

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD PSICOACTIVA DE PASSIFLORAS DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO

Comparative Study of The Psychoactive Activity of Passifloras from The Province of Chimborazo

¹Vinueza Diego, ¹Pilco Gisela, ¹Acosta Karen, ²Tierra Patricia, ²Noboa Patricio, ¹Abdo Susana

¹Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo,

²Facultad de Recursos Naturales, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Panamericana Sur km 1½, Riobamba – Ecuador
gisel_apb@yahoo.es

R esumen

La variedad climática y la ubicación territorial del Ecuador favorece la diversidad biológica en el país. Sin embargo, debido a la presencia de gran número de flora y fauna por kilómetro cuadrado, la mayor parte no se encuentra estudiada, y a pesar de no contar con argumento científico para el uso de algunas especies vegetales, la población utiliza muchas de éstas para diferentes patologías, por lo que se realizó el estudio farmacológico de seis especies del género *Passiflora* de la provincia de Chimborazo – Ecuador, empleadas tradicionalmente para tratar el nerviosismo. Para la identificación se llevó a cabo un perfil de cromatografía en capa fina de cada especie, de los que se pudieron determinar cantidades considerables de moléculas con agrupamiento de tipo flavónico y cuantificación de los flavonoides totales. De las especies estudiadas *P. manicata* se destacó por su elevado contenido de flavonoides totales usando el método de cloruro de aluminio para derivatizar los compuestos de interés y poder evaluarlos mediante espectrofotometría UV-visible. Mientras que para la actividad farmacológica se llevó a cabo in vivo mediante el modelo de laberinto en cruz elevado. De los resultados obtenidos se ha logrado determinar que al menos dos de las seis especies tienen actividad ansiolítica significativa a las dosis de 25 y 50 mg/kg de extracto hidroalcohólico, siendo *P. mixta* y *P. edulis* las especies vegetales que en su composición presentarían constituyentes bioactivos para tal efecto.

Palabras claves: *Passiflora*, ansiolítico, flavonoides, laberinto en cruz elevado.

A bstract

Climate variability and territorial location of Ecuador promotes biodiversity in the country. However, due to the presence of a big number of flora and fauna per square kilometer, most of it is not studied and despite not having a scientific argument for the use of some species, the population uses many of these for different pathologies, for this reason, a pharmacological study of six species of the genus *Passiflora* from the province of Chimborazo – Ecuador was carried out, traditionally used to treat nervousness. For identification, a thin layer chromatography profile of each species was carried out, of which it was possible to determine considerable quantities of molecules with grouping of flavonoid type and quantification of the total flavonoids. Of all the species *P. manicata* was noted for its high content of total flavonoids using aluminum chloride method for derivatizing the compounds of interest and to evaluate UV-visible spectrophotometry. While for the pharmacological activity it was carried out in vivo by the elevated plus-maze test. From the results obtained it has been

determined that at least two of the six species have significant anxiolytic activity at doses of 25 and 50 mg/kg of hydroalcoholic extract. Species like *P. edulis* and *P. mixta* have bioactive constituents for this purpose.

Keywords: *Passiflora*, anxiolytic, flavonoids, elevated cross maze.

Fecha de recepción: 01-dic-2017

Fecha de aceptación: 21-may-2018

INTRODUCCIÓN

La diversidad ecosistémica del Ecuador se debe principalmente a la variedad climática y a la topografía particular del territorio, estos factores han permitido la presencia de 46 formaciones vegetales naturales (1). Por lo anteriormente indicado, existe un número elevado de especies vegetales y animales por kilómetro cuadrado en todas las regiones del Ecuador (sierra, costa, amazonía y la zona insular), sin embargo con tal diversidad solo pocas han sido estudiadas (2). La familia *Passifloraceae* comprende 17 géneros y 660 especies (3), 4 géneros han sido identificados en América (*Ancistrothyrsus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora*) y aproximadamente 500 especies, la mayoría del género *Passiflora* (4). Las flores, hojas y frutos de los integrantes de la familia *Passifloraceae* son llamativos y peculiares por lo que son utilizados con fines ornamentales y comestibles (5), el nombre *Passiflora* fue dado por los conquistadores españoles que describieron a las flores como símbolos de la “Pasión de Cristo”(6), muchas especies han sido usadas en la medicina tradicional, entre ellas *Passiflora incarnata* L. *Passiflora foetida* y *Passiflora edulis* (7). De las investigaciones más prometedoras *P. edulis* precede la lista por poseer en sus semillas compuestos como piceatanol capaz de inhibir la melanogénesis y promover la síntesis de colágeno.(8)

La presencia de una variedad de fitoconstituyentes en el género *Passiflora* ha sido descrita. Sin embargo, los reportes sobre investigación farmacológica desarrollada, son limitados en Ecuador, sin

embargo los estudios que existen se basan en la actividad depresora sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) de diversas especies de *Passiflora* (9). Por otra parte, no se han llevado a cabo estudios sobre los efectos ansiolíticos de las especies nativas de *Passiflora* en Ecuador. Los estudios farmacológicos previos en Sudamérica del género *Passiflora* han sido desarrollados en Brasil tanto para *Passiflora alata* como *Passiflora edulis* en los que han sido descritos como depresores del SNC en ratones (10). De igual manera, en reportes subsiguientes en los que se realiza la correcta identificación de *Passiflora incarnata* y *Passiflora edulis* en India, se establece que el extracto metanólico de *P. incarnata* muestra actividad ansiolítica significativa, mientras que *P. edulis* estaba desprovista de cualquier actividad significativa (11). Otras especies como *Passiflora caerulea* con un contenido apreciable de crisina (monoflavonoide) ha demostrado actividad ansiolítica a una dosis de 1 mg/kg en ratones; en comparación con diazepam a 6 mg/kg para los efectos miorrelajantes. Por otra parte, se han reportado efectos no específicos depresores del SNC en ratones, ratas y voluntarios humanos sanos del extracto acuoso de *Passiflora edulis*. En el caso de *Passiflora incarnata* también conocida como flor de la pasión es la especie del género que se ha utilizado ampliamente debido a su efecto ansiolítico y sedante en todo el mundo desde tiempos inmemoriales. Desde 1974 una gran cantidad de diferentes compuestos han sido aislados de *Passiflora incarnata* como maltol, etil maltol y un derivado de γ -benzopirona; de ellos el etil maltol se ha destacado por sus propiedades anticonvulsivas. Posteriormente, el aislamiento de una benzoflavona tri-sustituida como el principal fitocomponente bioactivo marcó un antes y después en el caso de la actividad sobre el SNC de *Passiflora incarnata* (9). El pericarpio de *Passiflora quadrangularis* igualmente ha sido estudiado con el fin de aclarar la implicación de la vía GABAérgica en la actividad sedante de apigenina, el flavonoide principal de esta especie de *Passiflora*. Al final de este estudio, el efecto sedante de apigenina fue bloqueado por el tratamiento previo con el agonista inverso de las benzodiazepinas flumazenilo a la dosis de 1 mg/kg, lo que sugiere una interacción del compuesto apigenina con los recep-

tores de tipo GABA A (12). El objetivo de investigación fue la evaluación de la actividad ansiolítica de seis especies de *Passiflora*, algunas de ellas nativas de Ecuador, usando el modelo animal ratón *Mus musculus* y la prueba del laberinto en cruz elevado, como una primera aproximación a posibles investigaciones y aplicaciones de las mismas en el futuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Material vegetal

Las hojas de *P. manicata*, *P. tripartita*, *P. edulis*, *P. quadrangularis*, *P. ligularis*, *P. mixta* y *P. incarnata* se recolectaron en los alrededores de las ciudades de Riobamba, Pallatanga y Bucay, provincia de Chimborazo, Ecuador, en septiembre de 2014.

Los extractos totales fueron preparados tomando como material de partida las hojas de cada una de las especies vegetales por separado, que luego de su acondicionamiento apropiado, se extrajeron mediante maceración y sonicación usando como solvente extractivo una mezcla hidroalcohólica ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 85:15); para posteriormente, concentrar los extractos obtenidos a una temperatura no superior a los 50°C y finalmente liofilizarlos.

b. Identificación y cuantificación

Se realizó una cromatografía en capa delgada usando placas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia de 254 nm, una fase móvil constituida por acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua (100:11:11:26) y como reactivo revelador una solución alcohólica de cloruro de aluminio en primera instancia y posteriormente poli-etilenglicol 400 como mejorador de la fluorescencia (13). Mientras que la cuantificación de flavonoides totales presentes en los extractos liofilizados fue realizada mediante la derivatización de los mismos utilizando Cloruro de Aluminio (14). Los flavonoides totales fueron evaluados mediante un ensayo colorimétrico desarrollado por Zhi-shen y col. (1999). Una alícuota de 1 mL de solución de muestra o estándar de quercetina diluidas apropiadamente (20, 40, 60, 80 and 100 mg/L) fue añadida a un matraz aforado de 10 mL conteniendo 4 mL de H_2O . A tiempo cero, 0,3 mL de NaNO_2 (5%, w/w) fue añadido al matraz. Después de 5 minutos, 0,3 mL de AlCl_3 (10% w/w) fue adicionado. Después de 6 minutos, 2 mL de NaOH (1M) fue añadido a la mezcla. Inmediatamente, el volumen del frasco en que se produce la reacción fue diluido con la adición de 2,4 mL de H_2O y mezclado vigorosamente.

La absorbancia de la mezcla, caracterizada por un color rosa, fue determinada a 510 nm usando agua como blanco. La cantidad de flavonoides totales fue expresada como gramos de flavonoides totales equivalentes a quercetina por cada 100 gramos de extracto liofilizado. Para la quercetina, la curva de calibración de absorbancia en función de la concentración fue descrita mediante la ecuación $A = 0,001 C + 0,0015$.

c. Ensayo Biológico

Ratones hembra de experimentación *Mus musculus* de la cepa BALB/c (3-4 meses de edad), con pesos que oscilaban entre 25-35 g fueron usados para la evaluación de comportamiento. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (luz a las 07h00 am) a una temperatura ambiental constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Los animales fueron albergados en grupos de 5 individuos por caja (30 cm x 37 cm x 16 cm) con alimento y agua ad libitum, excepto durante el experimento. Todos los animales fueron adaptados a las condiciones del laboratorio por al menos una semana previa al estudio de evaluación del comportamiento.

El vehículo (propilenglicol 15% v/v), clonazepam (0,5 mg/kg) disuelto en el vehículo, los extractos hidroalcohólicos liofilizados de *P. edulis*, *P. tripartita*, *P. mixta*, *P. quadrangularis*, *P. manicata*, *P. ligularis* (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg) disueltos en el vehículo, el vehículo, el fármaco y los extractos fueron administrados por vía oral 30 minutos antes del experimento.

El laberinto en cruz elevado o EPM por sus siglas en inglés se compone de dos brazos abiertos perpendiculares (30cm x 5cm) y dos brazos cerrados perpendiculares (30cm x 5cm x 25cm). Los brazos abiertos y cerrados se conectan por una plataforma central (5cm x 5cm). El laberinto se encuentra a 50 cm por encima del suelo. Una hora después de los tratamien-

tos orales, el animal se coloca en el centro del laberinto con su nariz en la dirección de uno de los brazos cerrados. El ratón se observa durante 5 minutos, y el parámetro controlado es el tiempo de permanencia del animal en los brazos abiertos y cerrados. Los compuestos ansiolíticos reducen la aversión natural del animal para huir hacia los brazos cerrados y promueven la exploración de los brazos abiertos. El aparato debe limpiarse cuidadosamente con una solución de etanol al 10% después de cada prueba (15)

d. Análisis de datos

Los datos del estudio farmacológico fueron analizados mediante un ANOVA de un factor, seguido por el test de Dunnett en caso de encontrarse diferencias significativas $p < 0,05$.

RESULTADOS

a. Material Vegetal

El material vegetal y los extractos obtenidos presentaron características físico-químicas y organolépticas propias de la especie.

b. Identificación y cuantificación

La evaluación del contenido de flavonoides demuestra que el extracto hidroalcohólico de *Passiflora manicata* posee el contenido más abundante de flavonoides totales. Tabla 1. Reportes anteriores sobre la riqueza en estos componentes de *P. edulis* 4.60% son aproximados al obtenido en este estudio (10).

Se han determinado cantidades importantes de compuestos flavónicos en las demás especies del género *Passiflora* en estudio, siendo objeto de interés por la magnitud en concentración que presentan de estos componentes *P. mixta*, *P. ligularis* y *P. tripartita*.

La composición en flavonoides de los extractos de *P. mixta* y *P. tripartita* en

Especie	Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina en gramos por 100 gramos de extracto hidroalcohólico liofilizado, %
<i>Passiflora quadrangularis</i>	8,16±0,42
<i>Passiflora manicata</i>	58,33±2,22
<i>Passiflora edulis</i>	7,74±0,21
<i>Passiflora ligularis</i>	30,18±1,38
<i>Passiflora mixta</i>	37,73±0,45
<i>Passiflora tripartita</i>	14,51±0,42

Tabla 1. Contenido de flavonoides totales expresados como quercetina en gramos por 100 gramos de extracto hidroalcohólico

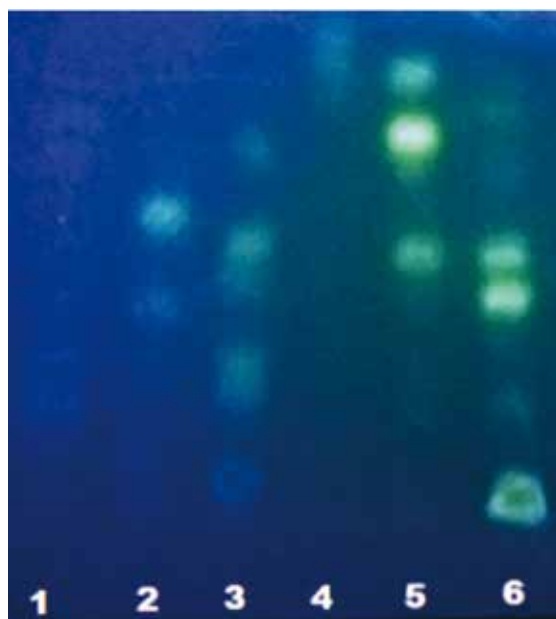


Figura 1. Cromatografía en capa fina de soluciones preparadas a una concentración de 200 ppm de los extractos hidroalcohólicos liofilizados de: 1. *P. edulis*, 2. *P. quadrangularis*, 3. *P. mixta*, 4. *P. ligularis*, 5. *P. manicata*, 6. *P. tripartita*

función de los resultados obtenidos en el perfil cromatográfico revelan una composición similar (Figura 1), a diferencia del *P. tripartita* debido a la intensidad de las manchas se podría esperar una concentración algo superior; sin embargo, no es así, aunque la fluorescencia que exhiben sus compuestos es pronunciada, esto podría deberse a la longitud de onda a la que se realiza la cuantificación.

P. ligularis y *P. manicata* presentaron un compuesto en común que no se pudo determinar, sin embargo, muestra un valor de R_f de aproximadamente 0,9. Asimismo, *P. manicata* exhibió un compuesto en común con *P. mixta* y *P. tripartita* con un R_f alrededor de 0,6 que podría tratarse de orientina (13). *P. ligularis* presentó apenas un par de compuestos que no poseen mayor fluorescencia a la luz UV.

En *P. edulis* y *P. quadrangularis* se observaron igualmente un par de compuestos comunes con valores de Rf de 0,5 y 0,7 aproximadamente; que podrían asociarse con derivados de apigenina y/o luteolina (13).

c. Ensayo biológico

Los resultados están descritos en la Tabla 2. Todos los grupos evaluados fueron comparados con el vehículo. En los casos de *P. quadrangularis*, *P. manicata* y *P. ligularis* no existe diferencia entre los grupos tratados y el vehículo.

Clonazepam (0,5 mg/kg) fue utilizado como fármaco estándar ansiolítico. El clonazepam administrado a los sujetos de experimentación denota un incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del dispositivo utilizado en el ensayo (Laberinto en Cruz elevado) $p < 0,05$.

d. Análisis estadístico

Los animales tratados con *P. mixta* (25 y 50 mg/kg) y *P. edulis* (25 y 50 mg/kg) exhibieron un incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del dispositivo $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El modelo de laberinto en cruz elevado es uno de los más populares ensayos preclínicos para evaluar agentes ansiolíticos (16). Autores como Pellow en 1985, sugirieron que la variable más importante para detectar efectos ansiolíticos es el incremento de permanencia en los brazos abiertos de EPM (10). Tanto *P. edulis* como *P. mixta*, a dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg exhiben efectos ansiolíticos de acuerdo con el modelo de laberinto en cruz elevado. Sin embargo, al igual que en trabajos anteriores *P. edulis*

demuestra un incremento en la actividad locomotora, lo cual se asocia de manera general a un efecto sedante menor con respecto al Clonazepam. De los estudios disponibles, el extracto acuoso de hojas de *Byrsocarpus coccineus* a dosis de 50 y 100 mg/kg presentó actividad ansiolítica in vivo, mostrando efecto más pronunciado a dosis de 100mg/kg(17). Mientras que el efecto ansiolítico de extractos hidroalcohólicos de *P. alata* a dosis de 100 y 150 mg/kg y *P. edulis* a dosis de 50, 100 y 150 mg/kg mostraron efectos ansiolíticos, sin embargo, *P. edulis* a dosis de 50 y 100 mg/kg incrementaron la actividad locomotora sugiriendo un menor efecto sedativo en comparación con el diazepam (10). En tanto, *Passiflora incarnata* y *Passiflora edulis* se estableció que el extracto metanólico de *P. incarnata* muestra una actividad ansiolítica significativa a una dosis de 125 mg / kg por vía oral, mientras que *P. edulis* estaba desprovista de cualquier actividad significativa (11).

Las especies vegetales poseen diversas actividades biológicas entre ellas mejorar las funciones cerebrales e influir en el sistema nervioso central (18), lo que se atribuye a la presencia de metabolitos secundarios que actúan frecuentemente como agonistas o antagonistas de neurotransmisores(19), o debido a que forman análogos estructurales de hormonas endógenas (20). En la literatura disponible se asocia a los flavonoides con la activi-

Tiempo de permanencia brazos abiertos (minutos)							
Especie	Propilenglicol 15%, V/V	Clonazepam 3 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
<i>P. edulis</i>	1,38±0,15	4,94±0,08	2,03±0,87	1,59±0,36	1,28±0,53	1,08±0,17	1,01±0,45
<i>P. ligularis</i>	1,75±0,68	4,76±0,33	0,20±0,10	0,08±0,02	0,18±0,06	0,11±0,05	0,30±0,08
<i>P. quadrangularis</i>	1,34±1,63	2,47±2,42	0,44±0,30	0,30±0,20	0,57±0,44	0,13±0,13	0,35±0,44
<i>P. manicata</i>	0,89±0,74	1,86±1,91	0,27±0,35	0,38±0,28	0,37±0,40	0,20±0,23	0,06±0,05
<i>P. tripartita</i>	0,42±0,25	4,88±0,24	0,14±0,15	0,23±0,31	0,20±0,25	0,37±0,33	0,47±0,32
<i>P. mixta</i>	0,22±0,06	4,86±0,22	1,95±0,29	2,03±0,34	0,33±0,13	0,18±0,08	0,85±1,6

Los resultados son el promedio±SD de al menos 5 repeticiones.

Tabla 2. Resultados de la prueba de laberinto elevado en cruz para 6 especies de *Passiflora*.

dad ansiolítica (9)(10)(12). Compuestos como crisina son considerados como potenciales ligandos centrales del receptor de benzodiacepina aislado de *Passiflora coerulea*, (21)

En cuanto a los resultados de los componentes fitoquímicos de las especies que han denotado actividad ansiolítica, el extracto hidroalcohólico de *P. mixta* posee casi cinco veces más contenido de flavonoides totales expresados como quercetina que su correspondiente de *P. edulis*. De la misma forma se señala que el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. edulis* presentó casi el doble del contenido de flavonoides que *P. alata*.(10) Sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre el contenido de flavonoides y la actividad ansiolítica. Cabe recalcar, que es importante considerar la diferente composición de flavonoides en los extractos.

En el caso de *P. manicata* en la que se han reportado los compuestos vitexina, isovitexina e isoorientina (22), los dos primeros compuestos se han probado puros y no presentan actividad ansiolítica, entre tanto; se ha descrito que isoorientina posee un muy leve efecto

ansiolítico (10); en esta investigación se ha corroborado que el extracto hidroalcohólico de *P. manicata* no posee actividad ansiolítica significativa en el modelo de prueba.

CONCLUSIONES

De las seis especies de *Passiflora*, respecto a la actividad ansiolítica la que mejor resultados presentó fue *P. edulis* mientras que la de menor efecto fue *P. manicata*, sin embargo *P. manicata* exhibió un porcentaje elevado de flavonoides totales por lo que se podría estudiar por sus efectos antioxidantes.

Se puede establecer que la presencia de otros compuestos presentes en los extractos de *P. mixta* y *P. edulis* serían responsables de su efecto farmacológico. Sin embargo, posteriores estudios serían necesarios para evaluar el potencial de los compuestos de especies de *Passiflora* en Ecuador con fines ansiolíticos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a la Facultad de Ciencias por brindar las facilidades para el desarrollo de esta investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

1. Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2015. Quinto informe nacional para el convenio sobre la diversidad biológica. Quito - Ecuador. 36-38.
2. Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2008. Revisión del avance y situación actual del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador (PANE). Quito - Ecuador. 56-72.
3. Jørgensen PM, León-Yañes S. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press. 779-783.
4. Escobar LK. Passifloraceae. 1988. In: Flora de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia; 138.
5. Hernández A, Bernal R. 2000. Lista de especies de Passifloraceae de Colombia. Biota Colomb. 1 Suppl 3:320-35.
6. Kinghorn GR. Passion, stigma, and STI. 2001. Sex Transm Infect. 77 Suppl 5:370
7. Miroddi M, Calapai G, Navarra M, Minciullo PL, Gangemi S. 2013. *Passiflora incarnata* L. Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. J Ethnopharmacol. 150 Suppl 3:791-804.
8. Matsui Y, Sugiyama K, Kamei M, Takahashi T, Suzuki T, Katagata Y, et al. 2010. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. J Agric Food Chem. 50 Suppl 20:11112-8.
9. Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. *Passiflora*: A review update. J Ethnopharmacol. 94 Suppl 1:1-23.

10. Petry RD, Reginatto F, De-Paris F, Gosmann G, Salgueiro JB, Quevedo J, et al. 2001. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phyther Res.* 15 Suppl 2:162–4.
11. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. 2001. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia.* 72 Suppl 6:698–702.
12. Gazola AC, Costa GM, Castellanos L, Ramos F a., Reginatto FH, Lima TCM De, et al. 2015. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. *Rev Bras Farmacogn.* 25 Suppl 2:158–63.
13. Wagner H, Bladt S. 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.* Analytica Chimica Acta. 383.
14. Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S, Bouaziz M. 2013. Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, *Pelargonium graveolens*. *Phyther Res.* 1206–1213.
15. Cardoso Vilela F, Soncini R, Giusti-Paiva A. 2009. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *J Ethnopharmacol.* 124 Suppl 2:325–7.
16. Vogel HG. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays.* Vol 1. 3era ed; 2008.
17. Akindele A, Adeyemi O. 2010. Anxiolytic and sedative effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) extract. *Int J Appl Res Nat Prod.* 3 Suppl 1:28–36.
18. Kennedy DO Do, Wightman EEL. 2011. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr A* 2:32–50.
19. Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 64 Suppl 3:19.
20. Miller A, Heyland A. 2010. Endocrine interactions between plants and animals: Implications of exogenous hormone sources for the evolution of hormone signaling. *Gen Comp Endocrinol.* 455–61.
21. Wolfman C, Viola H, Paladini A, Dajas F, Medina JH. 1994. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora Coerulea*. *Pharmacol Biochem Behav.* 1 Suppl 47:1–4.
22. Da Silva Morrone M, De Assis AM, Da Rocha RF, Gasparotto J, Gazola AC, Costa GM, et al. 2013. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation in vitro and ex vivo models. *Food Chem Toxicol.* 60:45–51.