efeito depressor do SNC em roedores (BRUSCHI; CARDOSO; MILANI, 2002) e efeito ansiolítico em camundongos quando utilizada em doses mais baixas e sedativo em doses mais elevadas (DENG *et al.*, 2010). Lolli *et al.* (2007) relataram a atividade ansiolítica de extratos de folhas de *P. actinia*, sem efeito sedativo. Extratos de *P. incarnata* apresentaram atividade ansiolítica e anticonvulsivante, exercendo efeito protetor em convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos (ELSAS *et al.*, 2010).

A atividade ansiolítica de extratos de *P. incarnata* também foi relatada por Dhawan, Kumar e Sharma (2001).

Ramos *et al.* (2007) demonstraram em humanos que a farinha de maracujá reduziu os níveis de colesterol total e LDL, mas não alterou os valores do HDL. Estudos clínicos conduzidos em voluntários saudáveis com suplementação da dieta com farinha da casca de *P. edulis*, indicaram redução média da glicemia na ordem de 5%, no colesterol total de 18% e no LDL na faixa de 19%, de triglicerídeos totais em média de 15% (MEDEIROS *et al.*, 2009). Estudo semelhante com voluntários portadores de diabetes tipo II, também resultou na diminuição dos índices glicêmicos em jejum, contudo, não foram observadas variações significativas no perfil lipídico (JANEIRO *et al.*, 2008).

A ingestão de fibras contidas nas sementes de *P. edulis* por *hamsters* promoveu redução nos níveis de colesterol total e triglicerídeos, indicando propriedade benéfica pelo uso como alimento (CHAU; HUANG, 2005).

A Tabela 1 mostra os estudos encontrados nos últimos 5 anos na literatura envolvendo o uso de espécies de *Passifloras* para avaliação de efeito funcional em modelos animais.

Tabela 1 – Propriedades funcionais e terapêuticas de espécies de *Passifloras* relatadas nos últimos 5 anos em estudos com modelos animais (continua)

| Espécie | Material | Dose | Efeito | Referência |
|----------------------|-----------------|----------------------|--|------------------------------|
| <i>P. alata</i> | Folhas e caule | 100, 200 e 400 mg/kg | Gastroprotetor | Wasick <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>P. caerulea</i> | Folhas | 125 e 250 mg/kg | Anti-inflamatório, antidiarréico, espasmolítico e antioxidante | Anzoise <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>P. cincinnata</i> | Folhas e caules | 100, 200 e 400 mg/kg | Antinociceptivos centrais e periféricos e anti-inflamatório | Lavor <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>P. edulis</i> | Frutos | 20 g/kg | Neuroprotetor | Tal <i>et al.</i> , 2016 |
| | Casca | 0,1, 1 e 10 mg/kg | Gastroprotetor | Abboud <i>et al.</i> , 2019 |

Tabela 1 – Propriedades funcionais e terapêuticas de espécies de *Passifloras* relatadas nos últimos 5 anos em estudos com modelos animais (continuação)

| | | | | |
|--------------------------|-----------------|------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>P. edulis</i> | Casca | 100 mg/kg | Sedativo e redução de peso corporal | Figueiredo <i>et al.</i> , 2016 |
| | Casca | 50% de substituição na dieta | Melhora a homeostase da glicose e aumenta a saciedade, prevenindo o aumento da gordura corporal | Lima <i>et al.</i> , 2016 |
| | Casca | 40 mg/animal | Anti-inflamatório intestinal | Cazarin <i>et al.</i> , 2016 |
| | Folhas | 25, 50, 100 e 300 mg/kg | Antidepressivo | Ayres <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>P. foetida</i> | - | 50 e 100 mg/kg | Anti-osteopóricico | Ahmad <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>P. incarnata</i> | Folhas e frutos | 10 e 50 mg/kg | Melhora na função de neurogênese e memória | Kim <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>P. leschenaultii</i> | Folhas | 200 e 400 mg/kg | Hepatoprotetor | Shanmugam <i>et al.</i> , 2017 |
| | Folhas | 200 e 400 mg/kg | Antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e antipirética | Shanmugam <i>et al.</i> , 2016b |
| <i>P. quadrangularis</i> | Folhas | 30, 60, 100, 300 e 600 mg/kg | Sedativo | Gazola <i>et al.</i> , 2018 |
| | Casca | 100, 300 e 600 mg/kg | Sedativo | Gazola <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>P. subpeltata</i> | Folhas | 200 e 400 mg/kg | Hepatoprotetor | Shanmugam <i>et al.</i> , 2016a |

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Processamento dos frutos de maracujá alho

Os frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) foram provenientes do campo experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado na cidade de Paraipaba-CE, e, logo após a colheita, foram transportados ao Laboratório de Processos Agroindustriais, localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE. Foram selecionados de acordo com os critérios de aparência e tamanho (estádio de maturação 4 e 5; FIGURA 2) conforme classificação de Lima *et al.* (2010) e ausência de injúrias. Em seguida, foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio (100 ppm) por 15 min e, após esse período, foi feito um enxágue em água. Logo após, os frutos foram triturados em liquidificador, na proporção de 1 kg de fruto (casca, polpa e semente) para 1,5 L de água, e a massa base obtida foi acondicionada em sacos de polietileno e congelada em câmara fria a -18°C. O processo de liofilização foi realizado em equipamento Liobras modelo Liotop LP 50, mantendo-se vácuo (pressão inferior a 3000 µmHg), de forma a que a relação pressão e temperatura fossem menores que o ponto crítico da água (0,01°C e 0,06 kPa ou 4600 µmHg), e em controle de temperatura crescente, através de resistências de aquecimento nas prateleiras, iniciando a -20°C, e atingindo 30°C em 30 h. A amostra de maracujá alho liofilizado foi embalada em pacotes plásticos (dupla camada nylon – polietileno; FIGURA 3) à vácuo e armazenado a temperatura ambiente (27°C) até o momento das análises.

Figura 3 – Maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) liofilizado



Fonte: A autora (2019).

4.2 Caracterização química dos frutos de maracujá alho

4.2.1 Análise físico-química e composição centesimal

Para a caracterização físico-química e composição centesimal do maracujá alho liofilizado, foram realizadas as seguintes análises:

- a) pH: foi determinado utilizando potenciômetro calibrado a cada utilização com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0, de acordo com AOAC (2005), e a amostra foi diluída em água destilada (1:10);
- b) Acidez total titulável: foi determinada por titulação de 1 g da amostra diluída em 50 mL de água destilada, com solução de NaOH 0,1 N padronizada, usando como indicador solução de fenolftaleína 1% diluída em etanol, conforme descrito pelo IAL (2008) e os resultados foram expressos g de ácido cítrico/100 g de amostra;
- c) Umidade: foi determinado em estufa a 121°C utilizando 3 g da amostra, pesada em cápsula de porcelana e submetida a aquecimento até obtenção de peso constante, conforme descrito pelo IAL (2008) e os resultados foram expressos em g/100 g de amostra;
- d) Atividade de água: foi determinada por medida direta da amostra a 25°C em equipamento digital de medidor de atividade de água portátil Pawkit, após estabilização da leitura, conforme metodologia do IAL (2008);
- e) Cinzas: foram determinadas através da calcinação de 1 g da amostra por 5 h, em mufla a 550 °C e o teor final de cinzas foi dado em porcentagem pela relação massa das cinzas/massa da amostra, segundo a metodologia da AOAC (2005);
- f) Lipídios: foi determinado utilizando-se 5 g da amostra, extraídos em aparelho Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrator, conforme descrito por IAL (2008) e os resultados foram expressos em g/100 g de amostra;
- g) Proteínas: foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl descrito pela AOAC (2005), utilizando o valor de 6,25 como fator de conversão em proteína bruta e os resultados foram expressos em g/100 g de amostra;
- h) Carboidratos (fração glicídica): foram determinados conforme metodologia descrita por AOAC (2005), através da equação abaixo:

$$\%FG = 100 - (U + L + P + C) \quad (1)$$

Onde: FG é a fração glicídica (%), U é a umidade (%), L é o lipídio (%), P é a proteína (%) e C são as cinzas (%);

i) Fibra alimentar: as frações insolúveis e solúveis da fibra dietética alimentar foram determinadas de acordo com o método 991.43 da AOAC (2010), utilizando analisador automático de fibra alimentar total (TDF) da ANKON (ANKON Technology Corporation); a fibra alimentar total foi obtida pela soma das frações insolúvel e solúvel, como preconiza o mesmo método, e os resultados foram expressos em g/100 g de amostra.

4.2.2 Determinação de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total

Inicialmente, foram preparados extratos da amostra, utilizando metanol 50% e acetona 70% como soluções extratoras, seguindo método descrito por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997).

Os polifenóis extraíveis totais foram determinados seguindo método descrito por Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL de cada extrato preparado, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:3), 1,0 mL de NaCO₃ 20% e 1,0 mL de água destilada, em tubos de ensaio, sendo em seguida homogeneizados e deixados em repouso por 30 min. Depois de decorrido o tempo, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 700 nm, usando como referência curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg EAG (equivalente de ácido gálico)/100 g da amostra.

A atividade antioxidante total foi determinada pelo método da captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) conforme descrito por RE *et al.* (1999) adaptado por Rufino *et al.* (2007). Foram utilizadas três concentrações diferentes do extrato preparado. Uma alíquota de 30 µL de cada diluição dos extratos reagiram com 3 mL da solução resultante do radical ABTS^{•+} no escuro. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 min da mistura. Foi utilizada como referência uma curva padrão entre 100 a 1500 µM de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µM Trolox/g de amostra).

4.2.3 Avaliação da composição química por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 20 mg dos padrões e de maracujá alho liofilizado em 800 μL de água deuterada (D_2O). Para realizar a quantificação, o pulso de 90° foi calibrado e a sonda, devidamente sintonizada. Inicialmente a sequência de pulsos de inversão-recuperação foi utilizada para estimar o tempo de relaxação dos núcleos amostrais. O valor encontrado foi distribuído entre o d_1 (tempo de espera para relaxação dos núcleos) e o tempo de aquisição (AQ). Assim, os espectros unidimensionais de ^1H foram adquiridos com um tempo de espera entre cada aquisição de 25 s, AQ de 5,01 s, ganho de 30, 16 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32 k de número de pontos reais a 26°C . Para o processamento desses dados, os espectros foram referenciados com o padrão interno propionato de tetrametilsilil (TMSP-d4) em 0 ppm; foram utilizados 65.536 pontos, efetuando multiplicação exponencial ($lb = 0,3$ Hz) e correção manual de fase e linha de base.

Para a caracterização dos compostos foram utilizados os experimentos bidimensionais com gradiente de campo (gCOSY, gHSQC e gHMBC). Os experimentos bidimensionais de gCOSY, gHSQC e gHMBC foram realizados com largura espectral em F2 de 16 ppm para todos, em F1 de 16 ppm, 200 ppm e 240 ppm, número de promediações (ns) igual 16, 32 e 64, respectivamente. Os parâmetros a seguir foram os mesmos para as medidas de gCOSY, gHSQC, gHMBC: tempos de espera entre cada aquisição de 1 s, com 200 pontos durante a aquisição (td) em F1 e 1.442 pontos durante a aquisição em F2, no processamento foram utilizados 1.024 pontos (si) em F1 e 2.000 pontos em F2.

4.2.4 Avaliação da composição química por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) foi realizada para identificação dos compostos presentes no maracujá alho liofilizado. As análises foram realizadas usando um sistema Acquity UPLC-Q-TOF-MS^E (XevoTM, Waters[®], Milford, MA, USA) com uma interface de ionização por eletrospray (ESI). A coluna de Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) foi utilizada e mantida a 40°C .

O extrato foi preparado diluindo-se 50 mg de maracujá alho liofilizado em 4 mL de hexano P.A., seguido de homogeneização em vórtex por 1 min e logo após, foi colocado durante 20 min em banho de ultrassom. Após esse período, foi adicionado 4 mL de etanol:água (70:30), seguido de homogeneização em vórtex por 1 min e 20 min em banho de ultrassom. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, 1 mL da fase polar (etanol:água) foi coletado e filtrado (PTFE de 0,22 μ m).

O volume de injeção foi 5 μ L. Os perfis dos metabólitos nos extratos foram obtidos por um gradiente exploratório (0-15 min com 2-95% de B; 15,1-17 min com 100% de B; 17,1-19,1 min com 2% de B) com vazão de 0,4 mL/min, sendo as fases móveis: água (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico 0,1%. As condições do MS foram realizadas em modo de ionização negativo, alcance de aquisição de 110 a 1180 Da, temperatura de 120°C, temperatura e fluxo de gás dessolvatação de 330°C e 500 L/h, tensão capilar de 2,6 kV, tensão de cone 0,5 V e modo de aquisição por MS^E. Leucina-encefalina foi a substância padrão utilizada para a calibragem da massa de bloqueio. O equipamento foi controlado usando o software Masslynx 4.1 (Waters[®] Corporation).

4.3 Avaliação da toxicidade dos frutos de maracujá alho

4.3.1 Toxicidade contra *Artemia salina*

A avaliação do potencial tóxico com uso do microcrustáceo *Artemia salina* foi realizada levando-se à eclosão dos cistos (marca Maramar) em solução salina (sal marinho a 3%), em ambiente com temperatura de 28,0 \pm 2°C, sob iluminação e aeração constante e observando-se a formação dos náuplios após 24 h, de acordo com Meyer *et al.* (1982).

Para a avaliação da toxicidade do maracujá alho, inicialmente foram preparados dois extratos: extrato aquoso filtrado e extrato dialisado. O primeiro foi obtido diluindo-se 10 g de maracujá alho liofilizado em 100 mL de água destilada, em seguida essa mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi filtrado à vácuo. O material filtrado foi congelado e, posteriormente, liofilizado. O segundo foi obtido realizando-se a digestão gastrointestinal *in vitro* do maracujá alho liofilizado, sendo efetuada com pepsina durante a fase gástrica e pancreatina e sais de bile durante a fase intestinal, seguindo método descrito por Luten *et al.* (1996). Ao final do processo, o conteúdo da membrana chamado de dialisado, foi retirado, congelado e, posteriormente, liofilizado. Após processo de liofilização, os extratos

foram armazenados em sacos plásticos (dupla camada nylon - polietileno) até o momento das análises.

Foram preparadas suspensões com diferentes concentrações (0,1 a 5 mg/mL) dos extratos de maracujá alho (aquoso filtrado e dialisado) em solução salina a 3%, em seguida foram colocadas em placas de Petri (contendo 30 mL da solução) juntamente com 10 unidades de náuplios do microcrustáceo. Utilizou-se solução salina a 3% como controle negativo e dicromato de potássio (0,01 a 100 ppm) como controle positivo. Foi observada a motilidade dos náuplios após 24 h de contato com a solução e as unidades sem motilidade foram consideradas mortas, sendo calculada a sobrevivência em cada concentração. Os dados foram analisados pelo método Probits (FINNEY, 1962) e expressos como CL₅₀ (concentração letal média) e percentual de mortalidade. A classificação seguiu os critérios estabelecidos por Meyer *et al.* (1982), da seguinte forma: “tóxico” se CL₅₀ < 1000 µg/mL e “não tóxicos” se CL₅₀ > 1000 µg/mL. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração do extrato, em pelo menos três experimentos independentes.

4.3.2 Citotoxicidade em fibroblastos

As células de fibroblastos (linhagem CCD 1059 SK; ATCC® CRL-2072TM) foram cultivadas em frascos próprios para cultura (Kasvi, 75 cm², volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) Low Glucose enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e 1% de aminoácidos não essenciais. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade e, periodicamente, observadas com auxílio do microscópio de inversão (BUTLER; DAWSON, 1992).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com *Alamar Blue* (resazurina). A linhagem CCD 1059 SK em crescimento logarítmico foi semeada em placas de 96 poços na densidade de 10⁵ células/mL, onde foram aplicados 100 µL/poço da suspensão celular. As placas foram incubadas por 24 h em estufa de CO₂ a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade antes da aplicação da amostra.

Os extratos de maracujá alho (aquoso filtrado e dialisado) foram previamente filtrados em membranas de 0,22 µm e uma alíquota da solução-estoque de cada amostra foi retirada e diluída diretamente no meio de cultura DMEM completo. Como resultado das diluições seriadas (em quadruplicatas), as concentrações testadas variaram entre 31 e 1000 µg/mL. Para o controle do crescimento celular (CTL) foi utilizado somente o meio completo

adicionado de PBS (tampão fosfato salino) como veículo. Após aplicação das amostras, as placas foram incubadas por 72 h a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Quatro horas antes de terminar o período de incubação, 10 µL da solução de *alamar blue* (0,312 mg/mL) foram adicionados em cada poço. Ao fim do período de 72 h, as absorbâncias foram medidas com auxílio do leitor de ELISA (BioTek Synergy HT) utilizando comprimento de onda de 570 e 600 nm. O percentual de redução do *alamar blue* (%) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de redução do } \textit{alamar blue} (\%) = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(R_1 \times N_2) - (R_2 \times N_1)} \times 100 \quad (2)$$

Onde: O₁ é o coeficiente de extinção molar (E) do alamar oxidado em 570 nm; O₂ é o E do alamar oxidado em 600 nm; A₁ é a absorbância em 570 nm dos poços testes; A₂ é a absorbância em 600 nm dos poços testes; N₁ é a absorbância em 570 nm dos poços contendo apenas alamar e meio; N₂ é a absorbância em 600 nm dos poços contendo apenas alamar e meio; R₁ é o E do alamar reduzido em 570 nm; R₂ é o E do alamar reduzido em 600 nm.

A viabilidade celular (%) foi calculada por proporcionalidade, considerando a redução dos poços controle (células, meio e alamar) 100%.

Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de matar 50% da população celular) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram determinados para cada amostra a partir de regressão não-linear.

4.3.3 Citotoxicidade em neutrófilos humanos

As células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80 a 90%), foram obtidos através da coleta de sangue de indivíduos voluntários, saudáveis e que não estavam em uso de medicamentos anti-inflamatórios, analgésicos e anticoagulantes.

O isolamento dos neutrófilos foi realizado conforme método descrito por Henson (1971), modificado por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue humano foi centrifugado, lavado seguidas vezes com soluções salina, utilizando solução de gelatina a 2,5% (p/v) para formação de um gradiente de separação dos componentes sanguíneos. Depois de isolados, os neutrófilos foram mantidos no meio *Hanks balanced salt solution* (HBSS) em gelo. A viabilidade das células foi determinada pelo ensaio de exclusão por azul de Tripán e a contagem da células foi realizada em câmara de Neubauer.

4.3.3.1 Teste do MTT

O teste do MTT (brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) utiliza como parâmetro para avaliação da citotoxicidade a atividade metabólica da célula. Para realização desse ensaio, neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados por 30 min a 37°C na presença de extratos de maracujá alho (aquoso filtrado e dialisado) em diferentes concentrações (1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico) em placa de 96 poços. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 min a 25°C e o sobrenadante descartado e incubada uma nova solução contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, e essas células foram incubadas novamente por mais 3 h. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado ácido dimetilsulfóxido (DMSO) puro para a lise das células e solubilização do sal de formazan (MOSMANN, 1983). Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 min com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 550 nm. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual em relação ao grupo controle.

4.3.3.2 Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A medida da integridade da membrana celular através da atividade da enzima LDH é um dos parâmetros utilizados para a avaliação de citotoxicidade. Para realização desse ensaio, neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 min a 37°C na presença dos extratos de maracujá alho (aquoso filtrado e dialisado) com concentrações de 1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL, HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico). Em seguida, os tubos de reação foram centrifugados a 800 g, por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, que fica localizada no citoplasma da célula e é liberada quando as células são lesadas ou necrosadas. Essa enzima é responsável pela conversão de piruvato a lactato na presença de NADH (BERGMEYER; BERNT, 1963).

O ensaio foi realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância devido à oxidação do NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas com o sobrenadante, por 3 min, a 37°C. Foi realizada a leitura

da absorbância em 340 nm nos tempos 1 e 3 min, a 37°C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = \left(\frac{A_1 - A_2}{2} \right) \times 1587,03 \quad (3)$$

Onde: A é a atividade da enzima LDH na amostra em U/L; A₁ é a absorbância inicial (1 min) em 340 nm; A₂ é a absorbância final (3 min) em 340 nm; 1587,03 é o fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

A citotoxicidade dos extratos de maracujá alho foi avaliada em pelo menos três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

4.3.4 Toxicidade *in vivo*

Os animais utilizados foram ratos *Wistar* (180 a 250 g), machos e fêmeas, oriundos do Biotério do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR (Universidade de Fortaleza), acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob temperatura média de 26°C, em ciclos claro/escuro de 12/12 h.

A toxicidade aguda foi realizada conforme o Guia OECD 423/2001 (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas e o número de animais por dose (três ratos *Wistar*, fêmeas). A dose inicial de maracujá alho liofilizado selecionada para o estudo foi de 300 mg/kg de massa corporal, suspensa em água destilada. Observando-se a ausência de mortalidade nas primeiras 24 h de exposição, foram testadas as doses de 1000 e 2000 mg/kg de massa corporal. Os animais ficaram em jejum por 10 h anteriormente à administração oral da amostra, com acesso livre apenas à água, a ração foi permitida somente 3 h após a administração. O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração da amostra, no sétimo e no décimo quarto dia pós-administração. Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pêlos, estresse, salivação, olhos e comportamento.

A toxicidade sub-crônica foi realizada conforme o Guia OECD 408/1998 (OECD, 1998). A dose de maracujá alho utilizada foi de 1000 mg/kg (dose intermediária que foi utilizada na avaliação da toxicidade aguda *in vivo*), sendo incorporada na ração. A ração com maracujá alho (FIGURA 4) foi preparada semanalmente, considerando o peso médio dos animais e o consumo de 20 g de ração por animal, para determinar a quantidade de maracujá alho liofilizado a ser incorporado. A ração utilizada foi da marca Purina, já consumida pelos

animais no laboratório. Essa ração foi triturada em processador *Robot Coupe* e misturada com maracujá alho liofilizado, umidificada, moldada em formato cúbico (aproximadamente 2 x 2 x 2 cm), congelada e submetida a liofilização em equipamento Liobras, modelo Liotop LP 50. A ração com maracujá alho foi armazenada em sacos plásticos até o seu uso.

Figura 4 – Ração elaborada com maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip)



Fonte: A autora (2019).

O experimento foi realizado com ratos *Wistar*, existindo um grupo com 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) que consumiram a ração com maracujá alho e um grupo controle com 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) que consumiram ração padrão sem maracujá alho durante 90 dias consecutivos. Durante o período experimental, os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo peso, postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pêlos, estresse, salivação, olhos e comportamento. A quantidade de ração consumida também foi pesada a cada 3 dias, para avaliação de consumo médio por animal.

Ao final dos 90 dias, os animais foram anestesiados com xilasina (10 mg/kg) e cetamina (50 mg/kg) e sacrificados por punção cardíaca. Os órgãos da cavidade corpórea (pulmões, coração, estômago, fígado, baço e rins) foram avaliados macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração, tamanho e consistência.

4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória do maracujá alho em neutrófilos humanos

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através do efeito na degranulação em neutrófilos humanos induzida por forbol miristato acetato (PMA) por meio da liberação de enzima mieloperoxidase (MPO).

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada durante 15 min a 37°C extratos de maracujá alho (aquoso filtrado e dialisado) com concentrações de 1, 10, 50, 100 ou 200 µg/mL, Indometacina (INDO – 36 µg/mL) ou HBSS (células não tratadas). A seguir, foi adicionado o estímulo (PMA – 0,1 µM) e manteve-se por mais 15 min a 37°C. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foi utilizado na determinação da concentração de MPO segundo metodologia descrita por Úbeda *et al.* (2002). Os resultados foram expressos como percentual de liberação de MPO.

4.5 Avaliação do efeito do maracujá alho sobre o comportamento de camundongos

Os camundongos Swiss (20 a 30 g), machos e fêmeas oriundos do Biotério do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR, acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclos claro/escuro de 12/12 h, foram mantidos em jejum por 3 h antes do início do experimento. Os animais foram divididos em grupos (n=6/grupo) e tratados por via oral (gavagem), com diferentes doses de maracujá alho liofilizado (200 ou 400 mg/kg) suspenso em água destilada, veículo (água) foi utilizado como controle negativo e diazepam (2 mg/kg) ou fluoxetina (5 mg/kg) como controle positivo. Após 60 min do tratamento, foram submetidos aos testes de campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado, placa perfurada, nado forçado, tempo de sono induzido por éter etílico e atividade anticonvulsivante.

4.5.1 Avaliação da atividade locomotora

4.5.1.1 Teste do campo aberto

De acordo com método de Walsh e Cummins (1976), um campo aberto, confeccionado em acrílico (30 x 30 x 15 cm) foi utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos com as quatro patas entre

as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e de levantar (*rearing*) foram registrados durante um período de 5 min.

4.5.1.2 Teste do rota rod

O aparelho de *rota rod* consiste em um cilindro de 2,5 cm de diâmetro, subdividido em cinco compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro foi ajustado para girar a uma velocidade constante (20 rpm). Os camundongos foram selecionados 24 h antes do teste e permaneceram apenas aqueles que conseguiram permanecer no aparelho por 1 min. No dia do teste, foi avaliado o tempo de permanência dos animais no aparelho, considerando o tempo máximo de 1 min (LALONDE *et al.*, 2003).

4.5.2 Avaliação da atividade ansiolítica

4.5.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

De acordo com Lister (1987), o labirinto em cruz elevado consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados foram conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho possuía elevação de 45 cm de altura. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para os braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min. As medidas comportamentais registradas foram a frequência de entrada e o tempo despendido nos braços abertos e fechados.

4.5.2.2 Teste da placa perfurada

Os camundongos foram colocados individualmente no centro de uma placa quadrada de madeira (40 x 40 x 10 cm), com 16 furos equidistantes com 2 cm de diâmetro. Foram registrados o número de vezes que o animal introduziu o focinho nos orifícios da placa (*head dips*) registrados durante 5 min (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998).

4.5.3 Avaliação da atividade antidepressiva

A atividade antidepressiva foi avaliada através do teste do nado forçado. Os camundongos foram colocados, individualmente, em um cilindro de vidro (40 cm x 25 cm; altura x diâmetro), contendo 15 cm de água por um período de 6 min, sendo cronometrado os 4 últimos minutos, no qual foi registrado o tempo total de imobilidade para cada animal. Foi considerado como imobilidade quando o animal fazia apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água (PORSOLT; BERTIE; JALFRE, 1977).

4.5.4 Avaliação da atividade sedativa/hipnótica

A atividade sedativa/hipnótica foi avaliada através do teste do tempo de sono induzido por éter etílico. Os camundongos foram colocados em uma câmara de vidro fechada (30 x 20 cm; altura x diâmetro), saturada com éter etílico. A saturação foi feita pelo umedecimento de algodão (1,5 g) com 5 mL de éter etílico P.A. colocado na câmara 5 min antes do teste. Decorrido o tempo para a saturação da câmara, os animais foram introduzidos individualmente na mesma. O sono foi caracterizado pela perda do reflexo postural do animal e após 60 s da perda deste reflexo, o animal foi retirado da câmara e colocado em posição decúbito dorsal. O término do sono foi caracterizado pela recuperação da postura normal. Foi registrada a latência e a duração da hipnose induzida pelo éter etílico (VIEIRA, 2001; DUARTE *et al.*, 2007).

4.5.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante

4.5.5.1 Convulsão induzida por pentilenotetrazol

Após os tratamentos, todos os grupos foram tratados de forma individual com pentilenotetrazol (85 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal). Durante o período de observação dos animais (30 min), foram registrados os seguintes parâmetros: o tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e o tempo gasto entre a primeira convulsão e a morte (latência de morte) (KARLER *et al.*, 1989).

4.5.5.2 Convulsão induzida por cafeína

Após os tratamentos, todos os grupos foram tratados de forma individual com cafeína (300 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal). Durante o período de observação dos animais (30 min), foram registrados os seguintes parâmetros: o tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e o tempo gasto entre a primeira convulsão e a morte (latência de morte) (RITCHIE, 1975).

4.5.5.3 Convulsão induzida por picrotoxina

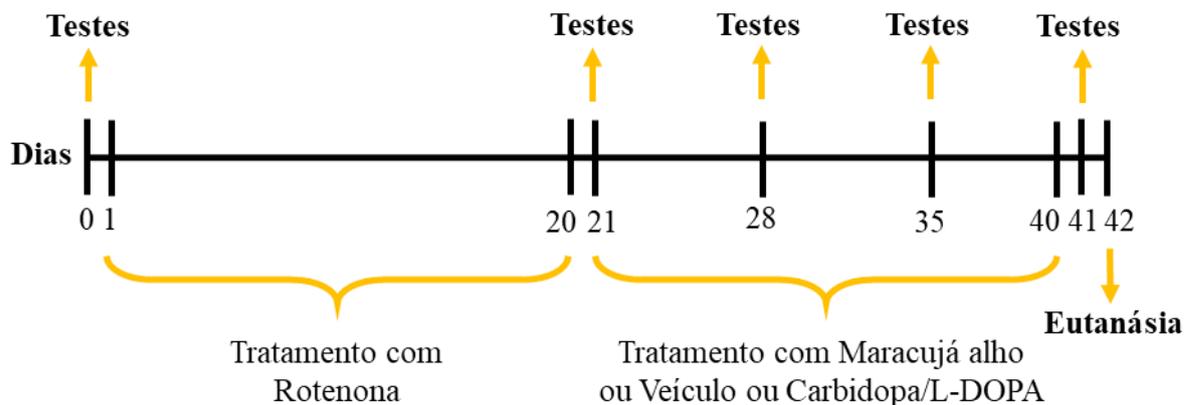
Após os tratamentos, todos os grupos foram tratados de forma individual com picrotoxina (10 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal). Durante o período de observação dos animais (30 min), foram registrados os seguintes parâmetros: o tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão) e o tempo gasto entre a primeira convulsão e a morte (latência de morte) (VAN RIJN *et al.*, 1998).

4.6 Avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos

Foram utilizados ratos Wistar (180 a 250 g) machos, oriundos do Biotério do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR, acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob temperatura média de 26 °C, em ciclos claro/escuro de 12/12 h, recebendo ração padrão e água à vontade durante o experimento. Os ratos (n=40) receberam rotenona (3 mg/kg) por via intraperitoneal durante 20 dias consecutivos. A partir do 21º dia, foram divididos em 4 grupos (n=10/grupo) e tratados por via oral (gavagem), com maracujá alho (200 ou 400 mg/kg), veículo (água) utilizado como controle negativo ou Carbidopa/L-DOPA (25 mg/kg/250 mg/kg) como controle positivo, durante 20 dias consecutivos. Também foi utilizado um 5º grupo (n=6) denominado *naive*, em que os animais não foram tratados com rotenona e não foram submetidos a gavagem de substâncias, apenas foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os demais grupos e foram submetidos aos mesmos testes comportamentais realizados. A rotenona induz sintomas de parkinsonismo em ratos (ALAM; SCHMIDT, 2002). O comportamento dos animais foi avaliado nos seguintes testes: força de preensão, campo aberto e nado forçado. Os testes comportamentais foram realizados antes e após 20 dias de administração de rotenona e após 7, 14 e 20 dias das gavagens (FIGURA 5). No 21º dia, os animais foram eutanasiados por

decapitação, com uso de guilhotina, e tiveram as áreas cerebrais (corpo estriado direito e esquerdo) dissecados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em *ultrafreezer* a -80°C até o momento das análises. Nesses tecidos foi realizada a dosagem de monoaminas (DA – dopamina e DOPAC – ácido dihidroxifenilacético) e determinação dos níveis de nitrito.

Figura 5 – Esquema do protocolo experimental para a avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos



Fonte: A autora (2019).

4.6.1 Teste da corda para força de preensão (*String test for grip strength*)

O animal foi colocado com as patas dianteiras segurando um arame de aço, com 2 mm de diâmetro e 40 cm de comprimento, posicionado a uma altura de 35 cm sobre um suporte. O período de tempo em que o animal foi capaz de segurar o fio até que ele caiu foi gravado, com tempo de corte de 60 s. Essa latência para a perda de preensão foi considerada como uma medida indireta da força de preensão (TARIQ *et al.*, 2005).

4.6.2 Testes do campo aberto e do nado forçado

Os testes do campo aberto e do nado forçado foram realizados conforme descritos nos itens 4.7.1.1 e 4.7.3, respectivamente. Houve apenas alteração no tamanho da arena do campo aberto (50 x 50 x 15 cm) e do cilindro (45 cm de altura e 30 cm de diâmetro, contendo 25 cm de água).

4.6.3 Dosagem de monoaminas

Os tecidos (corpo estriado) dos animais foram homogeneizados, por aproximadamente 30 s, em ácido perclórico (HClO_4) à 1% e o homogenato obtido foi centrifugado por 15 min a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi injetada no equipamento de HPLC. Para as análises de monoaminas Dopamina (DA) e seu metabólito, o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), foi utilizada uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 cm e diâmetro da partícula de 0,3 μm (Shimadzu® – Japão). A fase móvel utilizada foi composta por ácido crítico à 0,163 M e NaCl (pH 3,0) contendo ácido octanosulfônico sódico à 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila à 4% v/v e tetrahydrofurano à 1,7% v/v. DA e DOPAC foram eletroquimicamente detectados usando-se um detector amperométrico da Shimadzu®. Foram injetados padrões de DA e DOPAC para obtenção de cromatograma padrão para estas monoaminas.

4.6.4 Determinação de nitrito

A determinação dos níveis de nitrito nos tecidos (corpo estriado) dos animais foi realizada conforme método descrito por Green *et al.* (1982). Para realização do ensaio foram usados 100 μL do reagente de Griess (N-1-naftiletilenodiamina à 0,1 % em água bidestilada, ácido fosfórico à 5% e sulfanilamida à 1 % em ácido fosfórico à 5 %; 1:1:1, v/v/v) e adicionados 100 μL do sobrenadante (amostras previamente centrifugadas) do homogenato à 10 % dos tecidos dos animais em salina ou 100 μL do padrão de NaNO_2 nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 μL do reagente de Griess adicionados a 100 μL de salina. A leitura da absorbância foi feita em 540 nm. As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então determinada a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra. A curva de calibração foi feita com nitrito de sódio (NaNO_2) à 10 mM e os pontos da curva foram: 1 mM; 100 μM ; 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM ; 3,125 μM e 1,56 μM .

4.7 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais foram devidamente registrados e autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) sob o Parecer nº 011/2015, seguindo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o Parecer nº 3.284.194 e o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 09353018.5.0000.5054, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos da Resolução nº 466/2012 (BRASIL, 2012).

4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos na caracterização físico-química e de componentes funcionais foram expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) e os resultados da experimentação animal como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foi realizada análise de correlação de *Pearson* entre os polifenóis extraíveis totais e a atividade antioxidante total, utilizando o *software Assistat*, versão 7.7. Para dados paramétricos foi utilizado o teste de T de *Student* para detectar diferenças estatísticas entre duas amostras e a análise de variância ANOVA, seguida do teste de *Tukey* para comparações múltiplas; e para dados não paramétricos foi realizado o teste de *Mann-Whitney* para duas amostras e *Kruskall-Wallis*, seguida do teste de *Dunn's* para comparações múltiplas. Para fins estatísticos, foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 6.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química dos frutos de maracujá alho

5.1.1 Análise físico-química e composição centesimal

Os resultados obtidos nas análises físico-química e de composição centesimal dos frutos de maracujá alho liofilizado estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização físico-química e composição centesimal dos frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) liofilizados

| Análises | Resultados |
|--|--------------|
| pH | 4,88 ± 0,04 |
| Atividade de água | 0,29 ± 0,00 |
| Acidez total titulável (g ácido cítrico/100 g) | 2,78 ± 0,16 |
| Umidade (g/100 g) | 4,99 ± 0,05 |
| Cinzas (g/100 g) | 6,29 ± 0,46 |
| Proteínas (g/100 g) | 8,77 ± 0,20 |
| Lipídios (g/100 g) | 10,93 ± 0,05 |
| Carboidratos (g/100 g) | 69,19 ± 0,56 |
| – Fibra alimentar total (g/100 g) | 48,40 ± 2,26 |
| – Fibra alimentar solúvel (g/100 g) | 10,30 ± 0,42 |
| – Fibra alimentar insolúvel (g/100 g) | 38,10 ± 1,84 |

Valores expressos por média ± desvio padrão (n = 3).

Em relação às análises físico-químicas e de composição centesimal, os frutos liofilizados de maracujá alho apresentaram valores semelhantes para umidade e cinzas aos encontrados na literatura para casca de maracujá azedo (*Passiflora edulis*), porém os valores de lipídios e proteínas do presente estudo foram bem superiores, isso pode ser devido à presença das sementes no material analisado. Córdova *et al.* (2005) obtiveram valor médio de 1,50 g/100 g para proteínas e 0,80 g/100 g para lipídios em casca de maracujá (*P. edulis*) seca em estufa à vácuo a 70 °C por 3 h. Cazarin *et al.* (2014) encontraram valor médio de 0,43 para atividade de água, 9,48 g/100 g para umidade e 6,88 g/100 g para cinzas em farinha da casca de maracujá

(*P. edulis*). Souza, Ferreira e Vieira (2008) constataram um teor de 6,09 g/100 g para umidade em farinha de casca de maracujá.

O baixo teor de umidade e atividade de água nos frutos de maracujá alho é coerente com o processo de secagem ao qual foi submetido, encontrando-se em conformidade com o recomendado pela Legislação Brasileira vigente, que estabelece um valor máximo de 15% para farinhas de espécies de frutos (BRASIL, 2005).

Em relação ao conteúdo de fibras, valores superiores foram determinados por Souza, Ferreira e Vieira (2008) e Cazarin *et al.* (2014), constatando um teor de fibra alimentar total de 66,37 e 65,22 g/100 g, respectivamente, em farinha de casca de maracujá (*P. edulis*).

Considerando um consumo de 10 g do maracujá alho liofilizado, tem-se um teor de fibra alimentar total de cerca de 4,84 g. Seguindo a Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999), verifica-se que o fruto de maracujá alho pode ser considerado um alimento com alegação funcional como fonte de fibras, uma vez que apresentou teores de fibra alimentar total maiores que o mínimo exigido pela legislação, que estabelece um valor mínimo de 3 g por porção, para alimentos sólidos.

5.1.2 Determinação de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total

Os valores médios de polifenóis e a atividade antioxidante total pelo método ABTS^{•+} dos frutos de maracujá alho liofilizado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de polifenóis extraíveis totais e atividade antioxidante total dos frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) liofilizados

| Análises | Resultados |
|---|------------------|
| Polifenóis extraíveis totais (mg EAG/100 g) | 1.151,33 ± 14,46 |
| Atividade antioxidante total (µM Trolox/g) | 109,71 ± 3,02 |

Valores expressos por média ± desvio padrão (n = 3). EAG: Equivalente em ácido gálico.

A correlação entre a média dos valores de polifenóis totais e a média dos valores de atividade antioxidante total do maracujá alho desidratado foi de 0,554, indicando uma correlação positiva entre essas variáveis. Diante disso, verifica-se que os compostos fenólicos possuem importante contribuição na atividade antioxidante. Segundo Lazarova *et al.* (2014), muitos compostos fitoquímicos, como os fenólicos e os flavonóides, apresentam uma maior contribuição e seu conteúdo correlaciona-se positivamente com a atividade antioxidante.

Os polifenóis são os principais antioxidantes na dieta humana. Esses bioativos naturais presentes em frutas e vegetais foram descobertos por seus potenciais efeitos benéficos à saúde na prevenção de muitas doenças humanas relacionadas ao estresse oxidativo, como infecções bacterianas e virais, atividade cardíaca, câncer, úlcera, diabetes, envelhecimento, distúrbios inflamatórios e desordens neurológicas (BHARDWAJ *et al.*, 2014).

Saravanan e Parimelazhagan (2014) estudando as propriedades da *P. ligularis* em extrato seco obtido da polpa, utilizando acetona como solvente extrator, obtiveram um alto conteúdo de polifenóis totais (640,7 mg EAG/g extrato) e atividade antioxidante de 9800,9 $\mu\text{mol/L}$ Trolox/g extrato) pelo método ABTS^{•+}. Cazarin *et al.* (2014), avaliando o teor de polifenóis em extrato metanólico/acetona de farinha obtida da casca de *P. edulis* quantificaram 2,3 mg EAG/g de amostra e Silva *et al.* (2009) obteve 4,8 mg EAG/g de amostra. Spinosa (2016) obteve teor de polifenóis de 825,7 mg EAG/100 g e atividade antioxidante de 31,8 μM Trolox/g (método ABTS^{•+}) para o fruto de *P. tenuifila in natura* e 2284,8 mg EAG/100 g e 84,7 μM Trolox/g, respectivamente, para o fruto liofilizado.

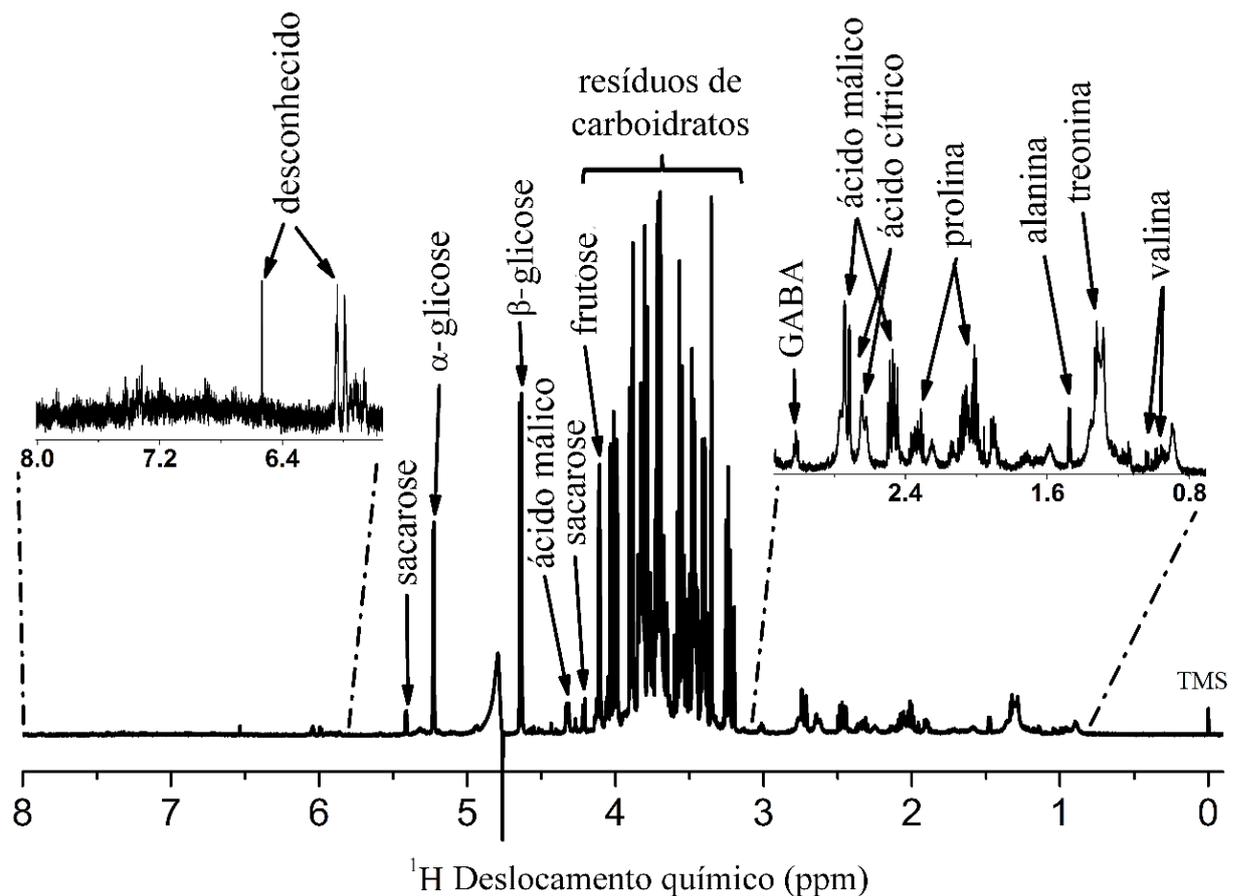
Tendo em vista o potencial antioxidante dos frutos de maracujá alho (*P. tenuifila* Killip), este pode ser utilizado como ingrediente para a formulação de produtos como relevante fonte de antioxidantes naturais. Holanda (2015) desenvolveu uma formulação de sopa enlatada de vegetais e carne a base de *P. tenuifila* e caracterizou como fonte de fibras ($3,88 \pm 0,32$ g/100 g de fibra alimentar total), de compostos fenólicos ($103,43 \pm 8,43$ mg EAG/100 g) e de antioxidantes ($4,09 \pm 0,34$ μM Trolox/g pelo método ABTS^{•+}) e Spinosa (2016) avaliando uma sopa desidratada, formulada com a mesma espécie de maracujá, obteve valores de $165,42 \pm 7,33$ mg EAG/100 g para os compostos fenólicos e de $31,80 \pm 1,18$ μM Trolox/g para a atividade antioxidante total pelo método ABTS^{•+}.

5.1.3 Avaliação da composição química por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi realizada para identificação e quantificação de metabolitos primários de baixo peso molecular presentes nos frutos de maracujá alho liofilizado. Os resultados estão apresentados na Figura 6. Os compostos majoritários encontrados foram os açúcares apresentando sinais de frutose, sacarose ($13,46 \pm 1,67$ mg/g), α -glicose ($42,99 \pm 4,05$ mg/g) e β -glicose ($63,06 \pm 4,88$ mg/g) e os minoritários foram ácido málico ($14,58 \pm 2,42$ mg/g), gama-aminobutírico (GABA) e cítrico e aminoácidos

essenciais, apresentando sinais característicos de valina, treonina, prolina ($9,54 \pm 1,01$ mg/g) e alanina ($2,43 \pm 0,30$ mg/g).

Figura 6 – Espectro de RMN ^1H dos frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) liofilizado



Fonte: A autora (2019).

Os açúcares (principalmente frutose, glicose e sacarose), ácidos orgânicos (principalmente cítrico e málico) e aminoácidos são importantes compostos para o sabor e os aspectos nutritivos de frutas cítricas (SHENG *et al.*, 2017). Além disso, os ácidos orgânicos também desempenham um papel importante no aroma e na coloração dos frutos, contribuindo para estabilizar as antocianinas e prolongar a vida útil dos frutos e de produtos processados (MA *et al.*, 2015). Os aminoácidos essenciais são importantes reguladores do metabolismo humano. A FAO/OMS (2007) estabeleceu valores para necessidades diárias de aminoácidos essenciais para atividades rotineiras, considerando uma pessoa de 70 kg é recomendando um limite máximo de 3600 mg e mínimo de 273 mg de valina, máximo de 2720 mg e mínimo de

157,5 mg de treonina e para prolina e alanina o limite mínimo não é especificado e apresentam limite máximo de 5360 mg e 3320 mg, respectivamente.

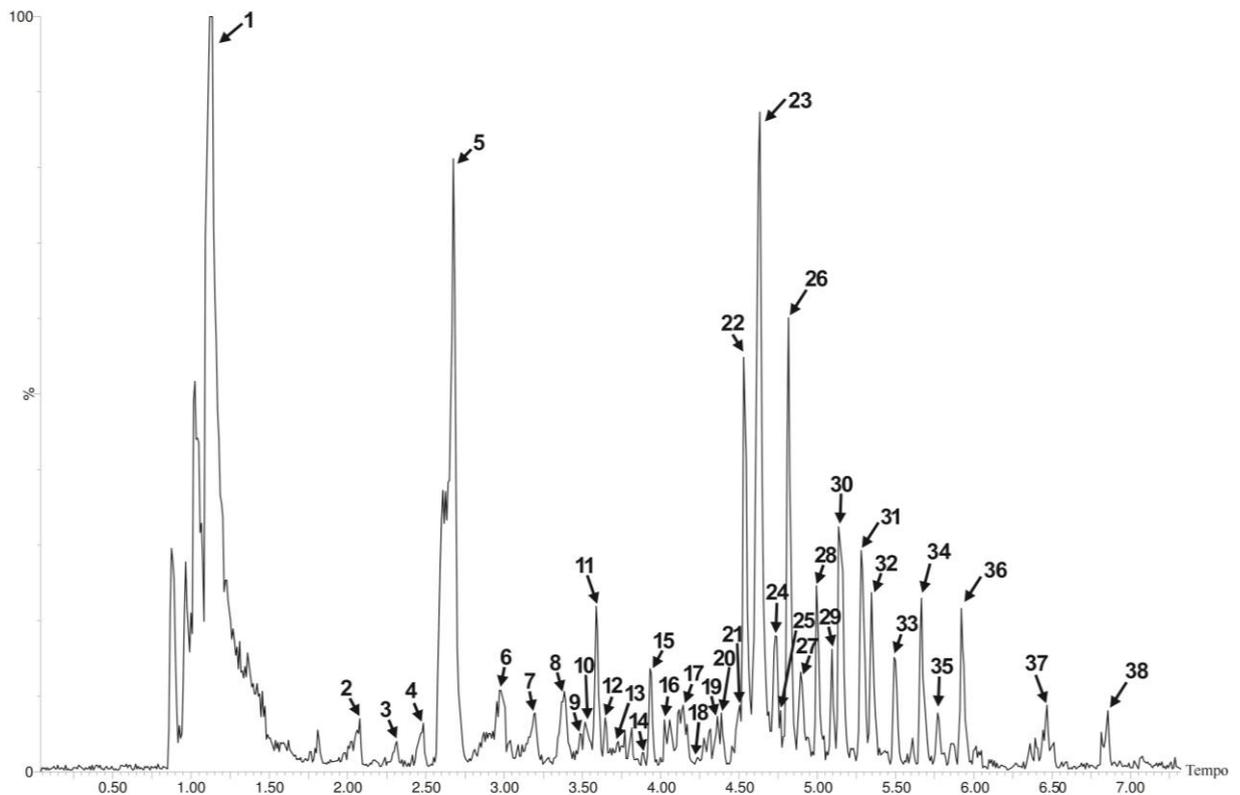
Shanmugam *et al.* (2018), estudando as propriedades da polpa de *Passiflora subpeltata* identificaram ácido glutâmico (243 mg/g proteína), arginina (115 mg/g proteína), ácido aspártico (105 mg/g proteína) e prolina (5,02 mg/g proteína). Segundo Inomata *et al.* (1983), a alanina é um componente razoavelmente constante e específico no maracujá, com teor médio de 27 mg/100 mL de suco. Ainda segundo esses autores, foram encontrados os aminoácidos livres: cistina (2,9%), lisina, taurina, histidina, arginina, asparagina (2,9%), glicina, ácido aspártico, serina (32,0%), ácido glutâmico, treonina (30,4%), alanina, prolina (23,0%), tirosina, triptofano (3,3%), fenilalanina, metionina, valina (3,0%), leucina, isoleucina (2,5%). Elsas *et al.* (2010) analisando as propriedades de cinco diferentes extratos de flores de *Passiflora incarnata*, o GABA foi o aminoácido presente em todos os extratos.

De acordo com Campbell, Chebib e Johnston (2004), a bioatividade da *Passiflora* pode também resultar de ações sinérgicas de vários compostos, tais como uma combinação de GABA com compostos adicionais que podem facilitar a sua permeação de membrana e possivelmente juntamente com modulação positiva de segunda ordem de receptores GABA_A em flavonoides.

5.1.4 Avaliação da composição química por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência foi utilizada para identificar os compostos presentes nos frutos liofilizados de maracujá alho. A Figura 7 mostra o cromatograma obtido, usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo.

Figura 7 – Cromatografia e espectrometria de massa dos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo



Fonte: *Software Masslynx 4.1 (Waters® Corporation)* adaptado pela autora (2019).

Os compostos foram identificados com base em suas massas moleculares e em comparação com dados publicados na literatura (SUMNER *et al.*, 2007). O tempo de retenção, as massas dos compostos e de seus fragmentos, a fórmula molecular e a comparação com dados da literatura resultaram em 38 compostos identificados (TABELA 4). Dentre estes, 23 compostos já foram relatados em espécies de *Passiflora* por outros pesquisadores. Os compostos identificados, em sua grande maioria, foram compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos).

Tabela 4 – Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo (*continua*)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] ⁻ Observada | [M-H] ⁻ Calculada | Fragmentos m/z | Fórmula | Erro (ppm) | Composto | Referências |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|---|------------|--|--|
| 1 | 1,209 | 191,0189 | 191,0192 | 111 | C ₆ H ₇ O ₇ | - 1,6 | Ácido cítrico | Farag <i>et al.</i> , 2017; Hoffmann, 2016 |
| 2 | 2,068 | 137,0239 | 137,0239 | - | C ₇ H ₅ O ₃ | 0,0 | Ácido 4-hidroxibenzóico | Trautvetter <i>et al.</i> , 2009 |
| 3 | 2,304 | 167,0345 | 167,0344 | 123 | C ₈ H ₇ O ₄ | 0,6 | Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido vanílico) | Trautvetter <i>et al.</i> , 2009; Hoffmann, 2016 |
| 4 | 2,49 | 447,1146 | 447,1139 | 259, 233, 152 | C ₁₈ H ₂₃ O ₁₃ | 1,6 | Ácido dihidroxibenzóico hexosídeo pentosídeo | Gadioli, 2017 |
| 5 | 2,674 | 243,1076 | 243,1080 | 170 | C ₈ H ₁₉ O ₈ | - 1,6 | Desconhecido | - |
| 6 | 2,96 | 467,1613 | 467,1612 | 203, 151 | C ₁₅ H ₃₁ O ₁₆ | 0,2 | Desconhecido | - |
| 7 | 3,197 | 547,1621 | 547,1616 | 473, 443, 417, 383, 271 | C ₂₇ H ₃₁ O ₁₂ | 0,9 | Apigenina-C-deoxihexosídeo-O-(dideoxi) hexosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016 |
| 8 | 3,366 | 193,0496 | 193,0501 | 178,149 | C ₁₀ H ₉ O ₄ | - 2,6 | Ácido ferrúlico | Medeiros, 2018; Farag <i>et al.</i> , 2017 |

Tabela 4 – Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo (*continuação*)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] ⁻ Observada | [M-H] ⁻ Calculada | Fragmentos m/z | Fórmula | Erro (ppm) | Composto | Referências |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|---|------------|--|--|
| 9 | 3,483 | 387,1663 | 387,1655 | 207, 163 | C ₁₈ H ₂₇ O ₉ | 2,1 | Desconhecido | - |
| 10 | 3,516 | 223,0614 | 223,0606 | 193 | C ₁₁ H ₁₁ O ₅ | 3,6 | Desconhecido | - |
| 11 | 3,586 | 593,1504 | 593,1506 | 473, 357, 327 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ | - 0,3 | Orientina 6''-O-deoxihexose (luteolina 8-C-glucosídeo 6''-O-deoxihexose) | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |
| 12 | 3,644 | 447,0916 | 447,0927 | 369, 357, 327, 285 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | - 2,5 | Luteolina-6-C-glucosídeo (isoorientina) | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017; Otify <i>et al.</i> , 2015 |
| 13 | 3,752 | 287,0909 | 287,0919 | 195 | C ₁₆ H ₁₅ O ₅ | - 3,5 | Desconhecido | - |
| 14 | 3,880 | 563,1418 | 563,1401 | 547, 503, 487, 473, 383 | C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄ | 3,0 | Apigenina-6-C-glucosídeo-8-C-arabinosídeo (schaftosídeo) | Farag <i>et al.</i> , 2016; Otify <i>et al.</i> , 2015 |
| 15 | 3,939 | 577,1553 | 577,1557 | 413, 293 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | - 0,7 | Isovitexina 2''-O-deoxihexosídeo (apigenina 6-C-glucosídeo 2''-O-deoxihexosídeo) | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |

Tabela 4 – Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo (*continuação*)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] ⁻ Observada | [M-H] ⁻ Calculada | Fragmentos m/z | Fórmula | Erro (ppm) | Composto | Referências |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---|------------|--|---|
| 16 | 4,022 | 593,1495 | 593,1506 | 431, 413, 357, 327, 285 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ | - 1,9 | Luteolina-C-deoxihexosídeo-2''-O-hexosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016 |
| 17 | 4,125 | 577,1556 | 577,1557 | 473, 415, 397, 311, 269 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | - 0,2 | Apigenina-C-deoxihexosídeo-O-hexosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016; Otify <i>et al.</i> , 2015 |
| 18 | 4,283 | 415,1030 | 415,1029 | 397, 357, 327, 325 | C ₂₁ H ₁₉ O ₉ | 0.2 | Crisina 6-C-hexosídeo | Otify <i>et al.</i> , 2015 |
| 19 | 4,361 | 431,0963 | 431,0978 | 413, 357, 327, 311, 285 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ | -3.5 | Luteolina-6-C-quinovosídeo/fucosídeo | FARAG <i>et al.</i> , 2016 |
| 20 | 4,395 | 577,1570 | 577,1557 | 311, 413 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | 2,3 | Isovitexina 6''-O-deoxihexosídeo (apigenina 6-C-glicosídeo 6''-O-deoxihexosídeo) | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |
| 21 | 4,503 | 575,1398 | 575,1401 | 411, 429, 357, 473, 285 | C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄ | 0,5 | Luteolina-8-C-6''deoxi-3''-hexosídeo-2''-O-ramnosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016 |
| 22 | 4,528 | 415,1019 | 415,1029 | 397, 341, 311, 294, 269 | C ₂₁ H ₁₉ O ₉ | - 2,4 | Apigenina-8-C-deoxihexosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016; Otify <i>et al.</i> , 2015 |

Tabela 4 – Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo (*continuação*)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] ⁻ Observada | [M-H] ⁻ Calculada | Fragmentos m/z | Fórmula | Erro (ppm) | Composto | Referências |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|------------|---|---|
| 23 | 4,648 | 575,1411 | 575,1401 | 411, 367, 285 | C ₂₇ H ₂₇ O ₁₄ | 1,7 | Desconhecido | - |
| 24 | 4,739 | 577,1547 | 577,1557 | 473, 415, 311, 353, 283 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | - 1,7 | Apigenina-8-C-deoxihexosídeo-7-O-glicosídeo | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |
| 25 | 4,756 | 577,1553 | 577,1557 | 473, 415, 357, 327 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | - 0,7 | Luteolina 8-C-[6''-O-glicosídeo]-dideoxihexosídeo | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |
| 26 | 4,831 | 577,1570 | 577,1557 | 559, 487, 473, 457, 311 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | 2,3 | Crisina-6,8-C-di-hexosídeo | Farag <i>et al.</i> , 2016; Otify <i>et al.</i> , 2015 |
| 27 | 4,901 | 577,1547 | 577,1557 | 415, 269 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ | - 1,7 | Apigenina O-deoxihexosídeo-O-glicosídeo | Ozarowski <i>et al.</i> , 2017 |
| 28 | 4,993 | 677,2809 | 677,2809 | 659, 645, 617 | C ₃₄ H ₄₅ O ₁₄ | 0,0 | Desconhecido | - |
| 29 | 5,101 | 675,2648 | 675,2653 | 643, 599, 319 | C ₃₄ H ₄₃ O ₁₄ | - 0,7 | Desconhecido | - |
| 30 | 5,162 | 575,1925 | 575,1917 | 481, 425, 397 | C ₃₂ H ₃₁ O ₁₀ | 1,4 | Desconhecido | - |
| 31 | 5,287 | 691,1897 | 691,1909 | 675, 643, 599, 473, 393, 319 | C ₅₀ H ₂₇ O ₄ | - 1,7 | Desconhecido | - |

Tabela 4 – Compostos identificados nos frutos liofilizados de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) usando o UPLC-ESI-QTOF-MS^E no modo negativo (*conclusão*)

| Nº | Tempo de retenção (min) | [M-H] ⁻ Observada | [M-H] ⁻ Calculada | Fragmentos m/z | Fórmula | Erro (ppm) | Composto | Referências |
|----|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|------------|---|----------------------------|
| 32 | 5,346 | 591,1863 | 591,1866 | 575, 481, 303, 287 | C ₃₂ H ₃₁ O ₁₁ | - 0,5 | Desconhecido | |
| 33 | 5,490 | 879,2916 | 879,2923 | 575, 481, 397, 287 | C ₄₁ H ₅₁ O ₂₁ | - 0,8 | Desconhecido | - |
| 34 | 5,674 | 313,0704 | 313,0712 | 255, 227 | C ₁₇ H ₁₃ O ₃ | - 2,6 | Desconhecido | - |
| 35 | 5,777 | 705,2029 | 705,2031 | 575, 393 | C ₃₃ H ₃₇ O ₁₇ | - 0,3 | Desconhecido | - |
| 36 | 5,927 | 691,1831 | 691,1816 | 557, 473, 411, 393 | C ₃₉ H ₃₁ O ₁₂ | 2,2 | Desconhecido | - |
| 37 | 6,466 | 327,2171 | 327,2171 | 318, 301, 269, 257, 215, 113 | C ₁₈ H ₃₁ O ₅ | 0,0 | Ácido trihidroxi-octadecadienoico (C18:2) | Farag <i>et al.</i> , 2016 |
| 38 | 6,855 | 329,2346 | 329,2328 | 309, 259, 249, 227, 183, 113 | C ₁₈ H ₃₃ O ₅ | 5,5 | Ácido trihidroxi-octadecaenoico (C18:1) | Farag <i>et al.</i> , 2016 |

O espectro de massa do composto nº 1 exibiu m/z 191,0189 ($C_6H_7O_7$)⁻ e fragmento m/z 111, supostamente identificado como ácido cítrico (FARAG *et al.*, 2017; HOFFMANN, 2016). Esse ácido orgânico também foi identificado na espectroscopia de RMN, descrito anteriormente.

Os compostos nº 2, 3, 4 e 8, de acordo com seus espectros de massa, foram classificados como ácidos fenólicos e identificados como ácido 4-hidroxibenzóico com m/z 137,0239 ($C_7H_5O_3$)⁻, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (ácido vanílico) com m/z 167,0345 ($C_8H_7O_4$)⁻, ácido dihidroxibenzóico hexosídeo pentosídeo com m/z 447,1146 ($C_{18}H_{23}O_{13}$)⁻ e ácido ferrúlico com m/z 193,0496 ($C_{10}H_9O_4$)⁻, respectivamente (TRAUTVETTER *et al.*, 2009; HOFFMANN, 2016; GADIOLI, 2017; MEDEIROS, 2018; FARAG *et al.*, 2017). Os compostos fenólicos presentes nas matrizes naturais compreendem uma ampla gama de estruturas químicas, incluindo fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, entre outros (STALIKAS, 2007). Os ácidos fenólicos têm atraído interesse de pesquisas em virtude de seus potenciais benefícios à saúde, exibindo atividades antibacterianas, antivirais, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias devido suas propriedades antioxidantes (CHOCHOLOUS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019).

O composto 7 apresentou espectro de massa com m/z 547,1621 ($C_{27}H_{31}O_{12}$)⁻, com fragmentos m/z 473, 443, 417, 383 e 271, caracterizando o composto apigenina-C-deoxihexosídeo-O-(dideoxi) hexosídeo, composto já relatado em folhas de *P. subpeltata* por Farag *et al.* (2016).

Os compostos nº 11 e 16 exibiram a mesma massa (m/z 593,1504 e 593,1495, respectivamente) e fórmula ($C_{27}H_{29}O_{15}$)⁻ molecular no modo negativo e foram identificados como orientina 6''-O-deoxihexose (luteolina 8-C-glucosídeo 6''-O-deoxihexose) já reportado anteriormente em folhas de *P. alata* (OZAROWSKI *et al.*, 2017) e luteolina-C-deoxihexosídeo-2''-O-hexosídeo em folhas de *P. ambigua*, *P. serratifolia*, *P. quadrangularis*, *P. incarnata* e *P. perfoliata* (FARAG *et al.*, 2016), respectivamente.

O composto nº 12 foi identificado como luteolina-6-C-glucosídeo (isorientina), apresentando espectro de massa com m/z 447,0916 ($C_{21}H_{19}O_{11}$)⁻, com fragmentos m/z 369, 357, 327 e 285, já relatado em folhas de *P. edulis* (OTIFY *et al.*, 2015) e *P. incarnata* (OZAROWSKI *et al.*, 2017).

O composto nº 14 exibiu espectro de massa com m/z 563,1418 ($C_{26}H_{27}O_{14}$)⁻, com fragmentos m/z 547, 503, 487, 473 e 383, e foi identificado como apigenina-6-C-glucosídeo-8-

C-arabinosídeo (schaftosídeo), já relatado em folhas de *P. edulis* (OTIFY *et al.*, 2015) e *P. caerulea*, *P. coriacea*, *P. microstipula*, *P. incarnata* e *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016).

Os compostos nº 15, 17, 20, 24, 25, 26 e 27 também exibiram a mesma massa (m/z 577) e fórmula $(C_{27}H_{29}O_{14})^-$ molecular no modo negativo, sendo caracterizados como isovitexina 2''-O-deoxihexosídeo (apigenina 6-C-glucosídeo 2''-O-deoxihexosídeo) já reportada em folhas de *P. incarnata* (OZAROWSKI *et al.*, 2017), apigenina-C-deoxihexosídeo-O-hexosídeo em folhas de *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016; OTIFY *et al.*, 2015), apigenina-8-C-deoxihexosídeo-7-O-glicosídeo, luteolina 8-C-[6''-O-glicosídeo]-dideoxihexosídeo em folhas de *P. incarnata* (OZAROWSKI *et al.*, 2017), crisina-6,8-C-di-hexosídeo em folhas de *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016; OTIFY *et al.*, 2015) e apigenina O-deoxihexosídeo-O-glicosídeo em folhas de *P. incarnata* (OZAROWSKI *et al.*, 2017), respectivamente.

Os compostos nº 18 e 22 também exibiram a mesma massa (m/z 415,1030 e 415,1019, respectivamente) e fórmula $(C_{21}H_{19}O_9)^-$ molecular no modo negativo e foram identificados com crisina 6-C-hexosídeo e apigenina-8-C-deoxihexosídeo, respectivamente, já relatadas em folhas de *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016; OTIFY *et al.*, 2015).

O composto nº 19 exibiu espectro de massa com m/z 431,0963 $(C_{21}H_{19}O_{10})^-$, com fragmentos m/z 413, 357, 327, 311 e 285, e foi identificado como luteolina-6-C-quinovosídeo/fucosídeo, já relatado em folhas de *P. incarnata* e *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016).

O composto nº 21 foi identificado como luteolina-8-C-6''deoxi-3''-hexosídeo-2''-O-ramnosídeo, apresentando espectro de massa com m/z 575,1398 $(C_{27}H_{27}O_{14})^-$, com fragmentos m/z 411, 429, 357, 473 e 285, já relatado em folhas de *P. subpeltata* (FARAG *et al.*, 2016).

Farag *et al.* (2016) analisando folhas de 17 espécies do gênero *Passiflora* (*P. ambigua*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. costaricensis*, *P. helleri*, *P. holosericea*, *P. incarnata*, *P. perfoliata*, *P. quadrangulares*, *P. racemosa*, *P. serratifolia*, *P. subpeltata*, *P. lutea*, *P. microstipula*, *P. coriácea*, *P. x kewensis*, *P. edulis*) encontraram 97 compostos. Ozarowski *et al.* (2017) identificaram 82 compostos nas folhas de *P. incarnata*, *P. caerulea* e *P. alata*. Otify *et al.* (2015) estudando a folha e o caule de *P. edulis* identificaram 65 compostos. Dentre os compostos encontrados por esses autores, a grande maioria também foram compostos fenólicos, predominando a presença de flavonóides, como apigenina, luteolina, crisina, orientina e vitexina.

Os flavonóides encontrados no presente estudo podem oferecer diversos benefícios à saúde humana. Nabavi *et al.* (2018) revelaram efeito antioxidante e neuroprotetor da apigenina em modelos animais experimentais de Doença de Alzheimer e *Parkinson*, bem como

ensaios clínicos em humanos. Guo *et al.* (2018) verificaram em seu estudo que a orientina exibiu capacidade anti-inflamatória e inibiu a dor neuropática em ratos. Wilsher *et al.* (2017) relataram que a luteolina pode exercer efeitos terapêuticos significativos em células de câncer de mama. Wong *et al.* (2017) verificaram que a administração de apigenina ou luteolina poderia modular favoravelmente o conteúdo de colesterol sérico e hepático em camundongos em uma dieta rica em gordura. He *et al.* (2016) reunindo dados encontrados na literatura descreveram para vitexina e isovitexina efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antineoplásicos, antimicrobiano, antiviral e protetores contra doenças endócrinas, metabólicas, neurológicas, psiquiátricas e do sistema cardiovascular.

Os compostos n° 5, 6, 9, 10, 13, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 apresentaram espectros de massa com m/z 243,1076 ($C_8H_{19}O_8^-$), 467,1613 ($C_{15}H_{31}O_{16}^-$), 387,1663 ($C_{18}H_{27}O_9^-$), 223,0614 ($C_{11}H_{11}O_5^-$), 287,0909 ($C_{16}H_{15}O_5^-$), 575,1411 ($C_{27}H_{27}O_{14}^-$), 677,2809 ($C_{34}H_{45}O_{14}^-$), 675,2648 ($C_{34}H_{43}O_{14}^-$), 575,1925 ($C_{32}H_{31}O_{10}^-$), 691,1897 ($C_{50}H_{27}O_4^-$), 591,1863 ($C_{32}H_{31}O_{11}^-$), 879,2916 ($C_{41}H_{51}O_{21}^-$), 313,0704 ($C_{17}H_{13}O_3^-$), 705,2029 ($C_{33}H_{37}O_{17}^-$), 691,1831 ($C_{39}H_{31}O_{12}^-$), respectivamente, porém não foram encontrados dados de massas moleculares semelhantes na literatura, dificultando a identificação desses compostos, sendo portanto caracterizados como desconhecidos.

Os espectros de massas revelaram a presença de ácidos graxos hidroxilados, como o ácido trihidroxi-octadecadienóico (C18:2) (composto n° 37) com m/z 327,2171 ($C_{18}H_{31}O_5^-$) já relatado na literatura em folhas de *P. incarnata*, *P. helleri*, *P. quadrangularis*, *P. perfoliata* e *P. edulis* e ácido trihidroxi-octadecaenóico (C18:1) (composto n° 38) com m/z 329,2346 ($C_{18}H_{33}O_5^-$) em folhas de *P. incarnata* e *P. edulis* (FARAG *et al.*, 2016). Martin-Arjol *et al.* (2010) reportaram uma atividade antimicrobiana de ácidos graxos hidroxilados (ácido 9-hidroxi-10,12-octadecadienóico, ácido 13-hidroxi-9,11-octadecadienóico; ácido 7,10-dihidroxi-8E-octadecenóico, ácido 9,10,13-tri-hidroxi-11-octadecenóico e ácido 9,12,13-tri-hidroxi-10-octadecenóico) contra fungos patogênicos.

5.2 Avaliação da toxicidade dos frutos de maracujá alho

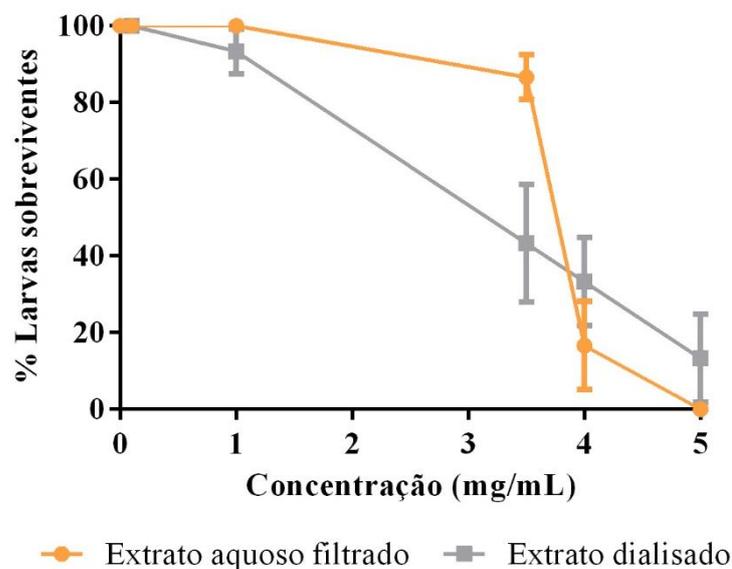
5.2.1 Toxicidade contra *artemia salina*

Artemia salina é um crustáceo de água salgada e desempenha um papel importante no fluxo de energia da cadeia alimentar neste ambiente. Tem sido amplamente utilizado em

bioensaios de laboratório para determinar a toxicidade através da estimativa da concentração letal média (CL_{50}), além de ser um método de avaliação simples, de baixo custo e não necessitar de aprovação do comitê de ética (MEYER *et al.*, 1982; PARRA *et al.*, 2001).

O efeito dos extratos liofilizados dos frutos de maracujá alho sobre a sobrevivência das larvas de *Artemia salina* são apresentados na Figura 8, tanto para material filtrado quanto para o dialisado. De acordo com Meyer *et al.* (1982), são considerados atóxicos os produtos que apresentam CL_{50} maior que a concentração de 1 mg/mL. Dessa forma, os extratos dos frutos de maracujá alho não apresentaram efeito citotóxico após o período de avaliação padrão do teste (24 h).

Figura 8 – Gráficos de sobrevivência das larvas de *Artemia salina* após 24 h de exposição a solução salina contendo diferentes concentrações do maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e extrato dialisado)



Resultados expressos em média \pm E.P.M. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

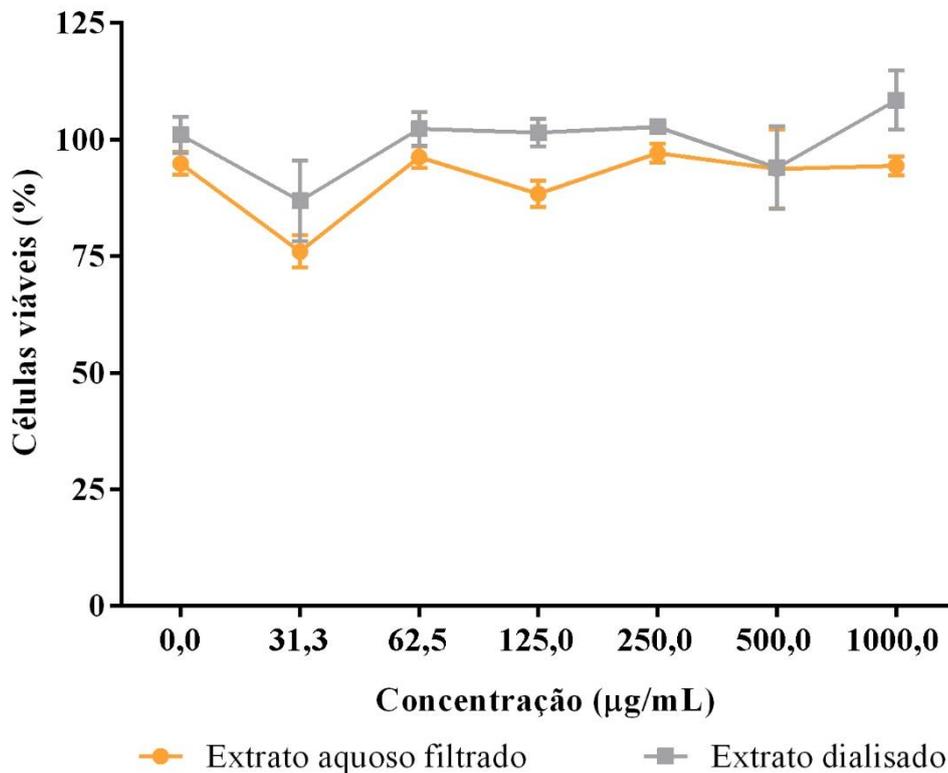
Baseando nos dados obtidos, pode-se verificar que a CL_{50} foi de $3,77 \pm 0,03$ mg/mL para o extrato aquoso filtrado e $3,27 \pm 0,58$ mg/mL para o extrato dialisado. Carvalho (2008) avaliando a citotoxicidade de extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas de *Passiflora nitida* frente à *A. salina* não observou efeito tóxico na concentração avaliada (1 mg/mL). Juzavil *et al.* (2015) obtiveram valores de CL_{50} de 749,89 μ g/mL para o extrato etanólico e maior que 1000 μ g/mL para os extratos aquoso e etanol-água (50:50) das folhas de *Passiflora foetida*. Bandara, Padumadasa e Peiris (2018) obteve valor de CL_{50} de $60,26 \pm 0,80$ μ g/mL para o

extrato aquoso e $309,02 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$ para o extrato metanólico das folhas de *Passiflora suberosa*, indicando atividade tóxica.

5.2.2 Citotoxicidade em fibroblastos

A Figura 9 e a Tabela 5 mostram o efeito dos extratos liofilizados dos frutos de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de fibroblastos determinado pelo teste do *Alamar Blue*. Os extratos dos frutos de maracujá alho não apresentaram efeitos tóxicos nas concentrações testadas para a linhagem de fibroblastos CCD 1059 SK, possuindo CL_{50} maior que $1000 \mu\text{g/mL}$. Também não houve diferença entre as concentrações de extratos de frutos de maracujá alho avaliadas ($p > 0,05$).

Figura 9 – Efeito das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de fibroblastos (linhagem CCD 1059 SK) determinado pelo teste do *Alamar Blue*



Resultados expressos em média \pm E.P.M. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Tabela 5 – Percentual de células viáveis das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) obtido pelo teste do *Alamar Blue*

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Percentual de células viáveis (%) | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | Extrato aquoso filtrado | Extrato dialisado |
| 0 | 94,92 \pm 2,46 | 101,05 \pm 3,91 |
| 31,25 | 78,65 \pm 3,28 | 93,07 \pm 8,54 |
| 62,5 | 96,25 \pm 2,31 | 102,32 \pm 3,57 |
| 125 | 88,38 \pm 2,76 | 101,52 \pm 2,98 |
| 250 | 97,13 \pm 2,00 | 102,73 \pm 1,26 |
| 500 | 101,13 \pm 5,80 | 101,49 \pm 6,56 |
| 1000 | 94,37 \pm 1,96 | 108,46 \pm 6,36 |

Resultados expressos em média \pm E.P.M.

5.2.3 Citotoxicidade em neutrófilos humanos

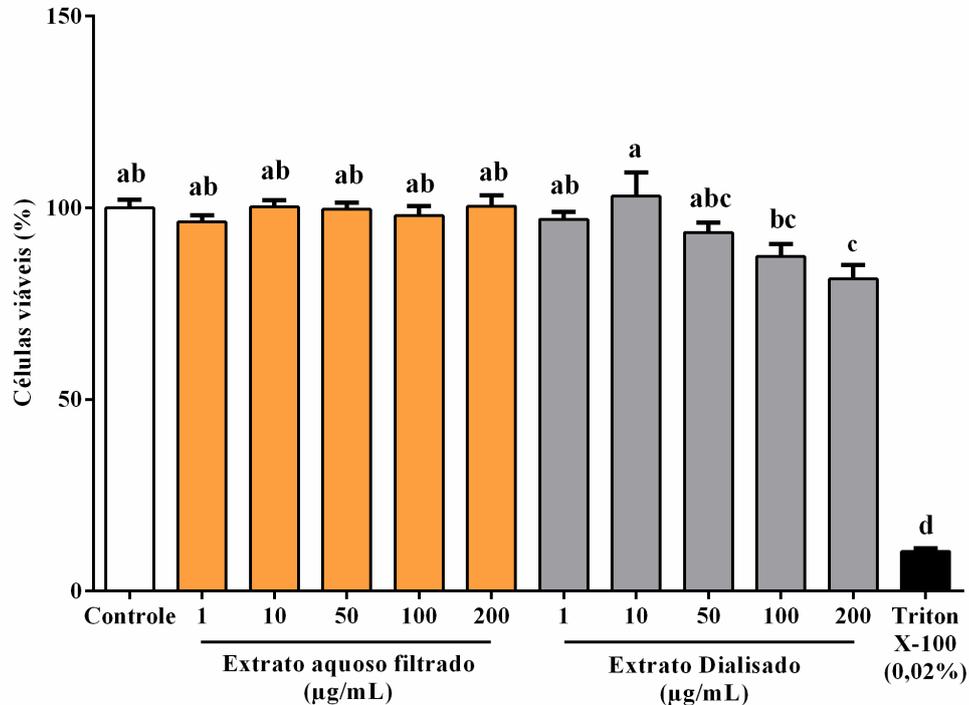
A Tabela 6 e a Figura 10 mostram o efeito dos frutos de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de neutrófilos humanos determinado pelo teste do MTT.

Tabela 6 – Percentual de células viáveis das diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado) obtido pelo teste do MTT

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Percentual de células viáveis (%) | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | Extrato aquoso filtrado | Extrato dialisado |
| 1 | 96,30 \pm 2,06 | 96,98 \pm 1,91 |
| 10 | 100,20 \pm 1,76 | 103,00 \pm 6,16 |
| 50 | 99,60 \pm 1,80 | 93,59 \pm 2,61 |
| 100 | 97,93 \pm 2,47 | 87,32 \pm 3,20 |
| 200 | 100,40 \pm 2,88 | 81,47 \pm 3,60 |

Resultados expressos em média \pm E.P.M.

Figura 10 – Efeito das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) sobre a viabilidade de neutrófilos humanos determinado pelo teste do MTT



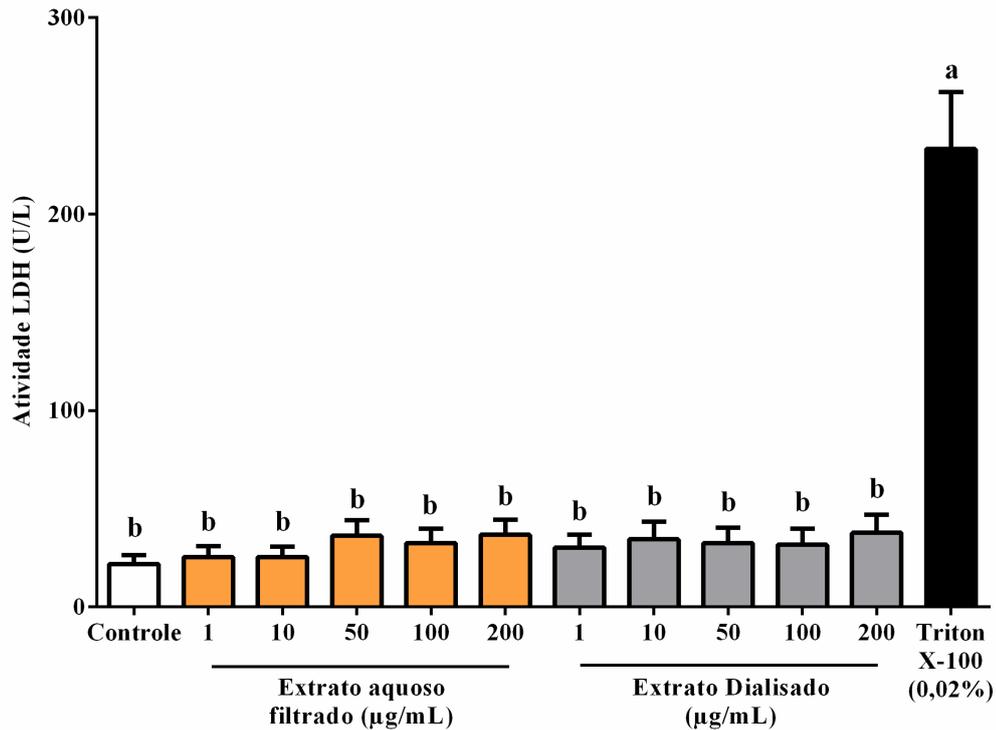
Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (ANOVA de uma via, seguida de Teste de Tukey). Resultados expressos em média \pm E.P.M. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

A adição desses extratos aos neutrófilos humanos não causou redução significativa na viabilidade celular quando comparada ao grupo controle (HBSS contendo 100% de células viáveis), exceto para o extrato dialisado (200 µg/mL). O extrato dialisado (200 µg/mL) apresentou menor viabilidade celular ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, extrato aquoso filtrado e dos extratos dialisados (1 e 10 µg/mL) e o extrato dialisado (100 µg/mL) apresentou menor viabilidade celular em relação ao extrato aquoso filtrado (10 µg/mL). Por outro lado, o Triton X-100 (0,2% v/v, padrão citotóxico) apresentou uma redução de $10,37 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$) na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle e aos extratos dos frutos de maracujá alho nas diferentes concentrações utilizadas.

A avaliação da citotoxicidade do maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) em neutrófilos humanos através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH) está apresentada na Figura 11 e na Tabela 7. A adição do extrato aquoso filtrado e do dialisado (1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL) não causaram aumento significativo da atividade da enzima LDH quando comparado com o grupo controle (HBSS contendo células não tratadas; $21,96 \pm 4,51$

U/L). Contudo, o tratamento dos neutrófilos com Triton X-100 (0,02% v/v, padrão citotóxico) aumentou significativamente a atividade da enzima LDH ($233,2 \pm 28,9$ U/L).

Figura 11 – Avaliação da citotoxicidade das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado e dialisado) em neutrófilos humanos através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH)



Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (ANOVA de uma via, seguida de Teste de Tukey). Resultados expressos em média \pm E.P.M. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 adaptado pela autora (2019).

Tabela 7 – Atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) frente as diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado e dialisado)

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Atividade da LDH (U/L) | |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------|
| | Extrato aquoso filtrado | Extrato dialisado |
| 1 | $25,48 \pm 5,40$ | $30,25 \pm 6,65$ |
| 10 | $25,48 \pm 5,25$ | $34,48 \pm 8,34$ |
| 50 | $36,21 \pm 8,08$ | $32,63 \pm 7,67$ |
| 100 | $32,63 \pm 7,33$ | $31,75 \pm 8,04$ |
| 200 | $36,81 \pm 7,60$ | $37,74 \pm 9,17$ |

Resultados expressos em média \pm E.P.M.

5.2.4 Toxicidade aguda e subcrônica *in vivo*

Nos ensaios de toxicidade aguda oral pôde-se observar que o extrato dos frutos de maracujá alho não provocou morte de nenhum dos animais, não sendo possível determinar a DL₅₀. Também não foram verificadas alterações ponderais dos animais durante o período de análise (Tabela 8). Além disso, não foram observadas alterações quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pêlos, estresse, salivação, olhos e comportamento dos animais. Sendo assim, verifica-se que não houve sinal de toxicidade do maracujá alho nas condições avaliadas, o que fornece subsídios para a realização de ensaios farmacológicos *in vivo*, permitindo a escolha de doses seguras em testes com animais (ratos e camundongos).

Tabela 8 – Peso corpóreo dos ratos *Wistar* antes (dia 0) e após 7 e 14 dias da administração oral de 300, 1000 e 2000 mg/kg de maracujá alho

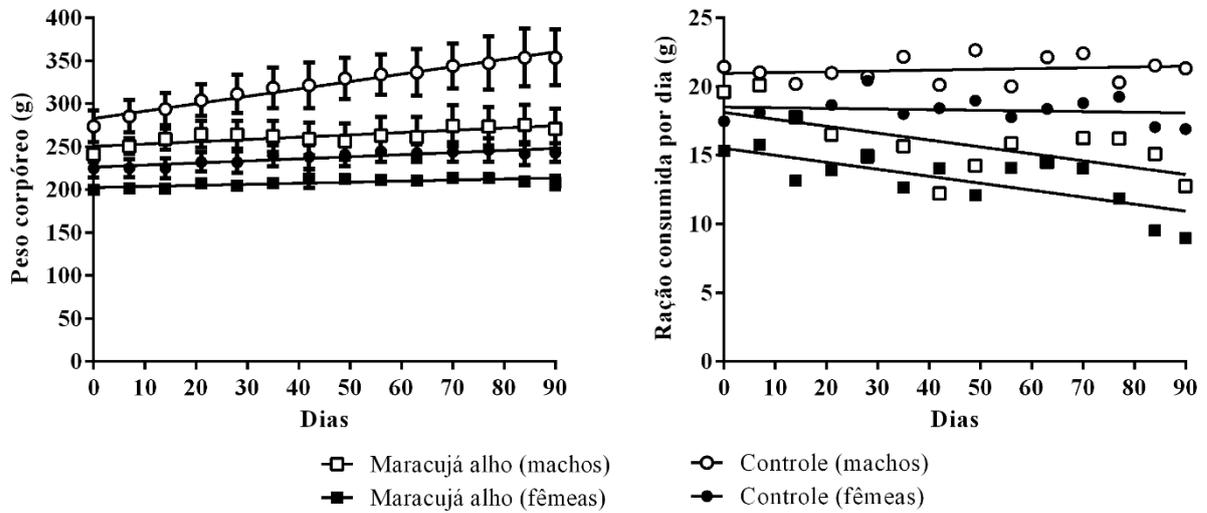
| Doses (mg/kg de peso corpóreo) | Peso (g) | | |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Dia 0 | Dia 7 | Dia 14 |
| 300 | 185,70 ± 18,23 | 188,00 ± 19,52 | 186,70 ± 17,01 |
| 1000 | 180,30 ± 12,06 | 179,70 ± 9,50 | 181,30 ± 4,73 |
| 2000 | 191,00 ± 10,00 | 194,70 ± 9,50 | 192,30 ± 13,05 |

Valores expressos por média ± D.P. (n = 3). Não houve diferença significativa entre as médias dos pesos corpóreos nos dias 0, 7 e 14 de cada dose, ao nível de 5% de significância.

O peso corporal tem um efeito importante no metabolismo do corpo, uma vez que uma diminuição no peso dos órgãos pode afetar as funções vitais do corpo (GOMES, 2017). A avaliação do peso dos órgãos é frequentemente utilizada em estudos de toxicidade para verificar se houve alterações nos órgãos e para confirmar os resultados bioquímicos e hematológicos (PARASURAMAN, 2011). Segundo Sellier *et al.* (2012), dois indicadores mais intuitivos e visíveis nas avaliações de toxicidade são a morbidade e a mortalidade. A toxidade sistêmica também pode ser identificada por meio das alterações relacionadas a massa relativa dos órgãos (LAPA *et al.*, 2010).

A Figura 12 e Tabela 9 mostram o peso corpóreo dos ratos *Wistar* dos grupos controle e maracujá ao longo do período de 90 dias de observação e o consumo de ração de cada grupo.

Figura 12 - Peso corpóreo e consumo de ração dos ratos *Wistar* (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho durante 90 dias de tratamento



Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Tabela 9 – Peso corpóreo médio dos ratos *Wistar* (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho durante 90 dias de tratamento

| Dias | Peso (g/100 g peso corpóreo) | | | |
|------|------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| | Machos | | Fêmeas | |
| | Maracujá alho | Controle | Maracujá alho | Controle |
| 0 | 240,83 ± 3,34 | 252,75 ± 22,23 | 198,67 ± 2,14 | 224,75 ± 5,30 |
| 7 | 250,50 ± 3,68 | 262,75 ± 23,85 | 199,83 ± 2,21 | 225,00 ± 5,29 |
| 14 | 259,00 ± 5,00 | 271,25 ± 23,65 | 199,33 ± 2,38 | 225,00 ± 5,74 |
| 21 | 264,50 ± 6,35 | 280,25 ± 24,90 | 205,33 ± 3,06 | 232,25 ± 5,57 |
| 28 | 264,17 ± 6,55 | 287,50 ± 25,50 | 202,33 ± 2,96 | 232,00 ± 6,23 |
| 35 | 262,17 ± 7,38 | 294,75 ± 25,80 | 205,67 ± 2,44 | 239,50 ± 6,18 |
| 42 | 258,83 ± 7,65 | 297,25 ± 26,40 | 209,67 ± 5,06 | 238,00 ± 6,89 |
| 49 | 256,17 ± 8,68 | 305,00 ± 26,26 | 208,83 ± 3,35 | 240,75 ± 6,70 |
| 56 | 263,00 ± 8,71 | 309,50 ± 26,31 | 208,00 ± 3,64 | 244,50 ± 6,29 |
| 63 | 260,83 ± 9,63 | 312,00 ± 26,73 | 206,83 ± 3,91 | 242,50 ± 5,17 |
| 70 | 274,33 ± 9,75 | 319,00 ± 27,16 | 210,33 ± 3,70 | 244,00 ± 5,70 |
| 77 | 273,50 ± 9,05 | 322,00 ± 28,02 | 211,00 ± 2,52 | 246,25 ± 6,74 |
| 84 | 275,50 ± 9,55 | 327,25 ± 29,75 | 206,83 ± 3,24 | 241,75 ± 6,66 |
| 90 | 270,83 ± 9,50 | 327,00 ± 29,75 | 205,67 ± 3,88 | 243,00 ± 5,55 |

Valores expressos por média ± E.P.M. (maracujá alho: n=6; controle: n=4).

Nos ensaios de toxicidade subcrônica verificou-se que não houve morte de nenhum dos animais (machos e fêmeas) durante o período de 90 dias de consumo de ração contendo maracujá alho (dose diária de 1000 mg/kg). Em relação aos aspectos clínicos, não foram observadas alterações nos animais. Através de análise de regressão linear, verificou-se que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso e no consumo alimentar entre os grupos ao final dos 90 dias de tratamento, observando-se um menor ganho de peso e um menor consumo de ração para os grupos tratados com maracujá alho. Isso pode ser justificado pela maior saciedade proporcionada pelo maior teor de fibra alimentar no maracujá alho, uma vez que este apresenta-se como uma fonte de fibra, já mostrado anteriormente. A rejeição da ração contendo maracujá alho seria um outro ponto a ser levado em consideração, porém ao observar o peso dos animais ao longo dos 90 dias de tratamento, verifica-se que não houve uma desnutrição (perda de peso) dos animais.

Na Tabela 10, verifica-se que não houve diferença significativa em relação ao peso dos órgãos dos grupos controle e maracujá alho, exceto para o fígado, onde o grupo controle (machos) apresentou maior peso para este órgão quando comparado com o grupo tratado com maracujá alho (machos), não diferindo estatisticamente dos demais grupos, isso pode ser devido ao maior ganho de peso corpóreo desse grupo.

Tabela 10 – Peso dos órgãos dos ratos *Wistar* (machos e fêmeas) dos grupos controle e maracujá alho após 90 dias da tratamento

| Órgãos | Peso (g/100 g peso corpóreo) | | | |
|---------|------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| | Machos | | Fêmeas | |
| | Maracujá alho | Controle | Maracujá alho | Controle |
| Coração | 0,33 ± 0,03a | 0,33 ± 0,03a | 0,35 ± 0,02a | 0,34 ± 0,02a |
| Pulmão | 0,44 ± 0,10a | 0,56 ± 0,11a | 0,49 ± 0,09a | 0,52 ± 0,05a |
| Rins | 0,86 ± 0,08a | 0,77 ± 0,07a | 0,78 ± 0,04a | 0,82 ± 0,05a |
| Fígado | 3,20 ± 0,16b | 3,60 ± 0,07a | 3,37 ± 0,11ab | 3,37 ± 0,09ab |
| Baço | 0,32 ± 0,04a | 0,32 ± 0,05a | 0,39 ± 0,07a | 0,38 ± 0,09a |

Valores expressos por média ± D.P. (n = 3). Valores acompanhados de letras iguais na mesma linha, não apresentam diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância (ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey).

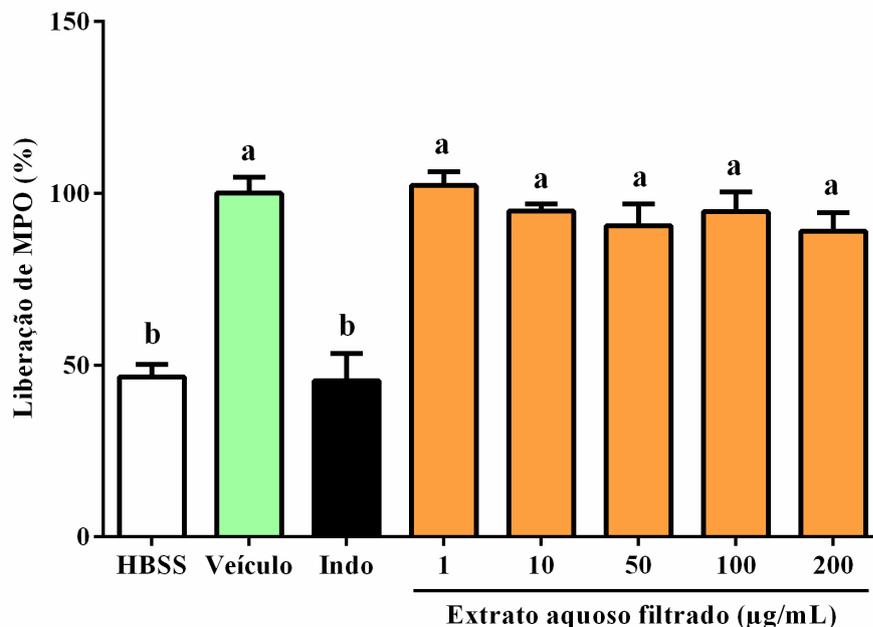
Com isso, verificou-se que não houve sinal de toxicidade subcrônica do maracujá alho nas condições avaliadas, o que fornece subsídios para a realização de ensaios farmacológicos *in vivo*, permitindo a escolha de doses seguras em testes com animais.

5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do maracujá alho em neutrófilos humanos

Realizado os ensaios de citotoxicidade em neutrófilos humanos, apenas o extrato aquoso filtrado de maracujá alho foi escolhido para avaliação do efeito anti-inflamatório, pois todas as concentrações desse extrato utilizadas apresentaram uma maior viabilidade celular pelo teste do MTT quando comparado com o extrato dialisado, o qual apresentou um menor percentual de células viáveis nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Sendo assim, não estariam possivelmente relacionados a uma ação citotóxica, uma vez que pareceram não provocar alterações no metabolismo mitocondrial e na permeabilidade plasmática.

O efeito das diferentes concentrações do extrato aquoso filtrado de maracujá alho sobre a desgranulação de neutrófilos humanos estão apresentados na Figura 13 e Tabela 11.

Figura 13 – Avaliação do efeito das diferentes concentrações de maracujá alho (extrato aquoso filtrado) sobre a desgranulação de neutrófilos humanos induzida por PMA determinada pela liberação da MPO



PMA: Forbol miristato acetato. MPO: Mieloperoxidase. HBSS: *Hanks balanced salt solution*. Indo: Indometacina. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (ANOVA de uma via, seguida de Teste de Tukey). Resultados expressos em média \pm E.P.M. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Tabela 11 – Percentual de liberação de MPO frente as diferentes concentrações de maracujá alho liofilizado (extrato aquoso filtrado)

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Liberação de MPO (%) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| | Extrato aquoso filtrado |
| 1 | 102,20 \pm 4,01 |
| 10 | 94,88 \pm 2,04 |
| 50 | 90,50 \pm 6,31 |
| 100 | 94,65 \pm 5,68 |
| 200 | 88,98 \pm 5,30 |

Resultados expressos em média \pm E.P.M. MPO: Mieloperoxidase.

A adição de PMA (0,1 μM) (grupo veículo) à suspensão de neutrófilos aumentou em cerca de duas vezes a liberação de MPO quando comparada às células não tratadas (grupo HBSS). No extrato aquoso filtrado de maracujá alho nas concentrações utilizadas (1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) o percentual de liberação de MPO não mostrou efeito comparável a droga padrão, indometacina, que apresentou liberação de MPO de 45,47 \pm 7,91%.

O PMA ativa a transdução de sinais no neutrófilo sem a necessidade de um receptor de membrana, agindo diretamente sobre a proteína quinase C, que é responsável por desencadear a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares, aumentando sua concentração no interior da célula e ocasionando a sua desgranulação (HU; LIU; SHEN, 2011; KARLSSON; NIXON; MCPHAIL, 2000).

A MPO está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e é a principal enzima liberada em resposta a processos anti-inflamatórios, infecciosos e isquêmicos, sendo considerada um marcador indireto da migração celular (KLEBANOFF, 2005; ARNHOLD, 2004).

Dessa forma, os resultados até então obtidos sugerem que o extrato aquoso filtrado de maracujá alho, nas concentrações utilizadas, não diminuiu o processo inflamatório, uma vez que não reduziu a desgranulação em neutrófilos induzida por PMA, mensurada pela liberação de MPO no meio. Extratos preparados a partir das folhas de *P. alata* e *P. edulis* foram capazes de inibir a atividade da MPO em 61 e 49%, respectivamente (VARGAS *et al.*, 2007) e extratos etanólicos e metanólicos da casca e da polpa destas espécies de *Passiflora* inibiram aproximadamente 50% (ZERAİK *et al.*, 2011). Essas diferenças nos resultados podem ser devido a diferenças no material analisado (folhas e frutos) e a forma de obtenção do extrato de maracujá alho que foi realizado apenas com água, possivelmente não extraindo uma quantidade

suficiente de compostos fenólicos que estariam relacionados com a atividade anti-inflamatória deste fruto, uma vez que os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados amplamente em plantas, apresentando efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (HAMINIUK *et al.*, 2012; JOSEPH, EDIRISINGHE, BURTON-FREEMAN, 2016).

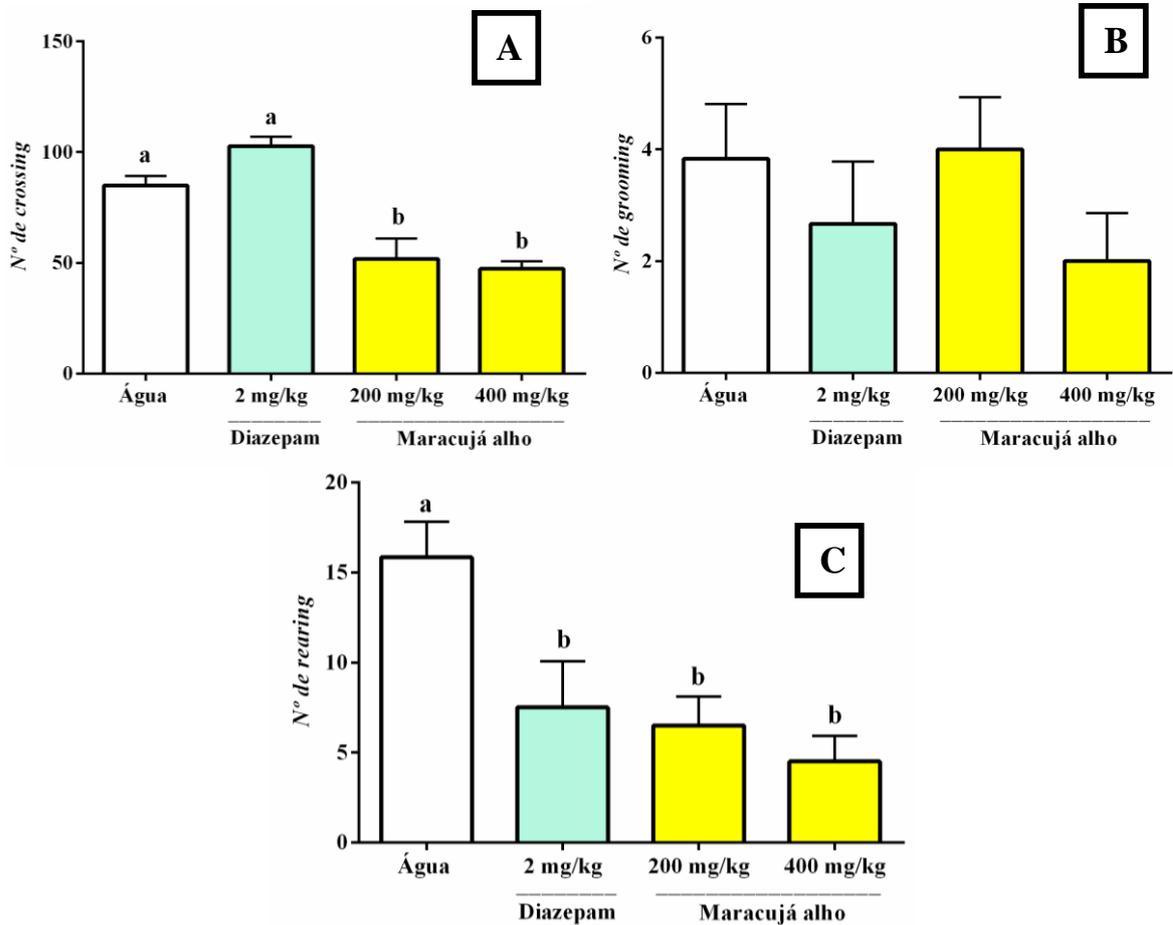
5.4 Avaliação do efeito do maracujá alho sobre o comportamento de camundongos

5.4.1 Avaliação da atividade locomotora

5.4.1.1 Teste do campo aberto

A Figura 14 mostra que o tratamento oral com maracujá alho alterou o comportamento dos camundongos no teste do campo aberto. Em relação ao parâmetro *crossing*, que se refere ao número de cruzamentos com as 4 patas entre as divisões do campo, verificou-se que as doses de maracujá alho 200 e 400 mg/kg não apresentaram diferenças significativas entre si ($51,83 \pm 9,25$ e $47,33 \pm 3,42$, respectivamente), porém diferiram em relação à água ($85,00 \pm 4,23$) e ao diazepam ($102,70 \pm 4,29$). A análise estatística para o comportamento de levantar (*rearing*) apresentou diferença significativa para as doses de maracujá alho 200 e 400 mg/kg ($6,50 \pm 1,61$ e $4,50 \pm 1,43$, respectivamente) e diazepam ($7,50 \pm 2,57$) em relação à água ($15,83 \pm 1,97$). Porém em relação ao parâmetro auto-limpeza (*grooming*), que se refere ao número de comportamentos de autolimpeza, avaliado no teste do Campo Aberto nenhuma diferença foi encontrada, apresentando valores médios de $3,83 \pm 0,98$, $2,67 \pm 1,12$, $4,00 \pm 0,93$ e $2,00 \pm 0,86$ para os grupos água, diazepam, maracujá alho 200 e 400 mg/kg, respectivamente.

Figura 14 – Comportamento dos camundongos no teste do campo aberto (A – *crossing*, B – *grooming* e C – *rearing*) após tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

O teste de campo aberto é amplamente utilizado como parâmetro de atividade locomotora e de ansiedade animal (STEIMER, 2011). Segundo Lamprea *et al.* (2008) esse modelo se baseia na aversão dos ratos a espaços abertos e pelo comportamento de tigmotaxia (tendência do animal em andar próximo as paredes). Os tratamentos com ansiolíticos não aumentam a exploração do campo, mas diminui o estresse induzido no comportamento de exploração e de tigmotaxia (PRUT; BELZUNG, 2003; VILELA; SONCINI; PAIVA, 2009). Outra função desse modelo seria avaliar a atividade exploratória dos animais por meio dos seguintes parâmetros: número de cruzamentos totais, número de levantadas e tempo de imobilidade indicando alteração na atividade motora espontânea; e o número de bolos fecais, indicando alteração na emocionalidade do animal (HAN *et al.*, 2009).

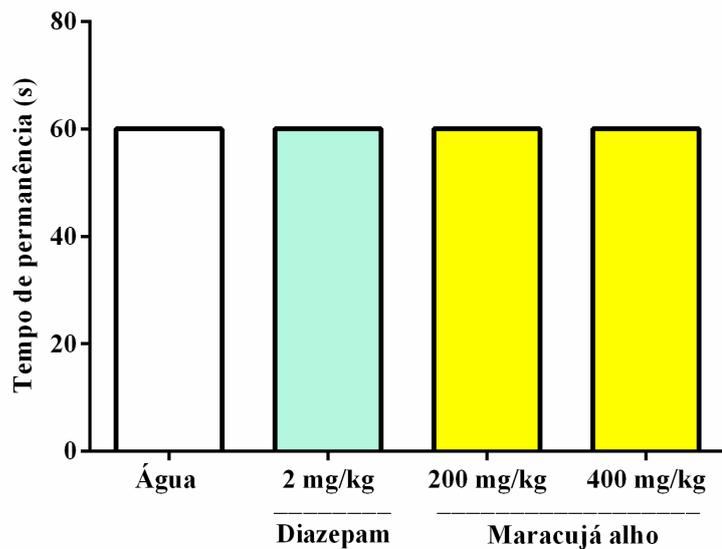
Dessa forma, os resultados obtidos no teste do campo aberto confirmam uma diminuição da atividade locomotora dos camundongos tratados com maracujá alho, relacionando-a com uma atividade sedativa.

Resultado semelhante foi encontrado por Figueiredo (2013) estudando as propriedades sedativas e ansiolíticas da *Passiflora edulis*, verificou que o tratamento de 30 dias com a farinha do albedo associada ao flavedo (130 mg/kg) causou uma diminuição na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Lutomski, Malek e Rybacka (1975) verificaram efeito tranquilizante por via oral de sucos de frutos de *P. edulis*, com diminuição significativa da movimentação espontânea dos animais, atribuindo à presença de pequenas quantidades de alcaloides harmônicos e de flavonóides.

5.4.1.2 Teste do rota rod

A Figura 15 mostra os resultados obtidos no teste do *rota rod*. Pode-se verificar que os grupos tratados com água, diazepam e maracujá alho (200 e 400 mg/kg) não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) no tempo de permanência do aparelho *rota rod*.

Figura 15 – Comportamento dos camundongos no teste do *rota rod* após tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Segundo Lopes *et al.* (2014), o teste do *rota rod* é utilizado para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio. É um dos mais utilizados para medir função motora nos roedores, por ser considerado um dos mais sensíveis para isso. Muitas vezes um possível efeito relaxante muscular é observado pelos fármacos clássicos ansiolíticos-sedativos (FARKAS *et al.*, 2005). Dessa forma, observou-se que o tratamento com maracujá alho não resultou na alteração da coordenação motora e equilíbrio dos camundongos durante o tempo de observação no aparelho *rota rod*, confirmando que a redução da atividade locomotora no teste do campo aberto estaria relacionada com uma atividade sedativa, não causando um relaxante muscular.

Resultados semelhantes foram encontrados por Figueiredo *et al.* (2016) estudando os efeitos da ingestão da farinha da casca de maracujá (*P. edulis*), observou que não houve alteração no desempenho dos animais no aparelho *rota rod*, indicando que a farinha de casca de *P. edulis* não causou um relaxamento muscular em animais.

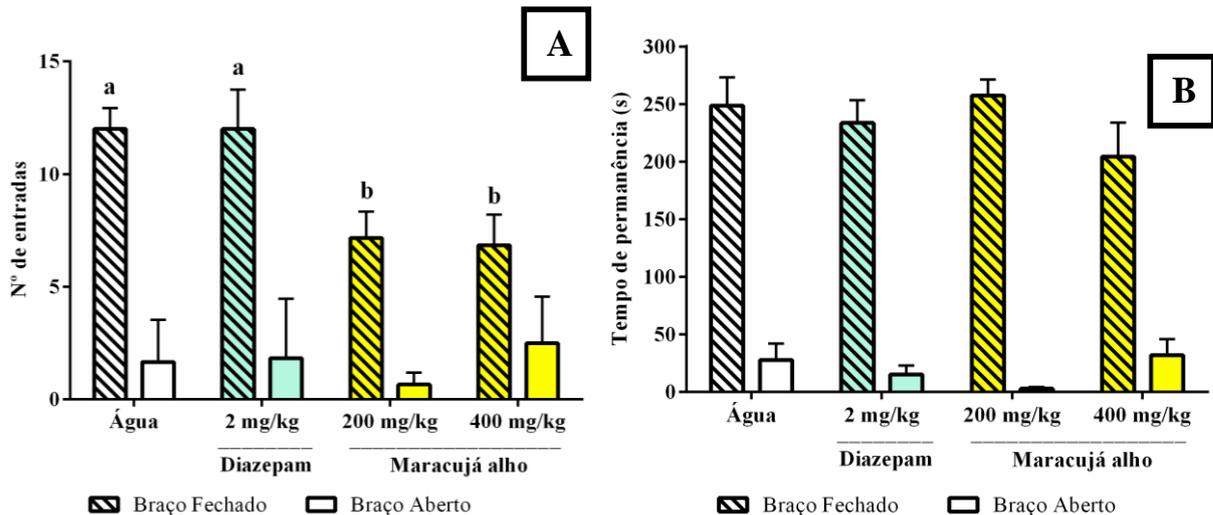
5.4.2 Avaliação da atividade ansiolítica

5.4.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

De acordo com Martinez, Garcia e Morato (2005), o labirinto em cruz elevado é um teste validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental como modelo de ansiedade em roedores. Um aumento significativo do número de entradas no braço aberto sem, todavia, alterar o número de entradas nos braços fechados e a diminuição do tempo de permanência nos braços fechados nesse teste é um fator indicativo de efeito ansiolítico (BUENO, 2005).

A Figura 16 mostra os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado para os tratamentos com água, diazepam e maracujá alho. Pode-se verificar que os animais tratados com maracujá alho (200 e 400 mg/kg) apresentaram menor frequência de entrada nos braços fechados ($7,17 \pm 1,17$ e $6,83 \pm 1,38$, respectivamente), apresentando diferença significativa em relação ao grupo água e diazepam ($12,00 \pm 0,93$ e $14,00 \pm 2,46$, respectivamente). Observou-se que o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos e fechados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Figura 16 – Comportamento dos camundongos no teste do labirinto em cruz elevado (A – frequência de entrada, B – tempo de permanência nos braços abertos e fechados) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Verifica-se que a administração oral do maracujá alho nas doses avaliadas não causou uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados e um aumento na frequência de entrada nos braços abertos. Porém, vale ressaltar que houve uma diminuição significativa na frequência de entrada nos braços fechados nesse teste, observando uma tendência ao efeito ansiolítico do maracujá alho.

Li *et al.* (2011) estudando extratos etanólicos de folhas de *P. edulis*, verificaram um aumento significativo no percentual de entrada nos braços abertos e uma diminuição de entradas na entrada nos braços fechados, sugerindo um efeito sedativo. Figueiredo *et al.* (2016) analisando farinha da casca de maracujá (*P. edulis*), não observaram diferença estatística no número de entradas de animais nos braços abertos e fechados e no tempo gasto em braços fechados. No entanto, os animais tratados com farinha de alho associada ao flavedo tiveram maior tempo gasto nos braços abertos do aparelho.

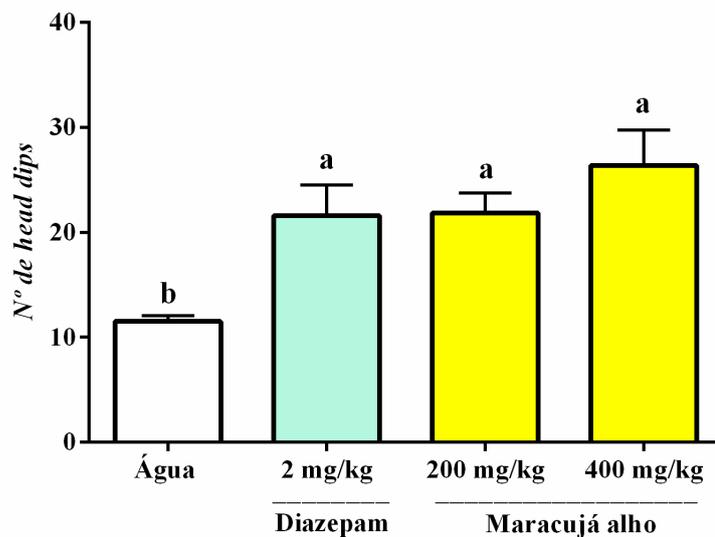
5.4.2.2 Teste da placa perfurada

O teste da placa perfurada foi realizado para verificar o potencial ansiolítico do maracujá alho através do comportamento exploratório dos camundongos. Esse modelo indica que o comportamento de *head dipping* é sensível a mudanças no estado emocional do animal e

sugere a expressão do estado ansiolítico em animais pode ser refletida por um aumento no comportamento de *head dipping* (BARUA *et al.*, 2009; TAKEDA, TSUJI e MATSUMIYA, 1998).

Os resultados obtidos no teste da placa perfurada são mostrados na Figura 17. Observou-se que o tratamento com maracujá alho (200 e 400 mg/kg) e diazepam aumentaram significativamente o número de vezes que o animal coloca a cabeça nos orifícios (*head dips*), apresentando valores médios de $21,83 \pm 1,89$, $26,33 \pm 3,40$, $20,50 \pm 2,59$ respectivamente, em relação a água ($11,50 \pm 0,56$).

Figura 17 – Comportamento dos camundongos no teste da placa perfurada após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Os dados obtidos nesse experimento forneceram evidências de que o maracujá alho nas doses de 200 e 400 mg/kg apresentaram atividade ansiolítica, pois foi observado um aumento no comportamento de *head dips*.

Estudos realizados por diversos autores, sugerem que os flavonóides presentes no maracujá podem ser parcialmente responsáveis pela atividade ansiolítica e/ou sedativa de muitas espécies do gênero *Passiflora* (COLETA *et al.*, 2006; SENA *et al.*, 2009; ZUCOLOTTO *et al.*, 2012). Lolli *et al.* (2007) demonstraram que a atividade ansiolítica de extratos de folhas

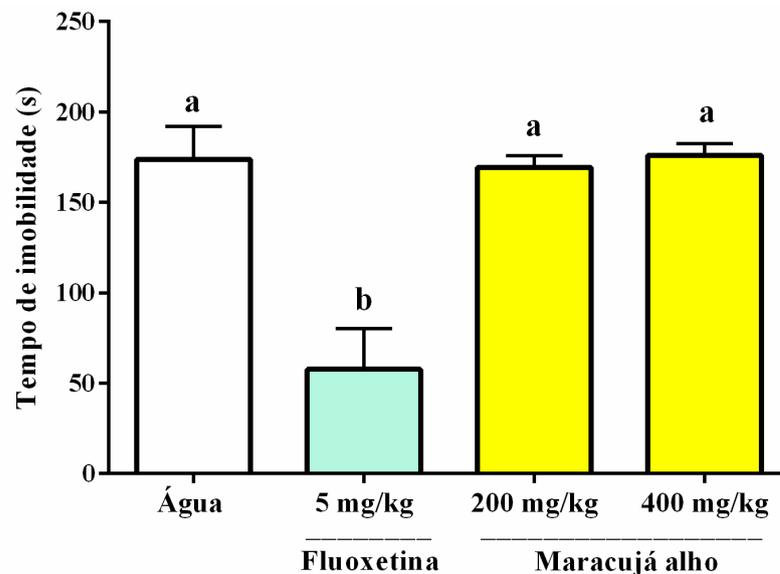
de *Passiflora actinia* pode ser atribuída a interação das benzodiazepinas nos receptores GABA_A.

5.4.3 Avaliação da atividade antidepressiva

5.4.3.1 Teste do nado forçado

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos no teste do nado forçado para os tratamentos com água, fluoxetina e maracujá alho.

Figura 18 – Comportamento dos camundongos no teste do nado forçado após o tratamento com maracujá alho, água e fluoxetina



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Pode-se observar que o tratamento com fluoxetina ($57,67 \pm 22,41$ s) apresentou um menor tempo de imobilidade quando comparado com os grupos água ($173,8 \pm 18,22$ s) e maracujá alho 200 e 400 mg/kg ($169,30 \pm 6,39$ s e $176,00 \pm 6,61$ s, respectivamente) (FIGURA 18). Como não foram observadas alterações significativas no tempo de imobilidade para o tratamento com maracujá alho nas doses de 200 e 400 mg/kg em relação ao grupo água, verifica-se que o maracujá alho não apresentou uma atividade antidepressiva.

O teste do nado forçado é um modelo animal utilizado para reproduzir aspectos relevantes da depressão humana nas espécies de roedores. Nesse teste, os animais que mostram níveis elevados de imobilidade correspondem a um estado patológico de sujeitos deprimidos, o que pode ser explorado pela pesquisa pré-clínica da depressão, além disso, pode ser usado como um modelo para as avaliações dos antidepressivos (EL-BATSH, 2015). Drogas com ação antidepressiva geralmente são capazes de prolongar o tempo em que o animal apresenta comportamento de fuga, sendo inversamente proporcional ao tempo de imobilidade (BUCCAFUSCO, 2009).

Wang *et al.* (2013) analisando diferentes frações de extratos de folhas e caules de *P. edulis*, verificou que duas frações reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, exibindo um efeito do tipo antidepressivo.

5.4.4 Avaliação da atividade sedativa/hipnótica

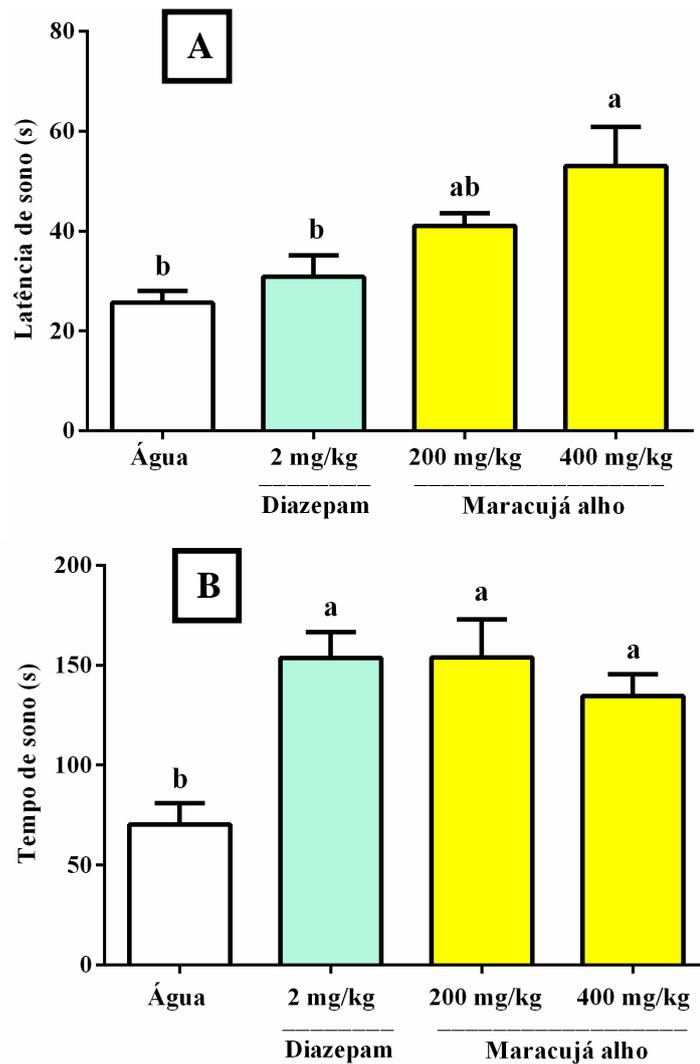
5.4.4.1 Teste do tempo de sono induzido por éter etílico

O teste do sono induzido por pentobarbital sódico (barbitúrico) é o mais utilizado na avaliação da atividade sedativa. Todavia, neste estudo, optou-se pela utilização do éter etílico como agente indutor do sono, pois segundo Vieira (2001) os barbitúricos normalmente são indutores do citocromo P450 hepático e das enzimas de conjugação e quaisquer outras substâncias metabolizadas pelo sistema citocromo P450 podem interagir farmacocineticamente, alterando os resultados obtidos. Com isso, dá-se preferência a utilização de um agente indutor de sono que não seja metabolizado pelo fígado, por exemplo, o éter etílico, uma vez que se trata da avaliação de uma mistura complexa como é o caso dos vegetais (GAZOLA, 2014). De acordo com o mesmo autor, substâncias depressoras do SNC geralmente aumentam o tempo de duração do sono por outros agentes depressores, como o pentobarbital e o éter.

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos no teste do tempo de sono induzido por éter etílico para os tratamentos com água, diazepam e maracujá alho. Verifica-se que o tratamento com maracujá alho na dose de 400 mg/kg ($53,00 \pm 7,83$ s) aumentou a latência do sono, ou seja, os animais tratados com maracujá alho nessa dose demoraram mais tempo para perder o reflexo postural em comparação aos grupos: água ($25,67 \pm 2,35$ s), diazepam ($30,83 \pm 4,32$ s) e maracujá 200 mg/kg ($41,00 \pm 2,58$ s). Em relação ao tempo de sono, a análise estatística mostrou diferença significativa para os tratamentos com maracujá alho nas doses de 200 e 400 mg/kg ($153,80 \pm 19,19$ s e $134,7 \pm 10,75$ s, respectivamente) e diazepam ($153,50 \pm$

13,19 s), apresentando maior tempo de duração de sono em relação ao grupo água ($70,33 \pm 10,63$ s).

Figura 19 – Comportamento dos camundongos no teste do tempo de sono induzido por éter etílico (A – latência do sono, B – tempo de duração do sono) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que o maracujá alho aumentou a duração do sono induzido por éter etílico, indicando uma ação depressora do sistema nervoso central e atividade sedativa.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gazola (2014) estudando folhas secas em estufa à 40°C e frutos liofilizados de diferentes espécies de maracujá, verificou que o pericarpo de *P. alata* (600 mg/kg), as folhas de *P. edulis* (600 mg/kg), a polpa de *P. ligularis* (100 e 300 mg/kg), as folhas de *P. manicata* (100 mg/kg), o pericarpo (100 e 300 mg/kg) e as folhas (60 mg/kg) de *P. quadrangularis* aumentaram o tempo de duração do sono dos animais quando comparado ao controle (água). Costa (2009) ao analisar *P. edulis* (polpa + semente liofilizada), observou que o tratamento com 300 mg/kg aumentou a latência do sono e os tratamentos com 50, 100 e 300 mg/kg de *P. edulis* não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (água) para o tempo de sono. Gazola *et al.* (2011) analisando extrato aquoso do pericarpo de *P. quadrangularis* (100 e 300 mg/kg) também mostrou um aumento na duração do sono no teste de hipnose induzida por éter etílico em camundongos, atribuindo essa ação sedativa a presença do composto apigenina. Além disso, os mesmos autores supõem que essa atividade sedativa da apigenina pode ser devido a um aumento do sistema GABAérgico.

5.4.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante

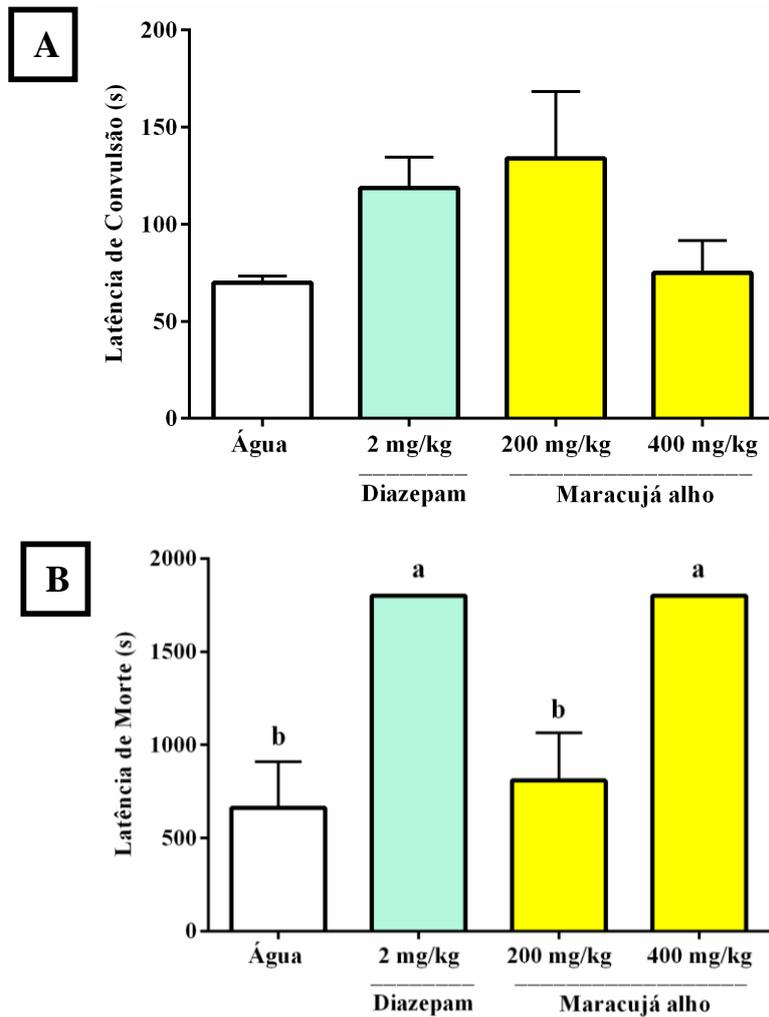
5.4.5.1 Convulsão induzida por pentilenotetrazol

O pentilenotetrazol é um antagonista do receptor GABA_A capaz de causar tanto crises tônico-clônicas como mioclônicas e, a indução de convulsões por esta substância tem demonstrado a propensão de potencializar o estresse oxidativo (BRANCO *et al.*, 2013; KUMAR; LALITHA; MISHRA, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2012), sendo um dos principais indutores de convulsão utilizados na triagem pré-clínica de substâncias com propriedades anticonvulsivantes (QUINTANS-JÚNIOR; MELLO, 2006; SMITH; WILCOX; WHITE, 2007). Segundo Praveen *et al.* (2013), o diazepam funciona como agente anticonvulsivante, apresentando capacidade de facilitar a abertura dos canais para cloreto GABA_A, inibindo as convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

Na Figura 20, demonstra-se que não houve diferença significativa entre os grupos no tempo de manifestação da primeira convulsão do tipo clônica ou tônico-clônica (latência de convulsão). Foi verificado que os animais começaram a convulsionar após 70,00 ± 3,38 s (água), 99,00 ± 23,62 s (diazepam), 134,00 ± 34,33 s (maracujá alho 200 mg/kg) e 75,00 ± 16,59 s (maracujá alho 400 mg/kg) da administração do pentilenotetrazol. Em relação à latência de morte, observou-se que os tratamentos com maracujá alho na dose de 400 mg/kg (1800,00 ± 0,00 s) e diazepam (1800,00 ± 0,00 s) aumentaram a latência de morte, diferindo

estatisticamente dos grupos água ($663,20 \pm 246,00$ s) e maracujá na dose 200 mg/kg ($808,80 \pm 255,10$ s). O percentual de sobrevivência dos animais tratados com maracujá alho (400 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg) foi de 100%.

Figura 20 – Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn's (A) e por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey (B). Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Baseando-se nos resultados obtidos, não houve diferença significativa entre os animais tratados com maracujá alho (400 mg/kg) e diazepam (2 mg/kg), indicando que o

maracujá alho nessa dose foi eficiente como protetor das convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

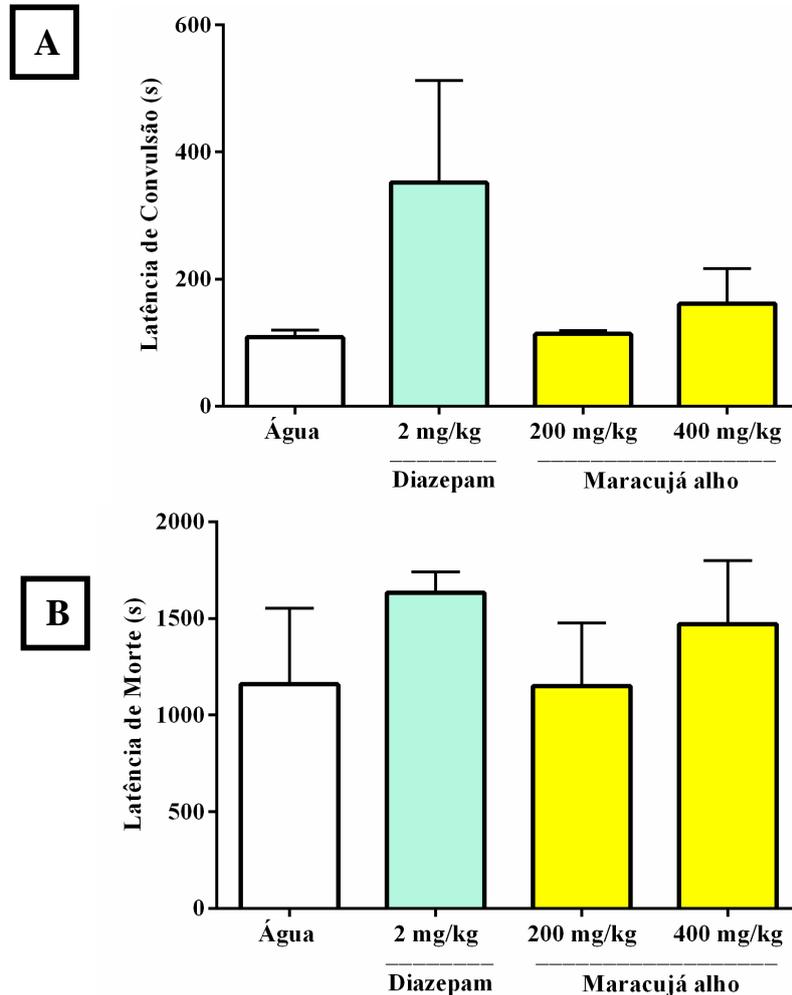
Pavan *et al.* (2009) avaliando a atividade de extratos de folhas de *P. foetida* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, observaram que a dose de 300 mg/kg exerceu um efeito protetor das convulsões induzidas por pentilenotetrazol, não causando a morte dos animais. Elsas *et al.* (2010) estudando o efeito anticonvulsivante de extratos liofilizados de *P. incarnata* nas doses de 1000 mg/kg, verificaram que o tratamento de 7 dias em dois dos cinco extratos avaliados reduziu a frequência e severidade das convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Esses estudos mostram a eficácia de extratos de *Passiflora* e frações de compostos flavonoides contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol em modelo experimental animal. Os flavonóides se ligam com alta afinidade ao sítio da benzodiazepina do receptor GABA_A (MEDINA *et al.*, 1997; MARDER; PALADINI, 2002).

5.4.5.2 Convulsão induzida por cafeína

Conforme Swiader e Wielosz (2011), a cafeína é uma metilxantina natural que estimula a secreção de neurotransmissores no sistema nervoso central, podendo apresentar efeitos colaterais como nervosismo, ansiedade, arritmia cardíaca e convulsões em altas doses. Segundo Chu (1981), a cafeína influencia a excitabilidade cerebral e desencadeia convulsões seguidas por encefalopatia em ratos. Sua estrutura molecular é semelhante à adenosina, e é um antagonista misto de receptor de adenosina A₁ e A_{2A} (KOERT *et al.*, 2018), aumenta a liberação de dopamina e glutamato e inibe o GABA (BORYCZ *et al.*, 2007; SOLINAS *et al.*, 2002).

A Figura 21 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos para a latência de convulsão e latência de morte. Os animais começaram a convulsionar após $108,50 \pm 11,52$ s (água), $351,7 \pm 160,50$ s (diazepam), $113,70 \pm 5,05$ s (maracujá alho 200 mg/kg) e $161,20 \pm 55,45$ s (maracujá alho 400 mg/kg) da administração de cafeína. Na latência de morte, apresentaram valores médios de $977,70 \pm 368,30$ s (água), diazepam ($1374,00 \pm 273,70$ s), maracujá na dose 200 mg/kg ($971,30 \pm 321,60$ s) e na dose de 400 mg/kg ($1247,00 \pm 349,60$ s) (FIGURA 21).

Figura 21 – Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por cafeína (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por Kruskal Wallis, seguida de teste de Dunn's. Não houve diferença estatística ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

Com base nos resultados obtidos, o maracujá alho nas doses avaliadas não apresentou atividade anticonvulsivante no modelo de convulsão induzida por cafeína, uma vez que não houve uma redução da severidade das convulsões, o que ocasionou a morte dos animais.

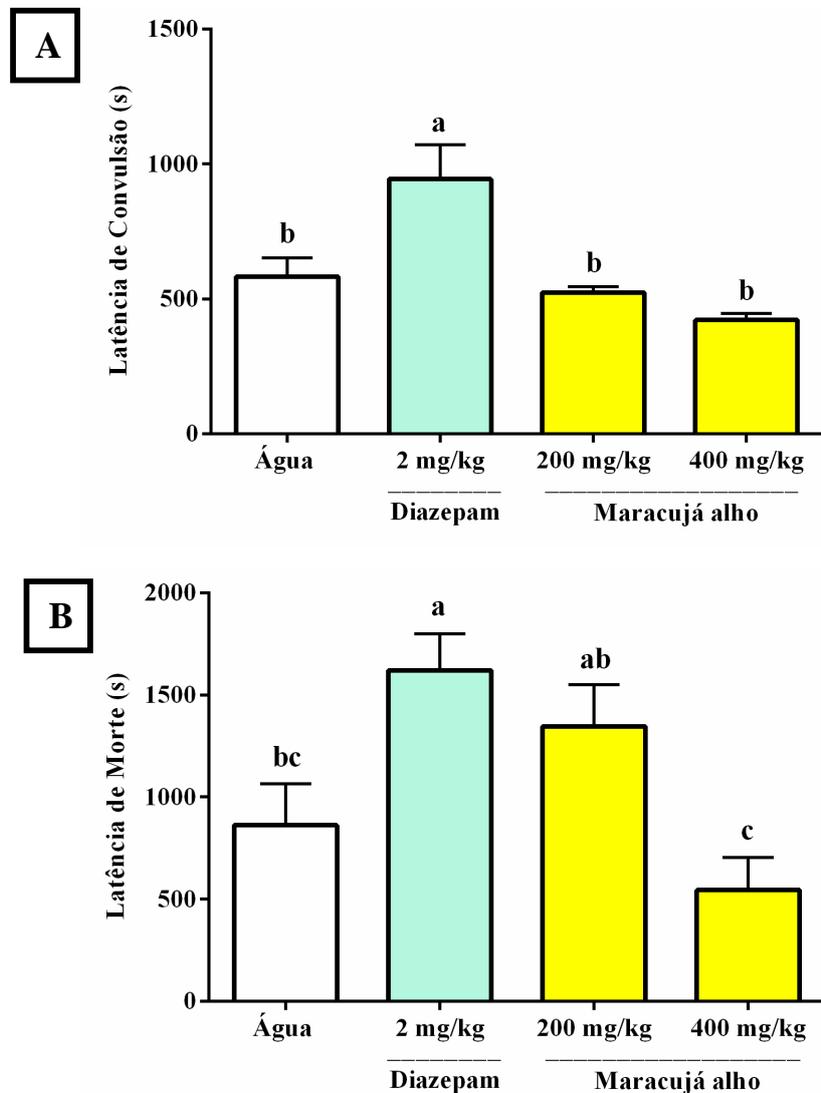
5.4.5.3 Convulsão induzida por picrotoxina

A picrotoxina é um outro agente quimioconvulsivo que tem sido utilizado em modelos de convulsão animal. Assim como o pentilenotetrazol, é também um antagonista não-

competitivo do receptor GABA_A para a ação agonística no canal de cloreto do receptor GABA, atuando como um bloqueador ou modulador de canais, o que causa o efeito convulsivante (LASON; CHLEBICKA; REJDAK, 2013). A picrotoxina produz uma convulsão tônico-clônica generalizada que leva à morte do animal na maioria dos casos (HEIDARI *et al.*, 2006).

A Figura 22 mostra o comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por picrotoxina após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam.

Figura 22 – Comportamento dos camundongos no teste de convulsão induzida por picrotoxina (A – latência de convulsão, B – latência de morte) após o tratamento com maracujá alho, água e diazepam



Resultados expressos em média \pm E.P.M ($n=6$ /grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

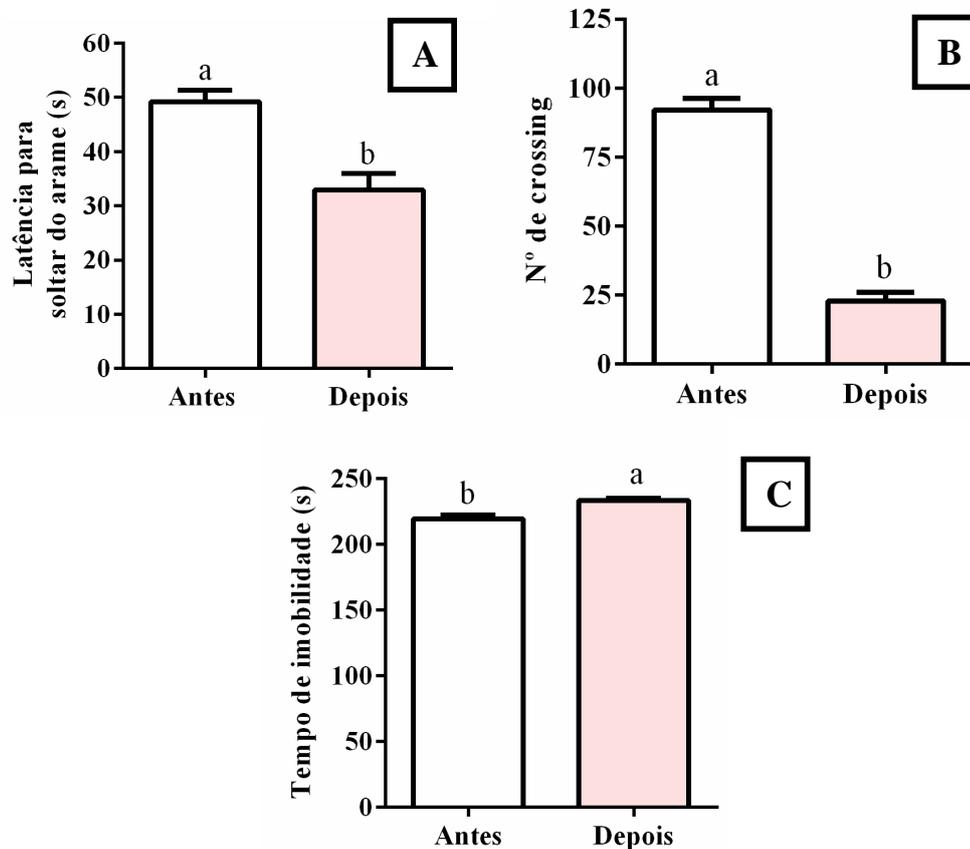
O tratamento com maracujá alho na dose de 400 mg/kg apresentou menores valores e diferiu estatisticamente quando comparado com o grupo diazepam, tanto para a latência de convulsão quanto para a latência de morte (FIGURA 22). Os animais começaram a convulsionar após $582,70 \pm 68,70$ s (água), $943,50 \pm 128,60$ s (diazepam), $523,30 \pm 21,44$ s (maracujá alho 200 mg/kg) e $421,30 \pm 24,57$ s (maracujá alho 400 mg/kg) da administração da picrotoxina. Para a latência de morte, apresentaram valores médios de $862,50 \pm 201,20$ s (água), diazepam ($1620,00 \pm 180,30$ s), maracujá na dose 200 mg/kg ($1346,00 \pm 205,60$ s) e na dose de 400 mg/kg ($544,70 \pm 159,40$ s). Com base nos resultados obtidos, o maracujá alho nas doses avaliadas não apresentou atividade anticonvulsivante no modelo de convulsão induzida por picrotoxina.

5.5 Avaliação do efeito do maracujá alho no modelo de parkinsonismo em ratos

Segundo Tieu (2011), a rotenona é um pesticida de natureza lipofílica e atravessa a barreira hematoencefálica sem qualquer transporte, afetando todas as regiões do cérebro e causando neurotoxicidade. Atua na destruição de neurônios dopaminérgicos, levando a depleção do neurotransmissor dopamina e aparência dos sintomas parkinsonianos em ratos (ALAM; SCHMIDT, 2002). Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatem o uso de *Passifloras* em modelos animais da Doença de *Parkinson*, porém existem diversos trabalhos na literatura que utilizaram a rotenona como modelo de indução dessa doença em ratos, sendo encontrados estudos com flores de *Sambucus caerulea* (JACQUET *et al.*, 2017), caule de *Schinus terebinthifolius* (SERENIKI *et al.*, 2016), flores de *Camelia japonica* (YANG *et al.*, 2016), frutos de *Forsythia suspense* (ZHANG *et al.*, 2016), pseudofruto de *Anacardium occidentale* (LINARD, 2014), caule de *Vitis amurensis* (RYU *et al.*, 2013), dentre outros.

A Figura 23 apresenta os resultados obtidos na avaliação comportamental dos animais antes e depois de 20 dias de administração de rotenona (3 mg/kg), nos testes da corda para força de prensão, campo aberto e nado forçado. Observou-se uma diminuição significativa na latência para soltar o arame (teste da corda para força de prensão) de $49,13 \pm 2,14$ para $32,92 \pm 3,09$ s e na frequência do número de cruzamentos (teste do campo aberto) de $92,16 \pm 4,08$ a $22,89 \pm 3,06$ ($p < 0,05$), e no teste de natação forçada foi verificado um aumento de $219,2 \pm 3,02$ para $233,5 \pm 1,56$ s ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade (FIGURA 23). Estes resultados mostram a eficiência na indução dos sintomas de parkinsonismo com a administração de rotenona, uma vez que houve uma alteração no comportamento natural e coordenação motora dos animais.

Figura 23 – Resultados dos testes comportamentais (A - teste da corda para força de preensão, B - campo aberto, C - nado forçado) antes e depois de 20 dias de administração de rotenona



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=40/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

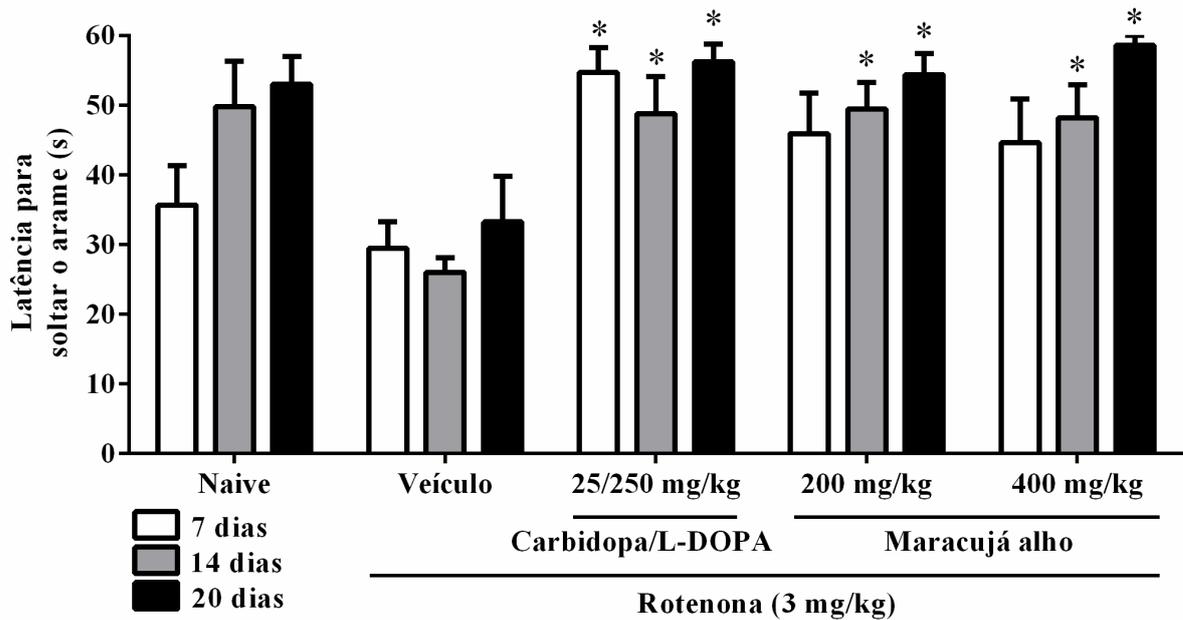
Em estudo realizado por Sharma, Kumar e Deshmukh (2018), verificaram que a administração de rotenona em ratos diminuiu significativamente a coordenação motora, sendo confirmado pela movimentação no teste de campo aberto, *rota rod* e força de preensão. Sharma e Nehru (2013) também observaram comprometimento em parâmetros comportamentais, verificando uma diminuição na atividade locomotora e aumento na rigidez (catalepsia).

5.5.1 Teste da corda para força de preensão (*String test for grip strength*)

A Figura 24 mostra os resultados obtidos no teste de corda para força de preensão após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho (200 e 400 mg/kg), veículo (água) e carbidopa/L-DOPA (25/250 mg/kg) em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona. Após 14 e 20 dias dos tratamentos, pode verificar que as doses de 200 e 400 mg/kg de maracujá

alho (14 dias: $49,44 \pm 3,85$ s e $48,22 \pm 4,74$; 21 dias: $54,40 \pm 3,02$ e $58,60 \pm 1,40$, respectivamente) aumentaram significativamente a latência para soltar o arame ($p < 0,05$) em comparação com o grupo veículo (14 dias: $26,00 \pm 2,13$; 21 dias: $33,35 \pm 6,56$ s).

Figura 24 – Resultados do teste da corda para força de prensão após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona



Resultados expressos em média \pm E.P.M (grupo naive: $n=6$; demais grupos: $n=10$ /grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. 7, 14 e 21 dias: $*p < 0,05$ versus veículo. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

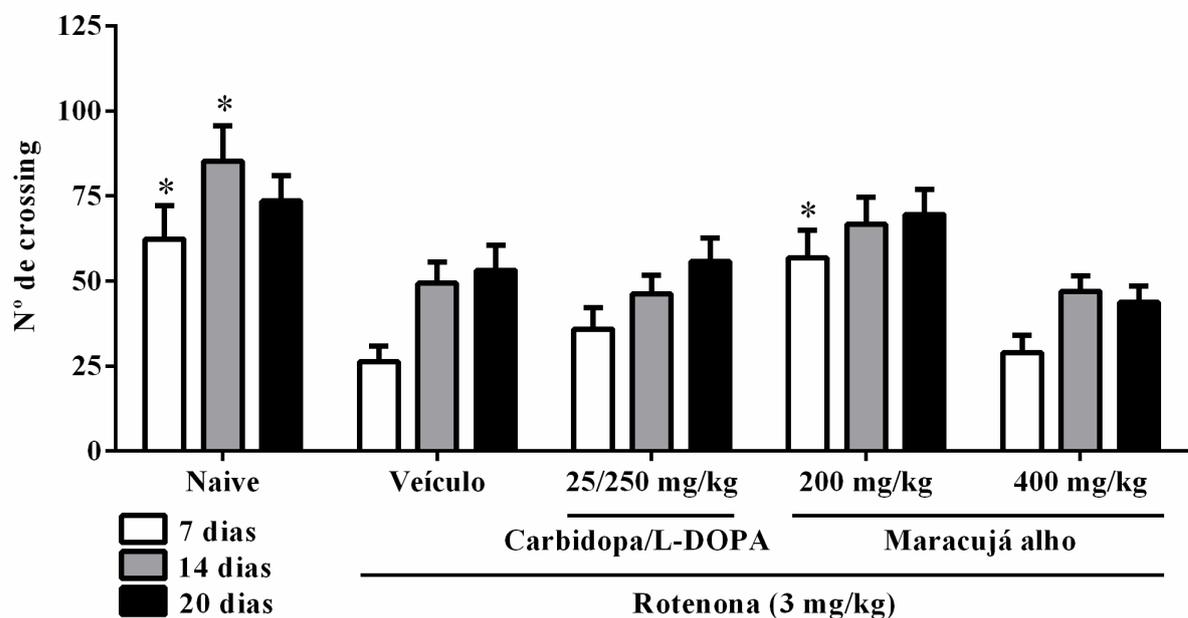
O teste da corda considera o período de tempo para manter o aperto em um fio como a medida indireta da força de prensão (SHALABY *et al.*, 2018). A redução da latência na perda da prensão é um indicativo de comprometimento da força muscular e capacidade de agarrar e segurar objetos (WELCH *et al.*, 2013; TARIQ *et al.*, 2005).

Com isso, pode-se verificar que o tratamento com rotenona promoveu uma diminuição da força muscular dos animais, sendo observado através do grupo veículo. Por outro lado, observou-se que os tratamentos com carbidopa/L-DOPA e maracujá alho nas doses de 200 e 400 mg/kg apresentaram uma reversão nos efeitos adversos causados pela administração de rotenona, promovendo uma melhoria na força muscular dos animais.

5.5.2 Teste do campo aberto

Na Figura 25 estão apresentados os resultados obtidos no teste do campo aberto após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho (200 e 400 mg/kg), veículo (água) e carbidopa/L-DOPA (25/250 mg/kg) em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona.

Figura 25 – Resultados do teste do campo aberto após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona



Resultados expressos em média \pm E.P.M (grupo naive: n=6; demais grupos: n=10/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. 7 dias: * $p < 0,05$ versus veículo e maracujá alho (400 mg/kg). 14 dias: * $p < 0,05$ versus veículo, carbidopa/L-DOPA e maracujá alho (400 mg/kg). 21 dias: não significativo ($p > 0,05$). Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

O maracujá alho (200 mg/kg) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de cruzamentos ($56,87 \pm 7,97$), quando comparado com os grupos veículo ($26,22 \pm 4,72$) e maracujá alho na dose de 400 mg/kg ($28,89 \pm 5,18$) após 7 dias dos tratamentos, indicando uma melhoria na atividade locomotora dos animais (FIGURA 25). A ausência de diferença após 14 e 21 dias do maracujá alho com o veículo pode ser devido ao efeito sedativo (já mostrado anteriormente no presente trabalho), principalmente do grupo que recebeu a dose de 400 mg/kg de maracujá alho.

O teste de campo aberto é amplamente utilizado como parâmetro de atividade locomotora e ansiedade (STEIMER, 2011). O tratamento com ansiolíticos não aumenta a exploração do campo, mas diminui o estresse induzido no comportamento exploratório e na

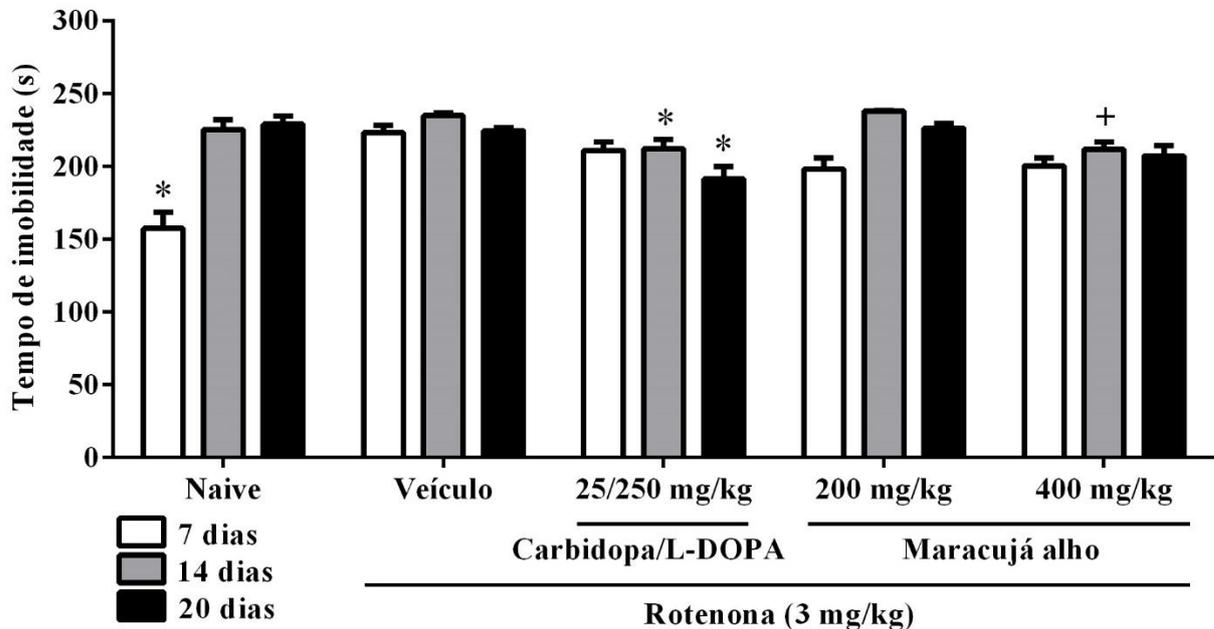
tigmotaxia (PRUT; BELZUNG, 2003; VILELA *et al.*, 2009). Diversas espécies de maracujá são conhecidas pelos efeitos ansiolíticos, como *Passiflora incarnata* (DHAWAN *et al.*, 2001), *Passiflora actinia* (LOLLI *et al.*, 2007), *Passiflora edulis* (FIGUEIREDO, 2013) e *Passiflora quadrangularis* (GAZOLA *et al.*, 2018). Segundo Bové e Perier (2012), a atividade locomotora também pode estar associada a alterações na função da dopamina, uma vez que níveis reduzidos de dopamina podem levar a uma redução da locomoção.

5.5.3 Teste do nado forçado

O teste de nado forçado é uma das ferramentas mais utilizadas para a triagem de antidepressivos (PETIT-DEMOULIÈRE *et al.*, 2005) e este método foi descrito pela primeira vez por Porsolt *et al.* (1977), que relataram que um estado deprimido poderia ser induzido em camundongos, forçando-os a nadar em um cilindro estreito do qual eles não podem escapar, e após um curto período de desespero, os animais adotam uma característica de postura imóvel. A depressão é uma das complicações psiquiátricas mais comuns da Doença de *Parkinson* (AARSLAND *et al.*, 2011), apresentando a perda de interesse e prazer como a principal característica (CUMMINGS, 1992).

Na Figura 26, estão apresentados os resultados do teste do nado forçado após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho (200 e 400 mg/kg), veículo (água) e carbidopa/L-DOPA (25/250 mg/kg) em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona. Observou-se que após 14 dias dos tratamentos, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tempo de imobilidade do maracujá na dose de 400 mg/kg ($211,6 \pm 5,09$ s) quando comparado com o grupo veículo ($234,89 \pm 1,97$ s), indicando uma melhoria no estado depressivo dos animais desse grupo.

Figura 26 – Resultados do teste do nado forçado após 7, 14 e 20 dias dos tratamentos com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA em ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona

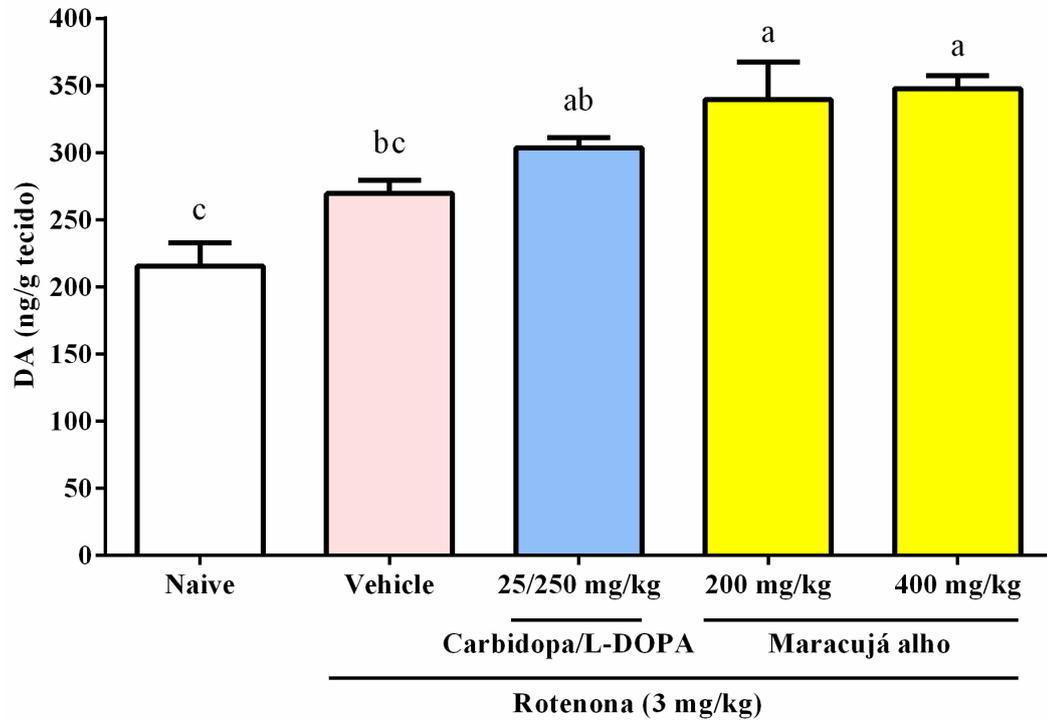


Resultados expressos em média \pm E.P.M (grupo naive: n=6; demais grupos: n=10/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. 7 dias: *p < 0,05 versus veículo e carbidopa/L-DOPA. 14 dias: *p < 0,05 versus veículo e maracujá alho (200 mg/kg); +p < 0,05 versus veículo e maracujá alho (200 mg/kg). 21 dias: *p < 0,05 versus naive, veículo e maracujá alho (200 mg/kg). Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

5.5.4 Dosagem de monoaminas

A Figura 27 mostra os níveis de dopamina no cérebro dos ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona e tratados com maracujá alho (200 e 400 mg/kg), veículo (água) e carbidopa/L-DOPA (25/250 mg/kg). Os resultados obtidos indicaram que os grupos tratados com maracujá alho (doses de 200 e 400 mg/kg) apresentaram níveis mais elevados ($339,5 \pm 28,28$ e $347,7 \pm 9,87$ ng/g tecido, respectivamente) diferindo ($p < 0,05$) dos grupos veículo ($269,6 \pm 9,78$ ng/g tecido) e naive ($215,5 \pm 17,3$ ng/g tecido), mas sem diferença significativa ($p > 0,05$) com o grupo carbidopa/L-DOPA ($303,7 \pm 7,52$ ng/g tecido).

Figura 27 – Níveis de dopamina (DA) no cérebro (corpo estriado) de ratos *Wistar* induzidos ao Parkinson por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA



Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

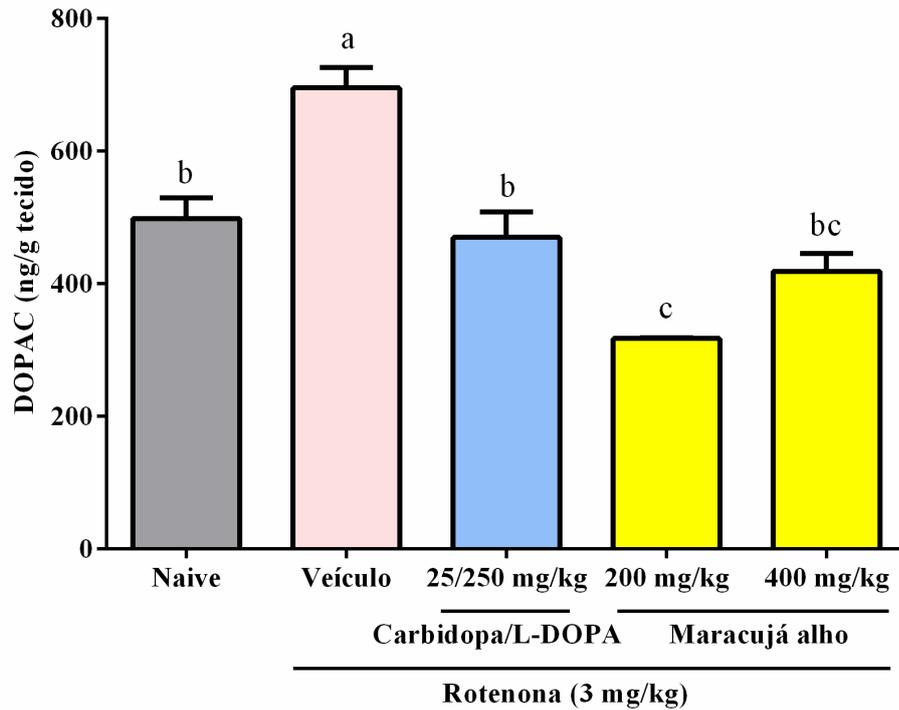
Segundo Lewitt *et al.* (2011), a dopamina sofre catabolismo pela monoamina oxidase e pela catecol-O-metil transferase para produzir ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) como metabólitos, que também podem ser utilizados como biomarcadores para a doença de *Parkinson*.

Connolly e Lang (2014) relataram que a principal característica patológica da doença de *Parkinson* é a perda de neurônios dopaminérgicos na via nigrostriatal. A rotenona é um inibidor do complexo I da mitocôndria e é utilizada para induzir o comportamento de parkinsonismo e a morte neuronal dopaminérgica (TEERAPATTARAKAN *et al.*, 2018). Os resultados deste estudo mostraram que o maracujá alho exerceu proteção contra morte neuronal dopaminérgica.

Para a avaliação dos níveis de DOPAC, apresentados na Figura 28, os grupos tratados com veículo (água) apresentaram níveis mais elevados ($695,3 \pm 30,78$ ng/g tecido) diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos grupos naive ($498,1 \pm 31,74$ ng/g tecido), carbidopa/L-

DOPA ($469,8 \pm 38,77$ ng/g tecido) e maracujá alho nas doses 200 e 400 mg/kg ($317,3 \pm 0,91$ e $418,8 \pm 26,96$ ng/g tecido, respectivamente).

Figura 28 – Níveis de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) no cérebro (corpo estriado) de ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA

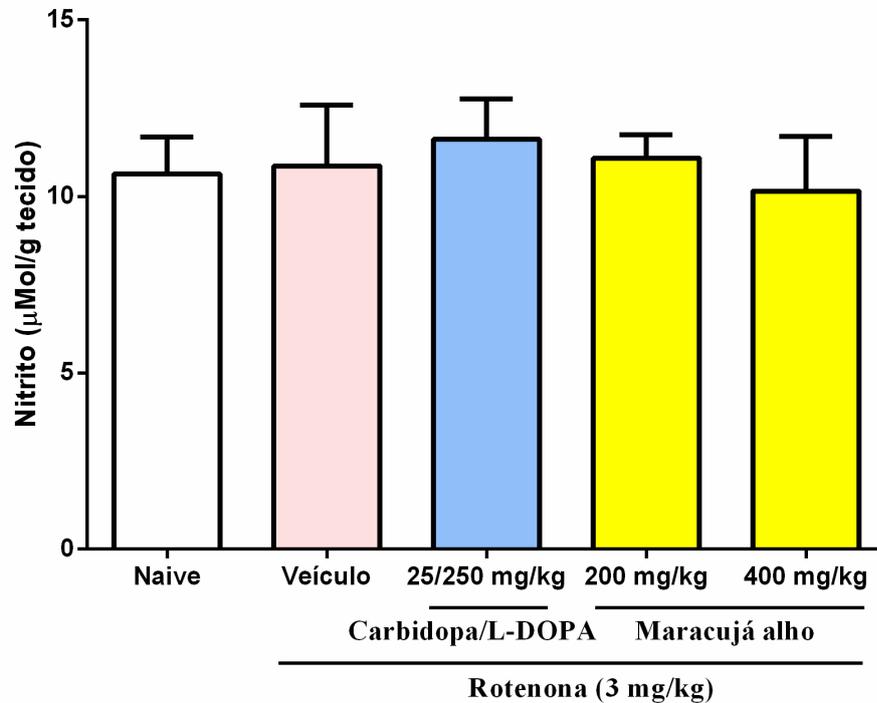


Resultados expressos em média \pm E.P.M (n=6/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Letras diferentes sobre as barras do gráfico diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

5.5.5 Determinação de nitrito

Na Figura 29, pode se verificar que o tratamento com maracujá alho (200 e 400 mg/kg) não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) nos teores de nitrito ($11,09 \pm 1,14$ e $8,67 \pm 0,51$ μ Mol de nitrito/g tecido, respectivamente) em comparação com o grupo naive ($10,63 \pm 1,05$ μ Mol de nitrito/g tecido), veículo ($10,86 \pm 1,73$ μ Mol de nitrito/g tecido) e carbidopa/L-DOPA ($11,63 \pm 1,14$ μ Mol de nitrito/g tecido).

Figura 29 – Determinação de nitrito no cérebro (corpo estriado) de ratos *Wistar* induzidos ao *Parkinson* por rotenona e tratados com maracujá alho, veículo (água) e carbidopa/L-DOPA



Resultados expressos em média \pm E.P.M (grupo naive: n=6; demais grupos: n=10/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida de teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Fonte: *Software GraphPad Prism* versão 6.01 modificado pela autora (2019).

O estresse oxidativo está associado à lesão tecidual em processos patológicos e reflete no aumento do nível de espécies reativas de oxigênio que poderiam reagir com o nível de nitrito elevado e formar as espécies mais tóxicas, como peroxinitrito, que poderia iniciar o comprometimento mitocondrial e degeneração dos neurônios (SINGH; DIKSHIT, 2007; SINGH; JIALAL, 2006; MILLER *et al.*, 2002).

Após a indução do *Parkinson* por rotenona, os resultados obtidos nos testes comportamentais após 7, 14 e 20 dias de consumo de maracujá alho (doses de 200 e 400 mg/kg) apresentaram algumas semelhanças com o tratamento com carbidopa/L-DOPA (medicamento já utilizado para tratamento da Doença de *Parkinson*) e com o comportamento inicial dos animais (antes da administração de rotenona), verificando a existência de um efeito benéfico associado ao consumo de maracujá alho na redução dos efeitos neurotóxicos causados pela rotenona.

Os testes comportamentais realizados permitiram indicar que o consumo de maracujá alho (*Passiflora tenuifila*) provocou uma melhora na coordenação motora dos

animais, sendo verificada pela movimentação dos animais nos testes do campo aberto (dose de 200 mg/kg), da corda para força de preensão (doses de 200 e 400 mg/kg) e nado forçado (dose de 400 mg/kg). Além disso, o tratamento com maracujá alho nas doses de 200 e 400 mg/kg provocou um aumento na concentração de dopamina no cérebro dos animais, sendo um resultado relevante, uma vez que a Doença de *Parkinson* é um distúrbio neurodegenerativo e os medicamentos disponíveis no mercado, não regeneram os neurônios dopaminérgicos perdidos, nem produzem um tratamento bem-sucedido (RIJK *et al.*, 2000), sendo importante o surgimento de um tratamento alternativo para uma melhoria nos sintomas de parkinsonismo (ARENAS, 2010).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que os frutos de maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip) apresentaram altos teores de fibra alimentar, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Através da análise de RMN foram detectados a presença de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos e na análise de UPLC foram identificados, principalmente, ácidos fenólicos e flavonoides.

O maracujá alho não apresentou efeitos tóxicos relativos ao seu consumo agudo e sub-crônico (90 dias), sendo seguro para o consumo humano nas doses avaliadas.

A administração oral de maracujá alho nos testes experimentais *in vivo* demonstrou um efeito funcional no SNC, apresentando uma atividade ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante e neuprotetora contra a degeneração dopaminérgica induzida pela rotenona no modelo da Doença de *Parkinson*, podendo fornecer uma alternativa terapêutica promissora para pacientes com doenças neurológicas. Baseando-se nos dados obtidos neste estudo e na literatura, pode-se relacionar esses efeitos funcionais com a presença dos compostos fitoquímicos identificados, como o GABA, antioxidantes e compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos).

Com base nas observações atuais, o maracujá alho é um fruto promissor e apresenta um potencial significativo como alimento funcional, recomendando-se estender as pesquisas para uma melhor compreensão do seu papel no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas ao SNC.

Além disso, sugere-se a realização de estudos com a separação das partes do fruto (casca, polpa e semente) e elaboração de extratos concentrados (com maiores teores de compostos fenólicos e antioxidantes).

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. *et al.* Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Biology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 35–47, dez. 2011.
- ABBOUD, K. Y. *et al.* Gastroprotective effect of soluble dietary fibres from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel against ethanol-induced ulcer in rats. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 54, p. 552-558, mar. 2019.
- ABDEL-RAHMAN, M. *et al.* Therapeutic efficacy of olfactory stem cells in rotenone induced Parkinsonism in adult male albino rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 103, p. 1178-1186, jul. 2018.
- AHMAD, N. *et al.* Evaluation of anti-osteoporotic activity of butanolic fraction from *Passiflora foetida* in ovariectomy-induced bone loss in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 88, p. 804-813, abr. 2017.
- ALAM, M; SCHMIDT, W. J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavior Brain Research**, [s.l.], v. 136, n. 1, p. 317-324, out. 2002.
- AMARAL, D. A. *et al.* Análise sensorial de geleia de polpa e de casca de maracujá. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 38, n. 3/4, 2014.
- ANZOISE, M. L. *et al.* Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 194, p. 137-145, dez. 2016.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Arlington: AOAC, 1995.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg: AOAC Inc., 2005.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg: AOAC Inc., 2010.
- ARENAS, E. Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 396, p. 152-156, 2010.
- ARNHOLD, J. Free radicals-friends or foes? Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, [s.l.], v. 69, p. 4-9, jan. 2004.
- AYRES, A. S. F. S. J. *et al.* Monoaminergic neurotransmission is mediating the antidepressant-like effects of *Passiflora edulis* Sims fo. *Edulis*. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 660, p. 79-85, nov. 2017.
- BANDARA, K. R. V.; PADUMADASA, C.; PEIRIS, D. C. Potent antibacterial, antioxidant and toxic activities of extracts from *Passiflora suberosa* L. leaves. **PeerJ**, [s.l.], v. 6, maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.4804>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

BARUA, C. C. *et al.* Anxiolytic effect of hydroethanolic extract of *Drymaria cordata* L Willd. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 47, p. 969-973, dez. 2009.

BENDINI, A. *et al.* Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **European Food Research and Technology**, [s.l.], v. 223, p. 102–109, 2006.

BERNACCI, L. C. *et al.* Passifloraceae. *In*: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

BHARDWAJ, R. L. *et al.* Bioactive compounds and medicinal properties of fruit juices. **Fruits**, [s.l.], v. 69, n. 5, p. 391-412, set. 2014.

BOING, A. F. *et al.* Association between depression and chronic diseases: results from a population-based study. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 617-623, 2012.

BOMTEMPO, L. L. **Aminas bioativas em maracujá: influência da espécie, das condições climáticas e do amadurecimento**. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, [s.l.], v. 211, p. 51–76, jun. 2012.

BRAGA, M. F. *et al.* Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip) cultivado no Distrito Federal. *In*: Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro, 4, 2005, Planaltina. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 86-90.

BRANCO, C. S. *et al.* Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 92, p. 60-68, mar. 2013.

BRASIL. Portal Brasil. Ministério da Saúde. **Conheça os sintomas do Mal de Parkinson**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/10/conheca-os-sintomas-do-mal-de-parkinson>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Produto de Cereais, Amido, Farinhas e Farelos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 23 set. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 03 maio 1999.

BRASIL. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa CONCEA nº 25, de 29 de setembro de 2015. Baixa o Capítulo “Introdução Geral” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial da União**, 06 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação. Resolução Normativa CONCEA nº 15, de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. **Diário Oficial da União**, 18 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Trata de pesquisas e testes em seres humanos. **Diário Oficial da União**, 13 jun. 2013.

BORYCZ, J. *et al.* Differential glutamate-dependent and glutamate-independent adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine release in different striatal compartments. **Journal of Neurochemistry**, [s.l.], v. 101, p. 355-363, 2007.

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

BUCCAFUSCO, J. J. **Methods of Behavior analysis in neuroscience**. 2 ed. Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis Group, 2009.

BUENO, A. X. **Efeitos do extrato aquoso obtido das folhas da *Hyptis pectinata* (sambacaitá) sobre o Sistema Nervoso Central de camundongos**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal do Sergipe, São Cristovão, 2005.

BUENO, C. J. *et al.* *Fusarium solani* f. sp. *Passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 63, p. 382-389, jul. 2013.

CAMPBELL, E. L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 68, n. 8, p. 1631-1638, out. 2004.

CARVALHO, M. J. **Caracterização fitoquímica e atividades farmacológicas de extratos das folhas do maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* Kunth)**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

CARVALHO, S. L. C.; STENZEL, N. M. C.; AULER, P. A. M. Maracujá-amarelo: recomendações técnicas para cultivo no Paraná / Sérgio Luiz de Carvalho, Neusa Maria Colauto Stenzel, Pedro Antônio Martins Auler – **Boletim Técnico**, n. 83, Londrina: IAPAR, 2015. 54 p.

CAZARIN, C. B. B. *et al.* Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1699-1704, set. 2014.

CAZARIN, C. B. B. *et al.* Intestinal anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* peel in the dextran sodium sulphate model of mouse colitis. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 26, p. 565-576, out. 2016.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. *et al.* Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, p. 14122-14152, ago. 2014.

CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 49, p. 786-790, 2005.

CHIARADIA, E. *et al.* Protein carbonylation in dopaminergic cells exposed to rotenone. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 309, p. 20-32, jul. 2019.

CHOCHOLOUS, P. *et al.* Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. **Talanta**, [s.l.], v. 103, p. 221-227, jan. 2013.

CHU, N. Caffeine- and aminophylline-induced seizures. **Epilepsia**, [s.l.], v. 22, p. 85-94, 1981.

COLETA, M. *et al.* Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 20, p. 1067-1073, dez. 2006.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease a review. **JAMA**, [s.l.], v. 311, n. 16, p. 1670-1683, abr. 2014.

CÓRDOVA, K. R. *et al.* Características Físico-Químicas Da Casca Do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) Obtidos Por Secagem. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 221-230, jan./jun. 2005.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. 670 p.

COSTA, A. P. R. **Avaliação do efeito neuropsicofarmacológico do suco dos frutos de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa Degener em camundongos**. 2009. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: Advances in modelling human Depression and anxiety. **Nature Reviews**, [s.l.], v. 4, p. 775-779, set. 2005.

CUMMINGS, J. L. Depression and Parkinson's Disease: A Review. **The American Journal of Psychiatry**, [s.l.], v. 149, p. 443-454, abr. 1992.

DANON, J. J.; REEKIE, T. A.; KASSIOU, M. Challenges and Opportunities in Central Nervous System Drug Discovery. **Trends in Chemistry**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 612-624, set. 2019.

DARBINYAN, L. V. *et al.* Rotenone impairs hippocampal neuronal activity in a rat model of Parkinson's disease. **Pathophysiology**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 23-30, mar. 2017.

DEGINANI, N. B.; ESCOBAR, A. Números cromossômicos de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae). **Hickenia** 3, [s.l.], v. 36, p. 143-144, jun. 2002.

DENG, J. *et al.* Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 128, p. 148-53, mar. 2010.

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

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 72, n. 8, p. 922-926, dez. 2001.

DIAS, M. V. *et al.* Aproveitamento do albedo do maracujá na elaboração de doce em massa e alterações com o armazenamento. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 1, p. 71-78, jan./mar. 2011.

DUARTE, F. S. *et al.* Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 86, n. 1, p. 150-161, jan. 2007.

DUARTE, I. A. E.; MADALENA, J. O. M.; COSTA, A. M. Desenvolvimento de formulação de pães elaborados frutos do Cerrado (jatobá e maracujá *Passiflora edulis*). In: 10º SLACA, 2013. **Anais...** Campinas: SLACA, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95938/1/10712.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2017.

DURIGAN, J. F. Colheita e conservação pós-colheita. In: Simpósio brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, 5, 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. 388 p.

EL-BATSH, M. M. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s.l.], v. 93, n. 8, p. 649-656, ago. 2015.

ELSAS, S. M. *et al.* *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 17, n. 12, p. 940-949, out. 2010.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E), 2016. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1061917/maracuja-o-produtor-pergunta-a-embrapa-responde>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

FALEIRO, F. G. *et al.* **BRS Vita Fruit: Cultivar de maracujazeiro medicinal da espécie *Passiflora tenuifila* Killip como alternativa para o mercado de frutas especiais com propósitos de processamento de produtos funcionais-medicinais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1108808/brs-vita-fruit-brs-vf-cultivar-de-maracujazeiro-medicinal-da-especie-passiflora-tenuifila-killip-como-alternativa-para-o-mercado-de-frutas-especiais-com-propositos-de-processamento-de-produtos-funcionaismedicinais>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

FALEIRO, F. G. *et al.* Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q. (Eds). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 183 p.

FAO/OMS. **Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation** (WHO Technical Report Series; nº 935, 2007). Geneva: Switzerland, 2002. 265 p.

FARAG, M. A. *et al.* Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 408, p. 3125–3143, maio 2016.

FARAG, M. A. *et al.* Phytochemical Profiles and Antimicrobial Activities of *Allium cepa* Red cv. and *A. sativum* Subjected to Different Drying Methods: A Comparative MS-Based Metabolomics. **Molecules**, [s.l.], v. 22, p. 761, maio 2017.

FARKAS, S. *et al.* Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 264-273, set./out. 2005.

FAROMBI, E. O. *et al.* Neuroprotective role of kolaviron in striatal redo-inflammation associated with rotenone model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, [s.l.], v. 73, p. 132-141, jul. 2019.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. 670 p.

FIGUEIREDO, D. A. F. **Avaliação de efeitos terapêuticos e nutricionais da farinha de *Passiflora edulis* (maracujá-amarelo) em estudos pré-clínicos com ratos**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

FIGUEIREDO, I. R. **Quantificação de metabólitos secundários e atividade antioxidante em extratos de sementes e de calos cultivados in vitro de *Passiflora tenuifila* Killip (*Passifloraceae*)**. 2018. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2018.

FIGUEIREDO, D. A. F. *et al.* Effects of bark flour of *Passiflora edulis* on food intake, body weight and behavioral response of rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, p. 595-600, set./out. 2016.

FINNEY, D.J. 1962. Probit Analysis. Cambridge, Cambridge University Press.

FISHER, R. S. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, [s.l.], v. 55, n. 4, p. 475-482, abr. 2014.

GADIOLI, I. L. **Obtenção, caracterização química, propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de polpas, sementes e folhas de passifloras silvestres para formulação de nanoemulsões**. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GAZOLA, A. C. **Avaliação química e neurofarmacológica de espécies de Passiflora da América do Sul**. 2014. 216 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

GAZOLA, A. C. *et al.* Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, p. 158-163, 2015.

GAZOLA, A. C. *et al.* The sedative activity of flavonoids from *Passiflora quadrangularis* is mediated through the GABAergic pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 100, p. 388-393, abr. 2018.

GAZZANIGA, M.; HEATHERTON, T. **Ciência Psicológica: mente, cérebro e comportamento**. São Paulo: Artmed, 2005.

GOMES, S. V. F. **Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora**. 2013. 161 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2013.

GOMES, E. N. **Estudos da atividade anti-parasitária, toxicológica e histopatológica dos extratos etanólicos de *Solanum paniculatum* e *Cymbopogon citratus***. 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GUO, D. *et al.* Orientin and neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 58, p. 72-79, maio 2018.

GÜNAYDIN, C. *et al.* Effects of agomelatine in rotenone-induced Parkinson's disease in rats. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 699, p. 71-76, abr. 2019.

HAMINIUK, C. W. I. *et al.* Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science+Technology**, [s.l.], v. 47, n. 10, p. 2023-2044, out. 2012.

HAN, H. *et al.* Anxiolytic effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi spinosi* Semen: possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 92, p. 206-213, abr. 2009.

HE, M. *et al.* A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 115, p. 74-85, dez. 2016.

HEGARTY, S. V. *et al.* Effects of intracerebral neurotrophic factor application on motorsymptoms in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & related disorders**, [s.l.], v. 38, p. 19-25, maio 2017.

HEIDARI, M. R. *et al.* Anticonvulsant Effect of Methanolic Extract of *Echium amoenum* Fisch and C.A. Mey. Against Seizure Induced by Picrotoxin in Mice. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 772-776, abr. 2006.

HOFFMANN, J. F. **Abordagem metabolômica para acessar características de qualidade em frutos e produtos de *Butia spp.*** 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

HOLANDA, D. K. R. **Desenvolvimento e caracterização de sopa de vegetais e carne a base de maracujá silvestre (*Passiflora tenuifila Killip*) submetida ao processo de esterilização.** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

HORST, C. H. *et al.* Signature of Aberrantly Expressed microRNAs in the Striatum of Rotenone-Induced Parkinsonian Rats. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 43, n. 11, p. 2132-2140, nov. 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

INFANTE, J. *et al.* Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 87-91, jan./mar. 2013.

INOMATA, E. I. *et al.* Determinação do teor de suco de maracujá em produtos industrializados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s.l.], v. 43, p. 9-14, 1983.

ISHIMOTO, F. Y. *et al.* Aproveitamento alternativo da casca do maracujá- amarelo (*Passiflora edulis* f.var.flavicarpa Deg.) para produção de biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 279-292, 2007.

JACQUET, A. R. *et al.* Lumbee traditional medicine: Neuroprotective activities of medicinal plants used to treat Parkinson's disease-related symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 206, p. 408-425, jul. 2017.

JANEIRO, D. I. *et al.* Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, p. 724-732, dez. 2008.

JANKOVIC, J.; STACY, M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. **CNS Drugs**, [s.l.], v. 21, p. 677-692, 2007.

JOSEPH, S.V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Fruit polyphenols: A Review of anti-inflammatory effects in humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 56, p. 419-444, 2016.

JUZAVIL, J. *et al.* Effect of *Phyllanthus niruri* and *Passiflora foetida* extracts on the mortality and survival rate of the Brine Shrimp *Artemia salina*. **Research Journal of Recent Sciences**, [s.l.], n. 2, v. 4, p. 61-67, fev. 2015.

KANDEL, E. R. *et al.* Crises epilépticas e epilepsia. In: **Princípios de Neurociências.**

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH (Eds.). 5 ed. Artmed: Porto Alegre, RS. p. 970-990, 2014.

KARLER, R. *et al.* Pentylentetrazol kindling in mice. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 28, n. 8, p. 775-780, ago. 1989.

KARLSSON, A.; NIXON, J. B.; MCPHAIL, L. C. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependente or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. **Journal of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 67, n. 3, p. 396-404, mar. 2000.

KIM, G. *et al.* Improvement in neurogenesis and memory function by administration of *Passiflora incarnata* L. extract applied to sleep disorder in rodent models. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s.l.], v. 98, p. 27-40, jul. 2019.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: Friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, [s.l.], n. 5, v. 77, p. 598-625, maio 2005.

KOERT, R. R. V. *et al.* Caffeine and seizures: A systematic review and quantitative analysis. **Epilepsy & Behavior**, [s.l.], v. 80, p. 37-47, mar. 2018.

KUMAR, A.; LALITHA, S.; MISHRA, J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylentetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. **Epilepsy & Behavior**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 103-111, out. 2013.

LALONDE, R. *et al.* Motor coordination in mice with hotfoot, Lurcher, and double mutations of the *Grid2* gene encoding the delta-2 excitatory amino acid receptor. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 80, n. 2-3, p. 333-339, nov. 2003.

LAMPREA, M. R. *et al.* Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 41, p. 135-140, fev. 2008.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O, SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2010.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 45, p. 1390-1393, abr. 1997.

LASON, W.; CHLEBICKA, M.; REJDAK, K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 65, n. 4, p. 787-801, jul./ago. 2013.

LAVOR, E. M. *et al.* Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 47, p. 58-68, ago. 2018.

LAZAROVA, I. *et al.* HPLC–DAD analysis of phenolic compounds and antioxidante properties of *Asphodeline lutea* roots from Bulgaria and Turkey. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 61, p. 438-441, nov. 2014.

LEWITT, P. A. *et al.* Parkinsons Study Group–DATATOP Study Investigators. CSF xanthine, homovanillic acid and their ratio as biomarkers of Parkinsons disease. **Brain Research**, [s.l.], v. 408, p. 88-97, ago. 2011.

LI, H. *et al.* Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘edulis’ and *Passiflora edulis* ‘flavicarpa’. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 133, p. 1085-1090, fev. 2011.

LIMA, G. C. *et al.* *Passiflora edulis* peel intake improves insulin sensitivity, increasing incretins and hypothalamic satietogenic neuropeptide in rats on a high-fat diet. **Nutrition**, [s.l.], v. 32, n 7–8, p. 863-870, jul./ago. 2016.

LIMA, H. C. *et al.* Indicadores de maturação para definição de ponto de colheita do maracujá selvagem (*Passiflora tenuifila*) cultivado na região de Cerrado. *In*: 21º Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010. **Anais...** Natal: SBF, 2010. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/865859/1/ResumoExpandidoCBFte nuifila27agversaofinal.pdf>>. Acesso em: 10 de dez. de 2018.

LIMA, R. M. T. **Avaliação da estabilidade química, físico-química e microbiológica de polpas de acerola orgânica pasteurizada e não-pasteurizada**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LINARD, C. F. B. M. **Efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de *Anacardium occidentale* e do ácido anacárdico no modelo experimental animal da doença de parkinson induzido por rotenona**. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 92, n. 2, p. 180-185, jun. 1987.

LOLLI, L. F. *et al.* Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 111, n. 2, p. 308-314, 2007.

LOPES, J. R. G. *et al.* Administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 872-877, maio 2014.

LOUIS, E.D. *et al.* Relationship between blood harmene and harmine concentrations in familial essential tremor, sporadic essential tremor and controls. **NeuroToxicology**, [s.l.], v 31, p. 674-679, dez. 2010.

LUTEN, J. *et al.* Interlaboratory trial of the determination of the in vitro iron dialysability from food. **Journal of Science and Food Agriculture**, [s.l.], v. 72, n. 4, p. 415-424, dez. 1996.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. 2. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 27, p. 112-121, mar. 1975.

MA, B. Q. *et al.* Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 172, p. 86–91, abr. 2015.

MADALENA, J. O.; COSTA, A. M.; LIMA, H. C. L. Avaliação de usos e conhecimentos de maracujás nativos como meio para definição de estratégias de pesquisa e transferência de tecnologia. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 30, n. 1/3, p. 55-72, jan./dez. 2013.

MANTOVANI, A. *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 11, p. 519-531, jul. 2011.

MARDER, M.; PALADINI, A. C. GABA A receptor ligands of flavonoid structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 2, n. 8, p. 853-867, ago. 2002.

MARLIÉRE, L. D. P. *et al.* Utilização de fitoterápicos por idosos: resultado de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, p. 754-760, dez. 2008.

MARTIN-ARJOL, I. *et al.* Identification of oxylipins with antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, p. 341–346, out. 2010.

MARTINEZ, R.; GARCIA, B. M. A.; MORATO, S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. **Revista Estudos de Psicologia**, Natal, v. 10, p. 239-245, 2005.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, [s.l.], v. 1, p. 1–11, jan. 2015.

MEDEIROS, J. L. **Caracterização nutricional, atividade antioxidante e segurança de uso de frutos de oiti [*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch]**. 2018. 106 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

MEDEIROS, J. S. *et al.* Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 99-101, 2009.

MEDINA, J. H. *et al.* Overview-Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 22, p. 419-425, 1997.

MENEZES M. S.; TEIVE, H. A. G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a conveniente general bioassay for active plant constituents. **Journal of Plant Medicinal Plant Research**, [s.l.], 45, p. 31-34, 1982.

- MILLER, F. J. *et al.* Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s.l.], v. 22, p. 560-565, 2002.
- MOORE, R. Y. Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, [s.l.], v. 2, p. 65-71, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: application to proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.
- MÜLLER, N. Immunology of Major Depression. **Neuroimmunomodulation**, [s.l.], v. 21, p. 123-130, 2014.
- NABAVI, S. F. *et al.* Apigenin as neuroprotective agent: Of mice and men. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 128, p. 359-365, fev. 2018.
- NASCIMENTO, M. R. F. *et al.* Características sensoriales, microbiológicas y físico-químicas de dulces em masa de cáscara de maracujá amarilllo. **Alimentaria**, [s.l.], v. 347, p. 97-100, 2003.
- NUNES, D. J. P. **Análise do mercado consumidor de maracujá no município de São Gonçalo do Abaeté – MG**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção) – Faculdade Finom de Patos De Minas, Patos de Minas-MG, 2018.
- OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity** – Acute Toxic Class. Method n° 423. Paris: OECD, 2001.
- OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guideline for Testing of Chemicals. **Subchronic inhalation toxicity: 90-day study**. Method n° 413. Paris: OECD, 2010.
- OLIVEIRA, B. D. **Alterações na qualidade do doce em calda do albedo de maracujá durante o armazenamento**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.
- OLIVEIRA, A.; AMARO, A. L.; PINTADO, M. Impact of food matrix components on nutritional and functional properties of fruit-based products. **Current Opinion in Food Science**, [s.l.], v. 22, p. 153-159, ago. 2018.
- OTIFY, A.; GEORGE, A.; ELSAYED, A.; FARAG, M. A. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. **Food & Function**, [s.l.], v. 6, n. 12, p. 3807-3817, 2015.
- OZAROWSKI, M. *et al.* Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and in vitro cytotoxic potential on leukemia cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 179-191, 2017.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, [s.l.], v. 2, n. 2, 74-79, 2011.

PARRA, A. L. *et al.* Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 395-400, set. 2001.

PAVAN, K. R. *et al.* Phytochemical screening antiepileptic e analgesic activity of leaf extract of *Passiflora foetida*. **Pharmacologyonline**, [s.l.], v. 3, p. 576-580, 2009.

PEREIRA, R. C. A.; SILVEIRA, M. R. S.; COSTA, A. M. Maracujá Silvestre (*Passiflora tenuifolia* Killip): Aspectos Agronômicos e Características dos Frutos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017. 5 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, **Comunicado Técnico**, 233). Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166840/1/COT17007.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

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

PIMENTA, A. B. **Atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato bruto das partes aéreas da *Kielmeyera rubriflora* em camundongos**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, 2014.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internacionales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, [s.l.], v. 229, n. 2, p. 327-336, out. 1977.

PRAVEEN, K. U. *et al.* Evaluation of antiepileptic activity of methanolic extract of *Brassica nigra* seeds in mice. **Journal of Phamaceutical Innovation**, [s.l.], v. 3, p. 73-84, 2013.

PREISIGKE, S. C. *et al.* Genetic variability of *Passiflora* spp. against collar rot disease. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 9, p. 69-74, 2015.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELLO, L. E. A. M. Métodos para avaliação de drogas anticonvulsivantes. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. p. 168-178.

RAMOS, A. T. *et al.* Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 4, p. 592-597, out./dez. 2007.

RANGASAMY, S. *et al.* Cellular and Animal Models of Neurologic Disease. In: SWAIMAN, K. F. *et al.* (Eds). **Swaiman's Pediatric Neurology**. 6. ed. Elsevier, 2017. p. 114-122.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, maio 1999.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n. 1, p. 65-70, jan./mar. 2005.

RIJK, M. C. *et al.* Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic diseases in the elderly research group. **Neurology**, [s.l.], v. 54, p. 21-23, 2000.

RITCHIE, J. M. Central nervous system stimulants, II, The xanthines. In: Goodman LS, Gilman A (eds). **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacMillan Company, p. 367- 378, 1975.

RODRIGUES, A. D. *et al.* Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylentetrazole. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 60, n. 8, p. 799-805, jun. 2012.

ROMANINI, V. R. *et al.* Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de Passiflora alata Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v. 28, p. 159-164, 2006.

RUFINO, M. S. M. *et al.* **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 128).

RYU, H. *et al.* Amurensin G induces autophagy and attenuates cellular toxicities in a rotenone model of Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 433, n. 1, p. 121-126, mar. 2013.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 62, p. 111-120, set. 2013.

SANTANA, F. C. **Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de Passiflora spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**. 2015. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SANTANA, F. C. *et al.* Desenvolvimento de biscoito rico em fibras elaborado por substituição parcial da farinha de trigo por farinha da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) e fécula de mandioca (*Manihot esculenta crantz*). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 3, p. 391-399, jul./set. 2011.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. **Food Science and Human Wellness**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 56-64, jun. 2014.

SELLIER, E.; DAVIDTCHOUDA, S.; BAL, G.; FRANÇOIS, P. Morbidity and mortality conferences: their place in quality assessments. **International Journal of Health Care Quality Assurance**, [s.l.], v. 25, p. 189-196, 2012.

SENA, L. M. *et al.* Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental biology and medicine**, [s.l.], v. 234, p. 967-975, 2009.

SERENIKI, A. *et al.* *Schinus terebinthifolius* administration prevented behavioral and biochemical alterations in a rotenone model of Parkinson's disease. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 240-245, mar./abr. 2016.

SHALABY, H. N.; EL-TANBOULY, D. M.; ZAKI, H. F. Topiramate mitigates 3-nitropropionic acid-induced striatal neurotoxicity via modulation of AMPA receptors. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 118, p. 227-234, 2018.

SHANMUGAM, S. *et al.* HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. **Arabian Journal of Chemistry**, online, fev. 2016b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.008>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

SHANMUGAM, S. *et al.* UHPLC–QqQ–MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. **Food Research International**, [s.l.], v. 108, p. 611-620, jun. 2018.

SHANMUGAM, S. *et al.* Polyphenols rich *Passiflora leschenaultii* leaves modulating Farnesoid X Receptor and Pregnane X Receptor against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 8, p. 1114-1121, abr. 2017.

SHANMUGAM, S. *et al.* Effects of luteolin and quercetin 3- β -d-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 83, p. 1278-1285, out. 2016.

SHARMA, N.; NEHRU, B. Beneficial effect of vitamin E in rotenone induced model of PD: behavioural, neurochemical and biochemical study. **Experimental Neurobiology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 214-223, set. 2013.

SHARMA, S.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 116, p. 104-111, jun. 2018.

SHENG, L. *et al.* GABA Pathway Rate-Limit Citrate Degradation in Postharvest Citrus Fruit Evidence from HB Pumelo (*Citrus grandis*) \times Fairchild (*Citrus reticulata*) Hybrid Population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 8, p. 1669–1676, fev. 2017.

SILVA, M. I. G. *et al.* Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 455-462, out./dez. 2006.

SILVA, T. V. *et al.* Influência dos estádios de maturação sobre as características físicas dos frutos de maracujá-amarelo. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 521-525, 2008.

SILVEIRA, M. R. S. *et al.* Caracterização de frutos de maracujazeiro silvestre (*Passiflora tenuifila*). In: ENCONTRO NACIONAL, 19º CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 5., 2015, Natal, [Anais], Goiânia: Universidade Federal de Goiás. 2015.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. **Brain Research Reviews**, [s.l.], v. 54, n. 2, p. 233-250, 2007.

SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, [s.l.], v. 13, p. 129-142, 2006.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 4, p. 12-17, jan. 2007.

SOLINAS, M. *et al.* Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **The Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 22, p. 6321-6324, 2002.

SOUZA, M. V. S.; FERREIRA, T. B.; VIEIRA, I. F. R. Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 1, p. 33-36, jan./mar. 2008.

SPANHOLI, L.; OLIVEIRA, V. R. Utilização de farinha de albedo de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa degener*) no preparo de massa alimentícia. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 4, p. 599-603, out./dez. 2009.

SPIELBERGER, C. **Anxiety: Current Trends in Theory and Research**. New York: Academic Press, vol 1, 1972.

SPINOSA, E. A. **Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante de sopa formulada com maracujá alho (*Passiflora tenuifila* Killip)**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, [s.l.], v. 30, n. 18, p. 3268-3295, dez. 2007.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 495-506, dez. 2011.

SUE, C.; SCHON, E. Mitochondrial respiratory chain diseases and mutations in nuclear DNA: a promising start. **Brain Pathology**, [s.l.], v. 10, p. 442-450, 2000.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, [s.l.], v. 3, p. 211-221, 2007.

SWIADER, M. J.; WIELOSZ, M. Effect of propranolol on the anticonvulsant action of diazepam and phenobarbital in caffeine-induced seizures and lethality in mice. **Pharmacological Reports**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 595-596, mar./abr. 2011.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 350, p. 21-29, 1998.

TAL, Y. *et al.* The neuroprotective properties of a novel variety of passion fruit. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 23, p. 359-369, 2016.

TALPADE, D. J. *et al.* In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [³H]dihydrorotenone. **Journal of Neurochemistry**, [s.l.], v. 75, p. 2611-2621, 2000.

TARIQ, M. *et al.* Neuroprotective effect of nicotine against 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced experimental Huntington's disease in rats. **Brain Research Bulletin**, [s.l.], v. 67, p. 161-168, set. 2005.

TAVARES, J. T. Q. *et al.* Aplicação pós-colheita de cloreto de cálcio em maracujá amarelo. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 1, p. 7-12, 2003.

TEERAPATTARAKANA, N. *et al.* Neuroprotective effect of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 in rotenone-induced parkinsonism rats. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 44, p. 65-73, 2018.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-20, set. 2011.

TRAUTVETTER, S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**, [s.l.], v. 40, p. 140-150, 2009.

VAN RIJN, C. M. *et al.* The influence of folic acid on the picrotoxin-sensitive site of the GABA_A-receptor complex. **Epilepsy Research**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 215-218, maio./jun. 1988.

VARGAS, A. J. *et al.* *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 78, n. 2, p. 112-111, fev. 2007.

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

VIEIRA R. A. **Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo)**. 2001. 155 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

VIEIRA, C. F. S. *et al.* Utilização de farinha de casca de maracujá amarelo em bolo. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2010.

- VIEIRA, G. P.; GENOVESI, M. I. Alcalóides em Passifloras. *Palestra In: II Workshop da Rede Passitec – Avanço tecnológico para uso funcional de Passifloras comerciais e silvestres*, 18 a 20/05/2011. 8 p. 2011.
- VILELA, F. C.; SONCINI, R.; PAIVA, A. G. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacological**, [s.l.], v. 124, p. 325-27, jul. 2009.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological Bulletin**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 482-504, maio 1976.
- WASICKY, A. *et al.* Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, n. 4, p. 407-412, jul./ago. 2015.
- WELCH, K. D. *et al.* Effect of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists and antagonists on motor function in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 266, n. 3, p. 366–374, 2013.
- WILSHER, N. E. *et al.* Cytochrome P450 CYP1 metabolism of hydroxylated flavones and flavonols: Selective bioactivation of luteolin in breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 110, p. 383-394, dez. 2017.
- WINKLER, L. M. *et al.* Produção de etileno e atividade da enzima ACCoxidase em frutos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 634-636, dez. 2002.
- WONG, T. Y. *et al.* Apigenin and luteolin display differential hypocholesterolemic mechanisms in mice fed a high-fat diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p. 1000-1007, dez. 2017.
- YANG, J. L. *et al.* 3,4-seco-28-Nor-oleanane triterpenes from *Camellia japonica* protect from neurotoxicity in a rotenone model of Parkinson's disease. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 72, n. 23, p. 3240-3249, jun. 2016.
- ZERAIK, M. L. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 128, n. 2, p. 259-265, set. 2011.
- ZERAIK, M. L. *et al.* Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 459-471, jun./jul. 2010.
- ZHANG, L. *et al.* Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 276, p. 538-546, mar. 2019.
- ZHANG, S. *et al.* Protective effects of *Forsythia suspense* extract with antioxidant and anti-inflammatory properties in a model of rotenone induced neurotoxicity. **NeuroToxicology**, [s.l.], v. 52, p. 72-83, jan. 2016.
- ZUCOLOTTO, S. M. *et al.* Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 23, p. 232-239, 2012.