



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Tielen Viana da Silva

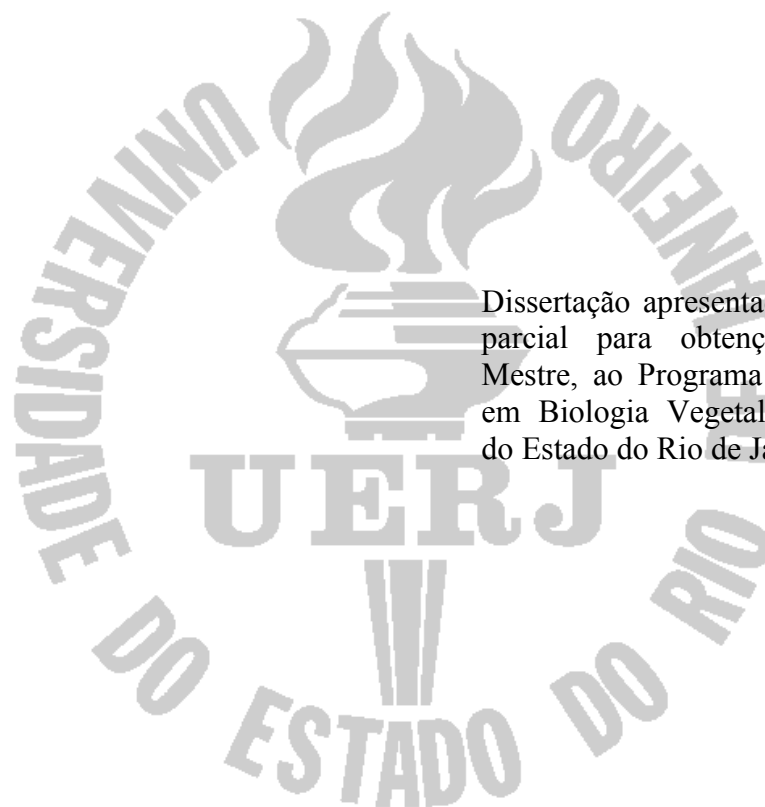
**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de  
materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis**

Rio de Janeiro

2021

Tielen Viana da Silva

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S586 Silva, Tielen Viana da.  
Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis/ Tielen Viana da Silva. – 2021.  
98 f. : il.

Orientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida.  
Coorientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Passiflora - Teses. 2. Maracujá - Propagação *in vitro* - Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. I. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. II. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

Patricia Bello Meijinhos CRB-7/ 5217- Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte

---

Assinatura

---

Data

Tielen Viana da Silva

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante  
de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2021.

Orientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Coorientadora:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Simões-Gurgel  
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira  
Farmanguinhos - FIOCRUZ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Carolina Anholeti da Silva Virginio  
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha avó, que tanto valorizam a minha educação. Seu apoio e amor foram fundamentais em cada uma das minhas escolhas.

Ao Paulo, pelo companheirismo, incentivo e amor. Obrigada por não me deixar pirar.

À família do meu coração, meu irmão Alan, meus sobrinhos, meus padrinhos Elma e Eduardo, meu avô Luiz e minha madrastra Rosemere, por todo o incentivo, presença e carinho, sempre que precisei.

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Georgia Pacheco, por ser exatamente quem eu precisava para não desanimar da pós-graduação. Não tenha dúvida do quanto sua compreensão, persistência, dedicação e amor ao que faz nos motivam a sermos melhores cientistas e professores, e quem sabe, um pouquinho que seja, pessoas incríveis como você.

À minha co-orientadora, Dr.<sup>a</sup> Elisabeth Mansur, por me aceitar na equipe do Labmit e por toda contribuição na minha formação.

À toda equipe do Labmit, que mesmo durante a pandemia e o distanciamento social, conseguiu se manter unida e ser fundamental para a saúde mental uns dos outros. E um agradecimento especial à Renatinha, Marcela, Raphaela, Isabela, Jamine e Vinicius, por tornarem mais felizes o dia-a-dia no laboratório.

Aos integrantes de NBV, Leila, Bianka, Vinicius e Ecktor, pela convivência tão fácil e cooperativa, além de todo o apoio e incentivo oferecido. Nilda e Eduardo, obrigada pelas análises e pela disponibilidade em me auxiliar.

À equipe do Labplan, por serem vizinhos tão cooperativos. Obrigada pelos espaços nas câmaras de crescimento e equipamentos cedidos sempre que necessário.

À Dr.<sup>a</sup> Rachel Gagliardi, pela revisão deste trabalho e todo apoio que sempre me concedeu com enorme boa vontade.

Aos membros da banca avaliadora, por tão gentilmente aceitarem avaliar e ler este trabalho. Dr.<sup>a</sup> Cláudia Simões-Gurgel, obrigada pelo tempo e dedicação empregados no acompanhamento da escrita.

À CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo auxílio financeiro.

Seja lá o que esteja procurando, não virá da forma que você está esperando.

*Haruki Murakami*

## RESUMO

SILVA, Tielen Viana da. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis.** 2021. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Passiflora alata* Curtis, conhecida como maracujá doce, possui grande interesse agrônomo devido ao seu fruto doce e flores vistosas. É considerada uma planta medicinal, reconhecida pela Farmacopeia Brasileira e utilizada como matéria-prima para fitoterápicos e cosméticos. Estudos identificaram atividades ansiolítica, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras, associadas principalmente, à presença de flavonoides, saponinas e alcaloides em suas folhas e frutos. A produção dessas substâncias bioativas por meio das técnicas de cultura de tecidos vegetais tem sido obtida com sucesso em diversas espécies. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de substâncias bioativas e o potencial antioxidante de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. alata*. Para isso, plantas *in vitro* foram obtidas a partir da germinação de sementes em meio MS ½. Calos friáveis foram induzidos a partir de segmentos foliares excisados de plantas propagadas *in vitro* e cultivados em meio MSM suplementado com picloram (PIC) a 28,9 µM e mantidos na presença ou ausência de luz. Adicionalmente, calos mantidos na ausência de luz foram utilizados para indução de culturas de células em suspensão (CCS). Para o estabelecimento de culturas de raízes adventícias, segmentos radiculares proximais e distais de plantas propagadas *in vitro* ou daquelas derivadas da germinação *in vitro* foram cultivados na presença de diferentes concentrações das auxinas AIB, AIA e ANA a 25°C ou 30°C. A maior multiplicação de raízes foi observada a partir de segmentos proximais excisados de plantas derivadas da germinação *in vitro*, na presença de AIB a 5,7 µM e temperatura de 25°C. Extratos etanólicos (80 %) de folhas de plantas obtidas *in vivo*, aclimatizadas e propagadas *in vitro*, assim como de calos mantidos na presença ou ausência de luz, foram analisados por cromatografia em camada delgada. Foi detectada a presença de flavonoides e alcaloides nos extratos de folhas, e de saponinas nos extratos de todos os materiais analisados. Os extratos de folhas foram ainda analisados por CLAE-DAD-UV e CLAE-EM, nos quais foram encontradas diversas substâncias, entre elas os flavonoides vitexina-2''-O-ramnosídeo e isoorientina, além da saponina quadrangulosídeo. Os mesmos materiais foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante por meio dos ensaios de captura do radical DPPH e da capacidade quelante de íons ferrosos. Todos os extratos apresentaram capacidade antioxidante, sendo os maiores potenciais observados nos extratos de folhas. Por outro lado, o extrato de calos mantidos na ausência de luz apresentou baixa capacidade antioxidante. Esses resultados revelaram o potencial de sistemas biotecnológicos para a produção de substâncias bioativas em *P. alata*.

**Palavras-chave:** Alcaloides. Calos friáveis. Cultura de células em suspensão. Flavonoides. Maracujá doce. Raízes adventícias. Saponinas.



## ABSTRACT

SILVA, Tielen Viana da. **Phytochemical characterization and evaluation of the antioxidant activity of *in vivo* and *in vitro*-derived materials of *Passiflora alata* Curtis.** 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

*Passiflora alata* Curtis, known as sweet passion fruit, has great agronomic interest due to its sweet fruits and exuberant flowers. It is considered a medicinal plant, recognized by the Brazilian Pharmacopeia, and used as a raw material for herbal medicines and cosmetics. Studies have identified anxiolytic, antioxidant, anti-inflammatory activities, among others, mainly associated with the presence of flavonoids, saponins and alkaloids in their leaves and fruits. The production of these bioactive compounds using plant tissue culture techniques has been successfully achieved in several species. Thus, the objective of this work was to evaluate the production of bioactive compounds and the antioxidant potential of *in vivo* and *in vitro* materials of *P. alata* materials. *In vitro* plants were obtained by seed germination on MS ½ medium. Friable calluses were induced from leaf segments excised from micropropagated plants and cultured on MSM medium supplemented with 28.9 µM picloram (PIC), in the presence or absence of light. Additionally, friable calluses maintained in the absence of light were used to induce cell suspension cultures. For the establishment of adventitious roots cultures, proximal and distal root segments were excised from micropropagated plants or from those derived from *in vitro* germination, and cultured in the presence of different concentrations of the auxins AIB, AIA and ANA at 25°C or 30°C. Root multiplication was observed from proximal segments excised from plants derived from *in vitro* germination, in the presence of 5.7 µM AIB, maintained at 25°C. Phytochemical analysis of leaf extracts from *in vivo*, acclimatized and *in vitro*-grown plants, as well as of extracts of calluses maintained in the presence or absence of light, was carried out by thin-layer chromatography. Flavonoids and alkaloids were detected in leaf extracts, whereas saponins were observed in all analyzed materials. Leaf extracts were also analyzed by HPLC-UV-DAD and HPLC-EM, in which several compounds could be detected, including the flavonoids vitexin-2"-*O*-rhamnoside and isoorientin, and the saponin quadranguloside. The same materials were investigated in terms of their antioxidant capacity using the DPPH scavenge and the iron chelating assays. All extracts showed antioxidant capacity, with the greatest potential observed in leaf extracts. On the other hand, calluses extract maintained in the absence of light displayed low antioxidant capacity. These results revealed the potential of biotechnological systems for the production of bioactive compounds in *P. alata*.

**Keywords:** Alkaloids. Friable calluses. Suspension cell culture. Flavonoids. Sweet passion fruit. Adventitious roots. Saponins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Diversidade de frutos e flores de espécies do gênero <i>Passiflora</i> .....	17
Figura 2 –	Estruturas de flavonoides C-glicosilados encontrados em espécies de <i>Passiflora</i> .....	20
Figura 3 –	Estruturas dos tipos de saponinas triterpênicas encontradas em espécies de <i>Passiflora</i> .....	21
Figura 4 -	<i>Passiflora alata</i> Curtis .....	23
Figura 5 -	Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina pelo método da captura do radical DPPH .....	40
Figura 6 -	Curva padrão do agente quelante EDTA pelo método da capacidade quelante de íons ferrosos .....	41
Figura 7 -	Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Passiflora alata</i> após remoção completa do tegumento .....	43
Figura 8 -	Calos friáveis de <i>Passiflora alata</i> obtidos a partir de explantes foliares cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 $\mu\text{M}$ , por 30 dias .....	44
Figura 9 –	Suspensões celulares de <i>Passiflora alata</i> mantidas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 $\mu\text{M}$ .....	45
Figura 10 –	Acúmulo de biomassa de culturas de células em suspensão de <i>P. alata</i> obtidas após 30 dias de cultura em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 $\mu\text{M}$ .....	46
Figura 11 –	Raízes adventícias de <i>Passiflora alata</i> obtidas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas derivadas da germinação <i>in vitro</i> e cultivados em diferentes concentrações de AIB, após 60 dias em cultura .....	48
Figura 12 –	Plantas de <i>Passiflora</i> em processo de aclimatização .....	49
Figura 13 –	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de flavonoides em diferentes materiais obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Passiflora alata</i> .....	51

Figura 14 -	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de saponinas em diferentes materiais obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Passiflora alata</i> .....	53
Figura 15 -	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de alcaloides em diferentes materiais obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Passiflora alata</i> .....	53
Figura 16 -	Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de <i>Passiflora alata</i> obtidas <i>in vivo</i> , aclimatizadas e produzidas <i>in vitro</i> , com detecção em UV <sub>280 nm</sub> .....	55
Figura 17 -	Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de <i>Passiflora alata</i> obtidas <i>in vivo</i> , aclimatizadas e produzidas <i>in vitro</i> , com detecção em UV <sub>340 nm</sub> .....	56
Figura 18 -	Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de <i>Passiflora alata</i> obtidas <i>in vivo</i> , aclimatizadas e produzidas <i>in vitro</i> , com detecção em UV <sub>420 nm</sub> .....	57
Figura 19 -	Cromatogramas de íons totais (CITs), pela técnica de CLAE-UV-IES-EM, de extratos de folhas de <i>Passiflora alata</i> .....	59
Figura 20 -	Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-IES-EM, dos extratos de folhas de <i>Passiflora alata</i> , dos 13,3 aos 13,9 minutos .....	60
Figura 21 -	Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-IES-EM, dos extratos de folhas de <i>Passiflora alata</i> , dos 20,5 aos 20,8 minutos .....	61
Figura 22 -	Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-IES-EM, dos extratos de folhas de <i>Passiflora alata</i> , dos 20,9 aos 21,3 minutos .....	62
Figura 23 -	Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de diferentes materiais de <i>Passiflora alata</i> obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	65
Figura 24 -	Capacidade quelante de íons ferrosos por extratos de diferentes materiais de <i>Passiflora alata</i> obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	66

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	Atividades biológicas descritas para a espécie <i>Passiflora alata</i> .....	25
Tabela 1 –	Substâncias, detectadas por CLAE-UV-IES-EM, em extratos de folhas de <i>Passiflora alata</i> .....	63
Tabela 2 –	Potencial antioxidante de diferentes materiais de <i>Passiflora alata</i> avaliados pelo ensaio de captura do radical DPPH .....	64
Tabela 3 –	Potencial antioxidante avaliado pela capacidade quelante de íons ferrosos de diferentes materiais de <i>Passiflora alata</i> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido naftaleno acético
ANOVA	Análise de variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTV	Cultura de Células e Tecidos Vegetais
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	Espectrometria de Massas
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
IES	Ionização por <i>Electrospray</i>
MEP	Via do fosfato de 2-metileritritol
MEV	Via do Mevalonato
MS	Meio de Murashige & Skoog
MSM	Meio MS modificado por Monteiro e colaboradores (2000)
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NP/PEG	<i>Natural products</i> /polietilenoglicol
PF	Peso Fresco
PIC	Picloram
PS	Peso Seco
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
UV	Ultravioleta
tR	Tempo de retenção
λ <sub>máx.</sub>	Comprimento de onda de absorção máxima

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
1.1	<b>Diversidade e importância econômica do gênero <i>Passiflora</i> L.</b> .....	16
1.1.1	<u><i>Passiflora alata</i> Curtis</u> .....	22
1.2	<b>Produção de metabólitos secundários <i>in vitro</i></b> .....	26
1.2.1	<u>Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários em espécies de <i>Passiflora</i></u> .....	30
2	<b>OBJETIVO</b> .....	32
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
3.1	<b>Material Vegetal</b> .....	33
3.2	<b>Germinação <i>in vitro</i></b> .....	33
3.3	<b>Condições de cultura e obtenção das culturas primárias</b> .....	34
3.4	<b>Indução de calogênese</b> .....	34
3.5	<b>Estabelecimento de culturas de células em suspensão</b> .....	34
3.6	<b>Estabelecimento de culturas de raízes adventícias</b> .....	35
3.7	<b>Aclimatização</b> .....	35
3.8	<b>Avaliação fitoquímica</b> .....	36
3.8.1	<u>Preparo dos extratos vegetais</u> .....	36
3.8.2	<u>Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u> .....	36
3.8.3	<u>Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u> .....	37
3.8.3.1	CLAE-DAD-UV .....	37
3.8.3.2	CLAE-DAD-UV-IES-EM .....	38
3.9	<b>Avaliação do potencial antioxidante</b> .....	39

3.9.1	<u>Ensaio de captura do radical DPPH</u> .....	39
3.9.2	<u>Ensaio da capacidade quelante de íons ferrosos</u> .....	40
3.10	<b>Análise estatística</b> .....	42
4	<b>RESULTADOS</b> .....	43
4.1	<b>Germinação <i>in vitro</i> e estabelecimento de culturas primárias</b> .....	43
4.2	<b>Estabelecimento de culturas de calos</b> .....	44
4.3	<b>Estabelecimento de culturas de células em suspensão</b> .....	45
4.4	<b>Estabelecimento de culturas de raízes adventícias</b> .....	47
4.5	<b>Aclimatização</b> .....	49
4.6	<b>Avaliação fitoquímica</b> .....	50
4.6.1	<u>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u> .....	50
4.6.1.1	Análise de flavonoides .....	50
4.6.1.2	Análise de saponinas .....	50
4.6.1.3	Análise de alcaloides .....	53
4.6.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	54
4.6.2.1	CLAE-DAD-UV .....	54
4.6.2.2	CLAE-UV-IES-EM .....	58
4.7	<b>Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	64
4.7.1	<u>Ensaio de captura do radical DPPH</u> .....	64
4.7.2	<u>Ensaio da capacidade quelante de íons ferrosos</u> .....	65
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	78
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79

## INTRODUÇÃO

O interesse por substâncias bioativas de origem vegetal (metabólitos secundários ou especiais) é antigo e vem aumentando com o avanço de tecnologias que permitem produzi-las em larga escala, assim como elucidar suas vias de biossíntese e seus mecanismos de ação. (SIMÕES et al., 2017). Além disso, o enorme potencial farmacológico dos metabólitos secundários suscita a necessidade de mais estudos para identificação e produção sustentável dos mesmos, principalmente levando em conta o impacto que sua exploração descontrolada na natureza pode causar. A coleta predatória e a destruição de ecossistemas têm levado à extinção e perda da variabilidade genética de espécies vegetais.

A produção de metabólitos secundários em plantas pode variar conforme a origem e a maturidade do tecido e como resposta a estímulos bióticos e abióticos, incluindo agentes causadores de estresse (patógenos, competidores, predadores, raios UV etc), polinizadores, dispersores, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa forma, técnicas que permitam atender a demanda da produção de plantas e metabólitos, de maneira uniforme, segura e em larga escala são consideradas importantes alternativas ao cultivo tradicional.

As técnicas de cultura de células e tecidos vegetais (CTV) permitem a produção e propagação de plantas a partir de pequenos fragmentos de tecidos cultivados em condições assépticas e controladas (luz, umidade e temperatura) (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). A produção de substâncias bioativas por meio das técnicas de CTV já é possível em escala industrial desde 1978, e traz grandes vantagens em termos de uniformização dos extratos vegetais produzidos e modulação da concentração das substâncias desejadas (CHATURVEDI et al., 2007; LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006). Além disso, permitem modular a produção das substâncias de interesse, por meio da exploração de alguns fatores como luz, temperatura, fitorreguladores, umidade, trocas gasosas, eliciação, adição de precursores e seleção de linhagens produtoras (FUMAGALI et al., 2008; GRAFI et al., 2011; DIAS et al., 2016). Contudo, embora os benefícios da produção de substâncias bioativas com o uso de ferramentas biotecnológicas sejam notáveis, ainda são escassos e necessários os estudos que caracterizem e avaliem essas substâncias em muitas espécies de plantas, como é o caso das espécies de *Passiflora*.

*Passiflora alata* Curtis, conhecida popularmente como maracujá doce, possui um grande interesse agrônômico, sendo a segunda espécie de maracujá mais comercializada no Brasil, e muito utilizada como planta ornamental (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2009). Assim



como outras espécies do gênero *Passiflora*, *P. alata* é considerada uma planta medicinal, com atividades ansiolítica, antioxidante, anti-inflamatória, gastroprotetora, antitumoral, imunoestimulante, sedativa e antidepressiva, associadas à presença de flavonoides, saponinas e alcaloides (ANDRADE et al., 2019).

Dessa forma, este trabalho visa fornecer informações relevantes sobre a produção de substâncias de interesse medicinal de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. alata*.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Diversidade e importância econômica do gênero *Passiflora* L.

Dentro da família Passifloraceae Juss. ex Roussel, o gênero *Passiflora* L. se destaca pela quantidade de espécies, sendo mais de 530, e pela importância econômica (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003). Suas espécies estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América e, de forma mais rara, na África, Ásia e Austrália (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Atualmente, são descritos cinco subgêneros de *Passiflora*: *Astrophea* (Ohwi) Rechb., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) M. Roem., *Passiflora* Raf. e *Tetrapathea* (DC.) P. S. Green (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003; KROSNICK; FORD; FREUDENSTEIN, 2009). O subgênero *Passiflora* reúne cerca de 250 espécies, possuindo o maior número de espécies conhecidas, cujo principal centro de diversidade é a América do Sul (KROSNICK et al., 2013; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Popularmente conhecidas como maracujás, as espécies de *Passiflora* são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, predominantemente perenes e raramente arbustivas, com presença de gavinhas axilares que, em alguns casos, estão reduzidas a espinhos. Suas folhas podem ser simples, inteiras, lobadas ou palmadas e as flores, presentes na maioria das espécies, são grandes, actinomorfas, com cores e formas variadas. Possuem frutos indeiscentes, principalmente globosos ou ovoides, com cores e tamanhos variados, casca espessa e sementes envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). A Figura 1 ilustra parte da diversidade de frutos e flores encontrada em espécies de *Passiflora*.

**Figura 1** - Diversidade de frutos e flores de espécies do gênero *Passiflora*.



Fotos: John Ocampo-Pérez; Oliver P. Quillia; Amani A.

Fontes: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Frutos\\_de\\_las\\_principales\\_especies\\_cultivadas\\_de\\_Passiflora.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Frutos_de_las_principales_especies_cultivadas_de_Passiflora.jpg)>; <[https://fr.wikipedia.org/wiki/Passiflora\\_incarnata#/media/Fichier:OQ\\_Passion\\_flower.jpg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Passiflora_incarnata#/media/Fichier:OQ_Passion_flower.jpg)>; <<https://www.flickr.com/photos/80530175@N08/>>; <<https://www.ireceptar.cz/zahrada/jak-pestovat-mucenky-aby-kvetly-i-plodily.html>>; <<http://www.biodiversityexplorer.info/plants/passifloraceae/passiflora.htm>>. Acesso em: 14 Mar. 2020.

Os maracujás despertam grande interesse comercial devido à qualidade de seus frutos muito consumidos *in natura* ou processados na forma de sucos, sorvetes e doces (CORRÊA et al., 2016). São considerados alimentos funcionais, fontes de fibras, vitaminas (ácido ascórbico, riboflavona,  $\beta$ -caroteno, vitamina A e B3), cálcio e fósforo, oferecendo além das funções nutricionais básicas, benefícios à saúde e ao combate a doenças crônicas e degenerativas (BVS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No entanto, apesar de cerca de 30 espécies nativas de maracujá produzirem frutos comestíveis, o cultivo comercial de maracujá no Brasil está baseado apenas nas espécies *Passiflora edulis* Sims (e suas variedades amarelo e roxo), que responde por cerca de 90 % dos pomares nacionais, *P. alata* Curtis (maracujá doce, maracujá açúcar, maracujá mamão), *P. setacea* D.C. (maracujá do sono, maracujá do cerrado, maracujá pérola, maracujá sururuca, maracujá de cobra) e *P. cincinnata* Mast. (maracujá do mato, maracujá da caatinga) (FALEIRO et al., 2019).

Nas últimas décadas, o Brasil despontou como o maior produtor mundial de maracujá, sendo responsável por quase 60 % da produção mundial (OLIVEIRA et al., 2016). A liderança da produção nacional é devida ao desenvolvimento desta cultura nos últimos 30 anos, alcançada através de pesquisas para o desenvolvimento de variedades e híbridos geneticamente melhorados, bem como a melhoria do sistema de produção (CASTRO et al., 2012). A produção anual de maracujá no Brasil é de cerca de 600.000 toneladas, e está concentrada principalmente na região Nordeste (IBGE, 2018).

Para além do uso na indústria alimentícia, o maracujá também desperta interesse para uso ornamental, devido às suas flores exuberantes, e na indústria cosmética, para fabricação de sabonetes, xampus e cremes com ação anti-envelhecimento e proteção solar (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2013). Adicionalmente, possui grande importância medicinal, sendo utilizado tradicionalmente, desde o século XIX (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). A importância etnofarmacológica de algumas espécies é reconhecida de forma abrangente pelo mundo, estando *Passiflora incarnata* L., *P. alata* e *P. edulis* presentes em farmacopeias de diferentes países, incluindo a brasileira (GOSMANN et al., 2011).

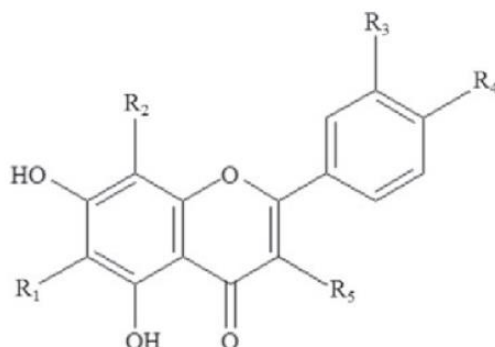
O potencial medicinal das espécies de *Passiflora* tem sido investigado a partir dos conhecimentos trazidos pela medicina popular, que utilizam suas folhas e flores em preparações como chás e emplastos para o tratamento de ansiedade, insônia, infecções e asma (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Diversos estudos têm demonstrado experimentalmente tais efeitos em diversas espécies do gênero e novas atividades têm sido relatadas, entre elas as ações antioxidante (COLOMEU et al., 2014; LUGATO et al., 2014; MORRONE et al., 2013; RAMAIYA et al., 2013; ROTILI et al., 2013; RUDNICKI et al.,

2007; SILVA et al., 2013; SIMÃO et al., 2016; ZERAIK et al., 2011), anti-inflamatória (FIGUEREDO et al., 2016; MONTANHER et al., 2007; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013; SASIKALA et al., 2011; VARGAS et al., 2007; ZUCOLOTTO et al., 2009), anti-hiperglicêmica (COLOMEU et al., 2014; GUPTA et al., 2012; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013; SALGADO et al., 2010), antifúngica (RIBEIRO et al., 2012), antidepressiva (AYRES et al., 2015; WANG et al., 2013), antiepiléptica (SINGH; SINGH; GOEL, 2012), anti-hipertensiva (ICHMURA et al., 2006; PATEL et al., 2011), analgésica (ASADUJJAMAN et al., 2014; SASIKALA et al., 2011; SHANMUGAM et al., 2016), antibacteriana (LOPES-VARGAS et al., 2013; PATIL, 2010; RAMAIYA et al., 2014; SIEBRA et al., 2016; SIMÃO et al., 2018), anticonvulsivante (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007), antiviral (MÜLLER et al., 2007), imunoestimulante (SILVEIRA et al., 2011), antitumoral (AMARAL et al., 2019; OZAROWSKI et al., 2018), diurética (DHAWAN, DHAWAN; SHARMA, 2004), ansiolítica (ASLANARGUN et al., 2012; DE-PARIS et al., 2002; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002; REGINATTO et al., 2006) e gastroprotetora (WASICKY et al., 2015).

Muitos dos constituintes bioativos que podem estar associados aos efeitos farmacológicos observados em espécies de *Passiflora* têm sido descobertos ao longo dos últimos 40 anos, incluindo, principalmente, flavonoides, alcaloides e saponinas.

Os flavonoides, em especial os C-glicosilados como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (Figura 2), são frequentemente descritos em *Passiflora*, variando quantitativa e qualitativamente entre diferentes espécies e partes das plantas. Essas substâncias têm sido associadas às atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antiespasmódica, hepatoprotetora e estrogênica, entre outras (HARBONE; WILLIAMS, 2000; NIJVELDT et al., 2001; KUMAR; PANDEY, 2013; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008). A crisina, um flavonoide isolado de *P. incarnata*, apresentou atividade anticonvulsivante e ansiolítica em modelo experimental com camundongos (ZANOLI et al., 2000). Um estudo conduzido por Coleta e colaboradores (2006) verificou o efeito ansiolítico do extrato aquoso de *P. edulis*, associando-o ao flavonoide luteolina-7-O-[2-ramnosilglicosídeo] isolado de uma fração de flavonoides purificada. O conteúdo de fenóis totais foi relacionado de forma linear à capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos (90 %) de *P. alata* (LUGATO et al., 2014) e de extratos hidroalcoólicos (40 %) de *P. alata* e *P. edulis* (RUKDNICKI et al., 2007).

**Figura 2** - Estruturas de flavonoides C-glicosilados encontrados em espécies de *Passiflora*.



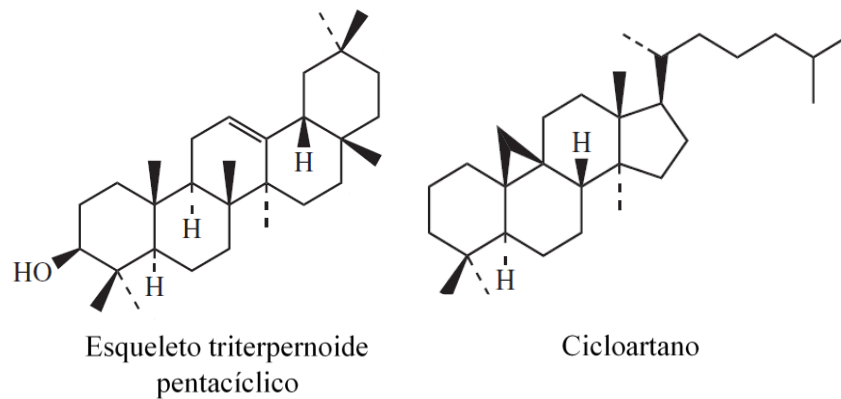
Flavonoides	Aglicona	R1	R2	R3	R4	R5
Isoorientina	Luteonina	Gli	H	OH	OH	H
Orientina	Luteonina	H	Gli	OH	OH	H
Vitexina	Apigenina	H	Gli	H	OH	H
Isovitexina	Apigenina	Gli	H	H	OH	H

Gli = glicose

Fonte: Modificado de GOMES et al. (2017).

Na classe das saponinas, diversas substâncias são frequentemente encontradas em *Passiflora* (Figura 3). As principais atividades biológicas associadas a estes metabólitos são anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, analgésica, hemolítica, antiviral e capacidade de complexar com o colesterol, entre outras (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 2000; FRANCIS et al., 2002). Em um estudo, Wang e colaboradores (2013) associaram os efeitos antidepressivos de *P. edulis* às saponinas triterpênicas do tipo cicloartano encontradas nas suas folhas. Além das saponinas triterpênicas, também já foram identificadas saponinas esteroidais em folhas e caules de *P. edulis*, *P. alata* e *P. pohlii* Mast. (GOSMANN et al., 2011; REGINATTO et al., 2001; SIMÃO et al., 2016; YOSHIKAWA et al., 2000a, 2000b). Em raízes de *P. pohlii*, a presença de saponinas foi relacionada à alta capacidade antioxidante detectada em extratos desse órgão. Yuldasheva e colaboradores (2005) identificaram atividade hemolítica dose-dependente no extrato aquoso de folhas de *P. quadrangularis* L., relacionando este efeito a uma fração *n*-butanólica rica em saponinas. Interessantemente, o estudo ainda apresentou uma preferência de ação das saponinas do extrato pelo colesterol de lipossomas, em relação ao colesterol presente na membrana de hemácias.

**Figura 3** - Estruturas triterpênicas das principais saponinas encontradas em espécies de *Passiflora*.

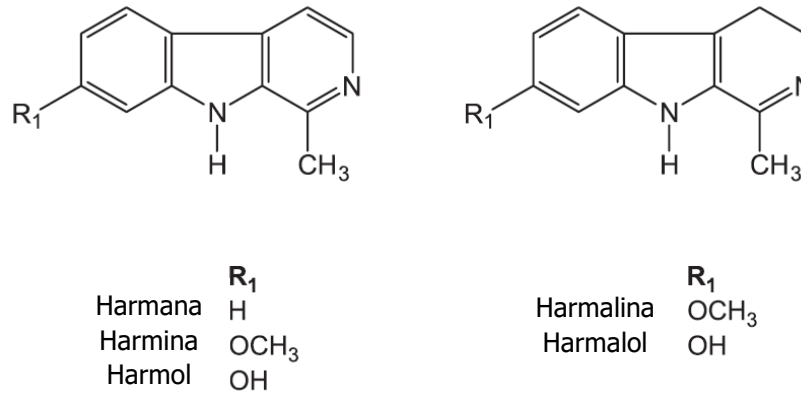


Fonte: Modificado de DEWICK (2009).

Os alcaloides também são encontrados no gênero, principalmente os do tipo indólico ( $\beta$ -carbolínicos), como harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina, já descritos em diferentes materiais de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* (ABOURASHED et al., 2003; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; FREIRE; SILVA; YARIWAKE, 2018; OGA et al., 1984; REHWALD et al., 1995; SLAYTOR; MCFARLANE, 1968; SOULIMANI et al., 1997; TSUCHIYA; SHIMIZU; IINUMA, 1999) (Figura 4). O núcleo indólico, característico de suas estruturas químicas, tornam essas substâncias farmacologicamente ativas, sendo frequentemente relacionadas a efeitos no sistema nervoso, como ansiolítico e sedativo, além de efeitos como anti-hipertensivo (HARBORNE; BAXTER, 1995; LUTOMSKI; MALEK, 1976; ZERAIK, 2010). Outros componentes encontrados em espécies de *Passiflora* são os glicosídeos cianogênicos, carotenoides, aminoácidos, carboidratos e óleos essenciais, os quais corroboram o uso do maracujá como alimento funcional (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ZERAIK et al., 2010).

A detecção desses constituintes bioativos em *Passiflora* tem sido realizada, principalmente, através de técnicas cromatográficas capazes de identificar, quantificar e isolar tais substâncias, como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (BALLESTEROS-VIVAS et al., 2019; BIRK et al., 2005; DE-PARIS et al., 2002; ELSAS et al., 2011; MCCULLAG et al., 2019; OZAROWSKI et al., 2013; PONZILACQUA et al., 2019; REGINATTO et al., 2006; SAKALEM et al., 2012; SIMÃO et al., 2018; VAGULA et al., 2019; ZERAIK et al., 2011; ZUCOLOTTO et al., 2012).

**Figura 4** - Estruturas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos encontrados em espécies de *Passiflora*.



Fonte: Modificado de FREIRE; SILVA; YARIWAKE, 2018.

A técnica de CCD permite análises rápidas de um grande número de amostras simultaneamente, além de ser de fácil execução e baixo custo, possibilitando a identificação de substâncias em extratos vegetais a partir da aplicação dos padrões das substâncias estudadas (BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005; WAGNER; BLADT, 2001). Por outro lado, a CLAE oferece vantagens em termos de sensibilidade e quantidade de dados obtidos, pois permite o uso de diferentes detectores (UV, condutividade elétrica, fluorescência, eletroquímico, índice de refração e espectrômetro de massas) associados ao sistema de análise (HA et al., 2006; ZERAIK, 2010). Quando associada a um detector UV de rede de diodos (CLAE-UV-DAD), por exemplo, a técnica permite determinar os espectros de absorvância das substâncias presentes na amostra, em diferentes comprimentos de onda (STEINMANN; MARKUS GANZERA, 2011). Já a associação a um espectrômetro de massas (CLAE-EM), viabiliza a identificação das estruturas presentes nas amostras por meio da determinação da massa, da carga e da estrutura da forma ionizada de seus componentes (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

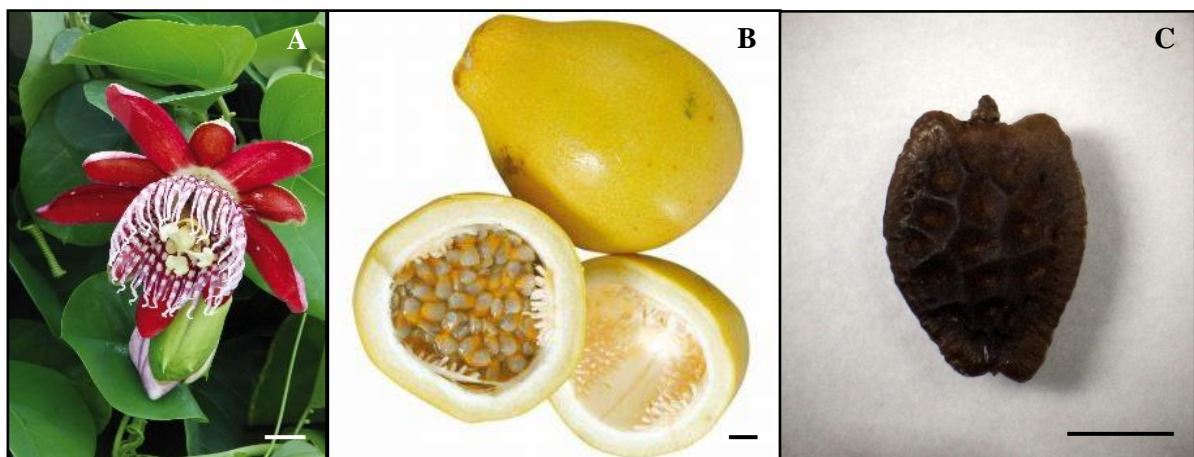


### 1.1.1 *Passiflora alata* Curtis

A espécie *Passiflora alata*, descrita por W. Curtis em 1788, é conhecida popularmente como maracujá doce, maracujá mamão, maracujá de refresco, maracujá do grande, maracujá alado, maracujá açu ou maracujá de comer (FALEIRO et al., 2005). É nativa da América do Sul, distribuindo-se do nordeste do Peru ao leste do Brasil, da Bahia até o Rio Grande do Sul, encontrando-se em ecossistemas de restinga, floresta atlântica e floresta estacional (FLORA DO BRASIL, 2020).

É uma trepadeira robusta, de caule quadrangular, com gavinhas, folhas ovadas ou ovado-oblongas, inteiras e com margem lisa ou finamente denticulada, e com pecíolo curto com estípulas pequenas. As flores são exuberantes em tamanho e cor (variando de 7 a 15 cm de altura e 5 a 10 cm de largura), hermafroditas, pentâmeras com sépalas e pétalas carnosas e avermelhadas na face adaxial (Figura 5 A). Sua floração ocorre entre agosto e março, sendo polinizadas por abelhas do gênero *Xylocopa*. Produzem frutos ovais ou periformes, de coloração amarela a laranja quando maduros, entre os meses de dezembro e maio (Figura 5 B). As sementes são cordadas e faveoladas, com tamanhos que variam de 7 a 8 mm de comprimento (Figura 5 C) (CERVI, 1997).

**Figura 5 - *Passiflora alata* Curtis.**



Legenda: A) Flor; B) Fruto; C) Semente. Barras = 1 cm.

Fonte: A e B: <<https://revistanatureza.com.br/maracuja/>>; C: A autora. Acesso em: 22 Fev. 2020.

Devido ao sabor doce e pouco ácido do seu fruto, *P. alata* tem ganhado espaço nas prateleiras dos mercados brasileiros, ficando atrás apenas do maracujá azedo (*P. edulis*), e sendo consumido tanto *in natura*, como na forma de suco e doces. Além disso, devido às suas flores vistosas, a espécie também é muito apreciada como planta ornamental (FALEIRO et al., 2019).

*Passiflora alata* é também considerada uma planta medicinal, reconhecida pela Farmacopeia Brasileira (2019) e utilizada como matéria-prima para fitoterápicos difundidos comercialmente, como é o caso da Maracugina® e do Ritmoneuran®. É ainda utilizada na formulação de cosméticos, na forma de cremes de rejuvenescimento e higiene pessoal (OLIVEIRA; CAMPOS; SILVA, 2015).

As propriedades benéficas dos frutos e folhas do maracujazeiro doce são conhecidas popularmente. Seu uso tradicional está associado a riqueza de bioativos encontrados nas diferentes partes da planta, como fibras, vitaminas, ácidos graxos e substâncias com potencial antioxidante (CORRÊA et al., 2016; SOUZA et al., 2012).

A investigação do potencial farmacológico de *P. alata* resultou na determinação das atividades ansiolítica (BARBOSA et al., 2008; DE-PARIS et al., 2002; PETRY et al., 2001; REGINATTO et al., 2006), antioxidante (COLOMEU et al., 2014; FIGUEREDO et al., 2016; LUGATO et al., 2014; RUDNICKI et al., 2007; ZERAIK et al., 2011), anti-inflamatória (FIGUEREDO et al., 2016; LORENCINI et al., 2008; MOREIRA et al., 2011; VARGAS et al., 2007), gastroprotetora (WASICKY et al., 2015), antitumoral (AMARAL et al., 2019; OZAROWSKI et al., 2018), imunoestimulante (SILVEIRA et al., 2011), sedativa e antidepressiva (KLEIN et al., 2014; OGA et al., 1984) (Quadro 1).

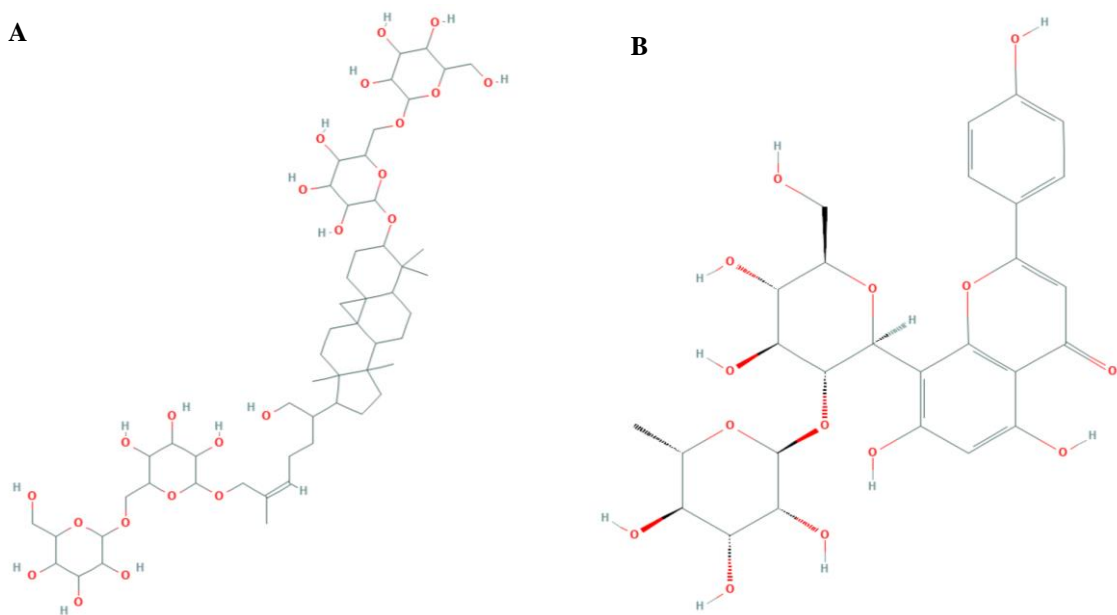
Entre as substâncias bioativas já identificadas em *P. alata*, as saponinas são encontradas majoritariamente nas folhas. Até o momento, foram isoladas quatro saponinas triterpênicas, incluindo o quadrangulosídeo, que corresponde a cerca de 8,2 % da massa das folhas secas, além de uma saponina do tipo esteroideal (REGINATTO et al., 2001; REGINATTO et al., 2004) (Figura 6 A). Os flavonoides são outro grupo de substâncias encontradas em folhas de *P. alata*. Análises cromatográficas já identificaram a presença dos flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e vitexina 2''-O-ramnosídeo (CHABARIBERI et al., 2009; DOYAMA et al., 2005; MORAES et al., 1997; MULLER et al., 2005; OGA et al., 1984; PETRY et al., 2001; PEREIRA et al., 2004; ULUBELEN et al., 1982; WOSCH et al., 2017; ZUCOLOTTO et al., 2012), além de alcaloides do tipo harmana (LUTOMSKI; MALEK et al., 1975; OGA et al., 1984) (Figura 6 B).

**Quadro 1** - Atividades biológicas descritas para a espécie *Passiflora alata*.

<b>Material vegetal</b>	<b>Extrato</b>	<b>Modelo Experimental</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Substância detectada / associada</b>	<b>Referência</b>
Folhas	Etanólico	Ensaio <i>in vitro</i> de MTT	Antitumoral (carcinoma do cólon, glioblastoma, adenocarcinoma ovariano e leucemia promielocítica)	Não detectado	AMARAL et al., 2019
Folhas	Metanólico	Ensaio <i>in vitro</i> de MTT	Antitumoral (leucemia linfoblástica aguda humana)	Não detectado	OZAROWSKI et al., 2018
Folhas	Aquoso, metanólico/acetona e etanólico	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos	Anti-inflamatória e antioxidante (inibiu a ocorrência de diabetes do tipo 1)	Não detectado	FIGUEIREDO et al., 2016; COLOMEU et al., 2014
Partes aéreas	Etanólico	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos	Gastroprotetora	Saponinas	WASICKY et al., 2015
Folhas	Aquoso	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos e <i>in vitro</i>	Anti-inflamatória	Flavonoides	LORENCINI et al., 2008; MOREIRA et al., 2011; VARGAS et al., 2007
Folhas e fruto	Etanólico e metanólico	Ensaio antioxidantes e <i>in vitro</i>	Antioxidante	Flavonoides	LUGATO et al., 2014; RUDNICKI et al., 2007; ZERAIK et al., 2011
Folhas	Aquoso e etanólico	Ensaio <i>in vivo</i> em ratos	Ansiolítica	Flavonoides	BARBOSA et al., 2008; DE-PARIS et al., 2002; PETRY et al., 2001; REGINATTO et al., 2006
Folhas e pericarpo	Aquoso	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos	Sedativa e antidepressiva	Não detectado	KLEIN et al., 2014; OGA et al., 1984

Legenda: Ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação da viabilidade celular.

**Figura 6** - Estruturas das substâncias bioativas majoritárias em *P. alata*.



Legenda: A) Quadrangulosídeo e B) vitexina 2''-O-ramnosídeo.

Fonte: PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

## 1.2 Produção de metabólitos secundários *in vitro*

Diferentes dos metabólitos primários, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de todas as plantas, os metabólitos secundários (ou especiais) são substâncias produzidas pelas plantas para possibilitar sua interação com o ambiente, permitindo sua sobrevivência e propagação. Os tipos de metabólitos são característicos para cada espécie ou grupo taxonômico vegetal e sua produção varia conforme o estímulo recebido, em muitos casos atuando como sinais químicos na defesa contra herbivoria e patógenos e na proteção contra raios UV (KESSLER; KALSKE, 2018; TAIZ; ZEIGER, 2004). Comumente, a produção de determinados metabólitos ocorre em órgão(s) ou tecido(s) específico(s) ou em determinados estágios de desenvolvimento da planta. Ademais, em geral, a parte da planta em que são produzidos difere da parte onde são estocados e sua concentração pode variar ao longo do dia (RAVEN et al., 2011).

As plantas produzem uma enorme variedade de metabólitos secundários, que podem ser classificados de acordo com suas vias metabólicas (DEWICK, 2009; SIMÕES et al.,

2017). Pela via do acetato, ocorre a produção de policetídeos, como por exemplo, poliacetilenos, ácidos graxos, prostaglandinas, antibióticos macrolídeos, antraquinonas e tetraciclina. Pela via do chiquimato, são produzidos alcaloides aromáticos e fenilpropanoides, estes últimos utilizados como base para síntese de lignanas, ligninas, cumarinas, flavonoides e estilbenos. Nas vias do mevalonato (MEV) e do fosfato de 2-metilerytritol (MEP), são produzidos terpenoides e esteroides, como saponinas triterpênicas e esteroidais e glicosídeos cardioativos (DEWICK, 2009).

A utilização dessas substâncias derivadas das plantas com objetivos medicinais pelo homem já ocorre há milênios, tornando as plantas uma fonte imensurável de fármacos. Atualmente, grande parte das terapias para doenças e distúrbios biológicos são desenvolvidas a partir de metabólitos secundários de origem vegetal (SIMÕES et al., 2017). As descobertas dessas substâncias e de suas propriedades tem ocorrido de maneira lenta, através da pesquisa de plantas utilizadas popularmente, principalmente por comunidades indígenas e rurais. No entanto, ainda são poucos os esforços empregados na identificação e uso dos metabólitos secundários de forma abrangente. Além disso, a destruição de florestas e ecossistemas e a coleta predatória tem levado a perdas cada vez maiores de espécies e variabilidade, principalmente de parentes silvestres das espécies cultivadas.

A importância das plantas como fontes de substâncias bioativas consiste no fato de que são produzidas naturalmente, e que essa produção pode ser estimulada alterando-se condições externas. Além disso, muitas das moléculas bioativas produzidas possuem estruturas complexas, de síntese difícil e dispendiosa em laboratórios, sendo mais facilmente obtidas por meio de sistemas vegetais do que por síntese química (TIWARI; RANA, 2015).

A utilização das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais (CTV) com o objetivo de produzir metabólitos secundários de interesse farmacêutico teve seu início nos anos de 1950 (DIAS et al., 2016). No final dos anos 1970, a CTV foi consolidada como uma ferramenta viável para produção de metabólitos em escala industrial na Alemanha e no Japão e o avanço dessas técnicas tem possibilitado a produção *in vitro* de várias substâncias de interesse farmacêutico, em alguns casos superando a produção convencional (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006; SILPA; ROOPA; THOMAS, 2018).

As técnicas de CTV são baseadas no conceito de que as células vegetais são totipotentes, ou seja, possuem o potencial para desenvolver-se em uma planta completa em resposta a estímulos adequados. No entanto, nem todas as células estão aptas a responder aos sinais extracelulares para se rediferenciar e assim formar novos órgãos; aquelas que mantêm

essa capacidade ou a adquirem são denominadas competentes (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GRAFI et al., 2011).

Nas técnicas de CTV, plantas completas ou pequenos fragmentos de tecidos, denominados explantes, são cultivados em condições assépticas, em meio de cultura, sob condições controladas de luz, umidade e temperatura. Este sistema de produção controlada permite o aumento da uniformidade e a padronização dos extratos produzidos, assim como a modulação da concentração das substâncias desejadas (CHATURVEDI et al., 2007). Dos pontos de vista industrial e de pesquisa, esta técnica permite também corrigir problemas associados ao cultivo em solo, como a baixa taxa de crescimento em determinadas condições climáticas e o baixo rendimento da produção de metabólitos secundários associado às características fisiológicas da planta nas diferentes fases de desenvolvimento (CHATURVEDI et al., 2007).

A produção de plantas *in vitro* ocorre por três vias morfogênicas: a multiplicação de brotos a partir de meristemas pré-existentes, a organogênese e a embriogênese somática (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A cultura de tecidos meristemáticos pré-existentes é principalmente indicada para obtenção de plantas livres de vírus e para conservação de germoplasma. A formação de brotos ou plantas completas se dá a partir de ápices caulinares e radiculares ou gemas axilares, tecidos que são naturalmente competentes por serem formados por células indiferenciadas, com alta taxa de divisão (AHLOOWALIA et al., 2002).

Na organogênese, há a formação de brotos ou raízes adventícias a partir de tecidos diferenciados. Neste caso, ocorre a desdiferenciação das células, que voltam a um estágio similar ao meristemático e adquirem novas competências, seguida pela rediferenciação no novo órgão. A organogênese pode ocorrer de forma direta, quando o novo órgão é formado diretamente a partir do tecido de origem, ou de forma indireta, quando após a desdiferenciação ocorre uma etapa de multiplicação desordenada de células formando uma massa, denominada calo, para só então ocorrer a rediferenciação no novo tecido. Contudo, o método indireto pode elevar a possibilidade de ocorrência de variação genética (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GARCÍA-GONZÁLES et al., 2010).

A embriogênese somática é um processo de regeneração de embriões a partir de células somáticas. Os embriões somáticos são estruturas bipolares similares aos embriões zigóticos, passando inclusive pelos mesmos estágios de desenvolvimento presentes na embriogênese zigótica. Assim como na organogênese, esse sistema de regeneração pode ocorrer de forma direta ou indireta (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2010).

Para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, podem ser adotadas culturas organizadas, como as de brotos e raízes, que em geral exibem perfis fitoquímicos similares aos da planta de campo, ou culturas de crescimento desorganizado, como calos, que podem ser empregados para o estabelecimento de suspensões celulares, muito utilizadas para a produção em escala comercial (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A cultura de raízes *in vitro* é um sistema frequentemente usado para produção de substâncias de interesse, e isto é principalmente devido ao fato de que certos metabólitos secundários são sintetizados exclusivamente nesses órgãos (FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999; GIRI; ZAHEER, 2016; MURTHY, HAHN; PAEK, 2008). Por tratar-se de um sistema organizado e diferenciado, a cultura de raízes adventícias também oferece como vantagem a estabilidade genética e biossintética (BAQUE et al., 2012).

Culturas de raízes *in vitro* podem ser obtidas por duas formas distintas. A primeira é a partir da transformação genética com *Agrobacterium rhizogenes*, bactérias encontradas naturalmente no solo capazes de transferir um plasmídeo (Ri, de *root inducing*) que se integra ao DNA vegetal e induz o desenvolvimento e a proliferação das chamadas “hairy roots” (BAIS et al., 2001; FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999). A segunda forma é através da utilização de reguladores de crescimento, especialmente aqueles da classe das auxinas, e/ou modulação das condições físicas da cultura, como luz e temperatura, induzindo assim a formação de raízes adventícias. Diferente das raízes primárias, as raízes adventícias possuem origem pós-embriônica e podem ser formadas a partir da organogênese direta ou indireta (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; GIRI; ZAHEER, 2016; LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK; TOWN, 2005; MURTHY et al., 2014). Ambos os métodos são bastante utilizados para produção de metabólitos de interesse, no entanto, nas “hairy roots”, por se tratarem de culturas transformadas, muitas vezes são usados marcadores de seleção que podem atribuir resistência a antibióticos ou a herbicidas, o que gera controvérsias quanto à segurança alimentar dos produtos obtidos (MURTHY; HAHN; PAEK, 2008).

Sistemas de culturas de raízes adventícias têm sido importantes para a produção de metabólitos secundários *in vitro* em diversas espécies, incluindo *Panax ginseng* (KIM et al., 2009), *Arachis hypogaea* (YANG et al., 2015), *Aloe vera* (LEE et al., 2011), *Decalepis arayalpathra* (SUDHA; SEENI, 2001), *Passiflora pohlii* (SIMÃO et al., 2016), *Passiflora foetida* (CARUSO, 2017) e *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009; CORDEIRO et al., 2015).

As culturas desorganizadas, como calos e suspensões celulares, constituem também sistemas muito utilizados para a produção de metabólitos de interesse (DIAS et al., 2016; GONÇALVES; ROMANO, 2013; GUPTA et al., 2013; NAGELLA; MURTHY, 2010;

WANG et al., 2015; YUE et al., 2016), embora possam sofrer perdas na capacidade de produção e acúmulo de metabólitos por não se tratarem de tecidos diferenciados (DIAS et al., 2016; MURTHY, HAHN; PAEK, 2008).

Os calos podem ser induzidos através da adição de fitorreguladores aos meios de cultura e/ou de alterações nas condições físicas de cultivo. O balanço hormonal, determinado pela concentração de hormônios endógenos e de fitorreguladores adicionados ao meio, juntamente com outras condições de cultivo, como presença ou ausência de luz, pode induzir os processos de desdiferenciação e multiplicação desordenada das células do explante, características de indução de calogênese (GRAFI et al., 2011; IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013). Dependendo da espécie, as células do calo podem apresentar competência para organogênese ou embriogênese somática. Dessa forma, os calos podem ser classificados como morfogênicos, quando possuem capacidade de rediferenciação, ou não-morfogênicos, quando não são capazes de se rediferenciar (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013; SUGIMOTO; GORDON; MEYEROWITZ, 2011). Além disso, os calos podem ainda ser classificados de acordo com suas características macroscópicas e graus de compactação, em calos friáveis, compactos ou mistos (FUMAGALI et al., 2008; IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

Nos calos friáveis, as células estão menos compactadas e são facilmente dissociadas umas das outras, podendo assim ser utilizadas para o estabelecimento de culturas de células em suspensão (FUMAGALI et al., 2008; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Nessas culturas, células livres ou pequenos agregados celulares são mantidos em meio de cultura líquido sob agitação, permitindo assim um maior contato com os nutrientes. Este sistema é indicado para estudos bioquímicos e para produção *in vitro* de metabólitos para muitas espécies vegetais pois possibilita alta taxa de proliferação celular (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006). Entre as suas vantagens para a produção de metabólitos está o fácil isolamento das substâncias de interesse caso elas sejam secretadas para o meio, o que possibilita a separação e reutilização de grandes quantidades de células, enquanto o meio de cultura é desidratado para extração das substâncias. Além disso, nessas culturas, as células sofrem colisões constantes causadas pela agitação da mesa giratória na qual o sistema está apoiado, sendo esse choque um agente causador de estresse que pode levar a alterações do metabolismo e possível estímulo para a produção de substâncias de interesse (KUMAR, 2018).



### 1.2.1 Produção *in vitro* de metabólitos secundários em espécies de *Passiflora*

Apesar dos efeitos biológicos demonstrados pelos metabólitos presentes em espécies de *Passiflora*, ainda são poucos os estudos envolvendo a produção *in vitro* de substâncias bioativas de interesse medicinal no gênero. Por outro lado, o desenvolvimento e otimização de protocolos de cultivo *in vitro* e transformação genética de espécies de *Passiflora* têm sido bem estudados, visando à produção de cultivares geneticamente melhoradas para fins comerciais (alimentar e ornamental) e protocolos de conservação *in vitro* de plantas e seus materiais (CORREA et al., 2015; FALEIRO et al., 2019; FARIA et al., 2018; GARCIA et al., 2011 a,b; LUGATO et al., 2014; MERHY et al., 2014; PACHECO et al., 2012,2016; PINTO et al., 2010; SIMÃO et al., 2016, 2018 a,b; SOARES et al., 2012).

Em culturas de calos de *P. quadrangularis*, a eliciação com UV-B ou metil jasmonato aumentou a produção dos flavonoides orientina, isorientina, vitexina e isovitexina (ANTOIGNONI et al., 2007), enquanto que em culturas em suspensão de *P. garckeii* Mast., a produção de substâncias aromáticas foi aumentada após exposição a extrato de levedura (FRACCAROLI et al., 2008). Simão e colaboradores (2016) constataram a produção de flavonoides em folhas de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e investigaram a produção de saponinas em culturas de raízes adventícias dessa mesma espécie, em resposta a diferentes auxinas, demonstrando ainda a elevada capacidade antioxidante destes metabólitos.

Para *P. alata*, a produção de alcaloides harmanos em cultura de calos e células em suspensão foi investigada por Machado e colaboradores (2010) em resposta a diferentes fitorreguladores. No entanto, a produção destas substâncias não foi induzida nos sistemas testados. Em 2014, Lugato e colaboradores investigaram o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante de calos e suspensões celulares, além de folhas de plantas *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas dessa espécie. Dos materiais investigados, as folhas de plantas *in vivo*, aclimatizadas e *in vitro* mostraram os maiores potenciais antioxidantes, com valores de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) de 3,65; 3,12 e 5,26 mg/mL, respectivamente. A presença de luz aumentou a capacidade antioxidante de culturas de calos e células em suspensão. Além disso, foi observada uma relação linear positiva entre o conteúdo fenólico e o potencial antioxidante dos materiais testados. Até o presente momento, no entanto, não foram realizados estudos acerca da constituição fitoquímica de culturas de calos e células em suspensão de *P. alata*.

O Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ) tem desenvolvido, nos últimos 14 anos, estudos para o estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora*, incluindo *P. alata*, visando à conservação e à investigação da produção de substâncias bioativas *in vitro* (CARUSO, 2017; FALCÃO, 2011; GARCIA et al., 2011a, b; ; LUGATO et al., 2014; MERHY, 2014; MERHY et al., 2014; PACHECO et al., 2012; SIMÃO et al., 2016; SIMÃO et al., 2018a, b; VIANNA, 2016; VIANNA et al., 2019). Para *P. alata*, foram desenvolvidos sistemas para a produção *in vitro* de plantas, calos friáveis e células em suspensão (PACHECO et al., 2012), os quais tiveram seu conteúdo fenólico e capacidade antioxidante investigados (LUGATO et al., 2014). Além disso, foi demonstrado o potencial antibacteriano de folhas e raízes de plantas *in vitro* dessa espécie (SIMÃO et al., 2018a).

Dessa forma, considerando o potencial medicinal apresentado por plantas mantidas sob condições naturais e de materiais *in vitro* de *P. alata*, este trabalho visa estabelecer um sistema para a cultura de raízes adventícias, além de caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante de diferentes materiais dessa espécie obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro*.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a produção de substâncias bioativas e o potencial antioxidante de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis.

### **Objetivos específicos:**

- Induzir a produção de calos friáveis a partir de explantes foliares excisados de plantas *in vitro*, na presença ou ausência de luz;
- Induzir culturas de células em suspensão a partir de calos friáveis produzidos na presença ou ausência de luz;
- Comparar o potencial de segmentos radiculares excisados de plantas derivadas da germinação *in vitro* e de plantas propagadas *in vitro* para o estabelecimento de culturas de raízes adventícias, avaliando a influência de diferentes tipos e concentrações de auxinas e de diferentes temperaturas de cultivo;
- Aclimatizar plantas propagadas *in vitro*;
- Avaliar, por meio de CCD, a produção de flavonoides, saponinas e alcaloides em extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo*, aclimatizadas e produzidas *in vitro*, assim como de calos mantidos na presença ou ausência de luz;
- Avaliar o perfil fitoquímico de folhas de plantas *in vivo*, aclimatizadas e *in vitro*, por meio de CLAE e CLAE-EM;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos produzidos a partir dos diferentes materiais estudados, por meio dos ensaios de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e da capacidade quelante de íons ferrosos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. Material Vegetal

Sementes e folhas de plantas de *P. alata* mantidas sob condições naturais foram obtidas em uma propriedade particular situada no município de Iguaba Grande, Rio de Janeiro [22°51'12.3''S 42°14'11.7''W], nos períodos de julho de 2018 e fevereiro de 2020, respectivamente.

Um exemplar representativo de *P. alata* encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro H.RJ: 11.774.

#### 3.2. Germinação *in vitro*

As sementes de *P. alata* foram lavadas e escovadas com detergente Tween<sup>®</sup> 80 %, sob água corrente. A descontaminação foi realizada com solução de hipoclorito de sódio a 2,0 % por 40 minutos, sob agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas com água desionizada estéril três vezes em câmara de fluxo laminar, como estabelecido por Pacheco e colaboradores (2012), e mantidas em água desionizada estéril por cerca de cinco dias ou dispostas entre duas camadas de três folhas de papel de filtro Whatman<sup>®</sup> n°1 embebidas em solução de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 2,5 %, e incubadas por sete dias sob fotoperíodo de 16 h (FERREIRA et al., 2005).

Posteriormente ao período de incubação, as sementes tiveram o seu tegumento totalmente retirado com o auxílio de bisturi e foram inoculadas em frascos de cultura (10 cm x 6 cm; 250 mL), contendo 30 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração padrão de sais, vitaminas e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (MS ½) e solidificado com ágar a 0,75 %. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1,0 atm. Os frascos foram mantidos em estufa B.O.D. sob regime de temperaturas alternadas (30°C por 8 h luz e 20°C por 16 h escuro) (OSIPI; NAKAGAWA, 2005; PACHECO et al., 2012).

### 3.3. Condições de cultura e obtenção das culturas primárias

Plântulas axênicas derivadas da germinação *in vitro* foram utilizadas com fontes de explantes para obtenção das culturas primárias, após 90 dias da germinação. Ápices caulinares e segmentos nodais (3 – 5 cm) foram inoculados em meio MSM solidificado (MONTEIRO et al., 2000), contendo metade da concentração de sais, vitaminas do meio MSM e 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (MSM ½).

A manutenção das plantas foi realizada por meio de subculturas mensais de segmentos caulinares (3 - 5 cm), contendo de 4 a 6 segmentos nodais, inoculados em meio MSM ½ (GARCIA et al., 2011a). As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas/luz, com intensidade luminosa média de 46 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

### 3.4. Indução de calogênese

Segmentos foliares de 1 cm<sup>2</sup> foram excisados de plantas propagadas *in vitro* e inoculados em frascos de cultura (10 cm x 6 cm) contendo 30 mL de meio MSM solidificado suplementado com picloram (PIC) a 28,9 µM (PACHECO et al., 2012). Os explantes foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento, na ausência de luz, a 25°C ± 2°C, por 60 dias, visando à produção de calos friáveis. Após esse período, foram realizadas subculturas mensais para meio fresco de mesma composição, sendo os frascos mantidos no escuro ou transferidos para a presença de luz (fotoperíodo de 16 h, 46 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

### 3.5. Estabelecimento de culturas de células em suspensão

Para a indução de suspensões celulares, 3,0 g de calos friáveis foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio MSM líquido suplementado com PIC a

28,9  $\mu\text{M}$ . As culturas foram incubadas sob agitação (100 rpm), em mesa giratória orbital (Innova 2300) e mantidas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , na presença ou ausência de luz, por 30 dias (PACHECO et al., 2012).

Para a determinação da cinética de crescimento, dois frascos de cultura foram selecionados randomicamente para filtração a cada dois - três dias, durante um período total de 30 dias. Para a avaliação do acúmulo de biomassa, determinado pela aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS), as culturas foram filtradas a vácuo, utilizando como malha de filtração uma folha de papel filtro Whatman<sup>®</sup> n°1. O PS foi aferido após secagem do material em estufa a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

### 3.6. Estabelecimento de culturas de raízes adventícias

Segmentos com 1 cm de comprimento excisados das regiões distais e proximais (em relação à distância do caule) de raízes de plantas propagadas *in vitro* ou derivadas da germinação *in vitro* foram inoculados em frascos de vidro (10 cm x 6 cm; 250 mL) vedados com tampa de polipropileno, contendo 30 mL de meio MSM líquido suplementado com diferentes concentrações das auxinas ácido indolil-3-butírico (AIB) (0,49; 2,45; 4,9  $\mu\text{M}$ ), ácido indolil-3-acético (AIA) (0,57; 2,85; 5,7  $\mu\text{M}$ ) e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) (0,54; 2,7; 5,4  $\mu\text{M}$ ). Foram inoculados três explantes por frasco, sendo utilizados cinco frascos para explantes distais e cinco para explantes proximais, totalizando 10 frascos por tratamento. As culturas foram mantidas na ausência de luz, sob agitação (100 rpm) em mesa giratória orbital (Innova 2300), em duas diferentes temperaturas ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), por 60 dias (SIMÃO et al., 2016).

### 3.7. Aclimatização

A aclimatização de plantas foi realizada conforme protocolo estabelecido por Lugato (2012). Plantas completas obtidas após, pelo menos, 90 dias em cultivo *in vitro* foram

retiradas dos frascos e submetidas à lavagem do sistema radicular para retirada do meio de cultura. Os frascos foram lavados e o meio substituído por água da torneira. Em seguida, as plantas foram colocadas de volta nos vidros, que foram vedados com filme PVC para a conservação da umidade interna. O plástico foi perfurado progressivamente ao longo de sete dias e, após este período, as plantas foram transferidas para vasos contendo o substrato Top Garden Floreira® e cobertas com copo plástico descartável, o qual também foi perfurado de forma progressiva e retirado após 15 dias.

### 3.8. Avaliação fitoquímica

#### 3.8.1 Preparo dos extratos vegetais

Para a avaliação fitoquímica e análise da atividade antioxidante foram preparados extratos hidroalcoólicos de folhas de (i) plantas obtidas *in vivo*, (ii) plantas produzidas *in vitro*, (iii) plantas aclimatizadas mantidas no telado do NBV/UERJ e de calos friáveis cultivados por 120 dias e mantidos na presença ou na ausência de luz.

A extração foi realizada com etanol a 80 % durante 1 hora, em refluxo (1:40, planta:solvente, p/v), como descrito por Birk e colaboradores (2005). Os extratos foram filtrados em papel de filtro e secos em banho-maria a 90°C (SIMÃO et al., 2016).

Para as análises cromatográficas, amostras dos extratos foram ressolubilizadas em metanol, utilizando ultrassom.

#### 3.8.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Amostras dos diferentes extratos foram aplicadas sobre placas de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV<sub>254nm</sub>. Foram realizadas análises para a presença de flavonoides, saponinas e alcaloides.

Na análise de flavonoides, a fase móvel consistiu em acetato de etila:ácido acético glacial:ácido fórmico:água (51:6:1:7, v/v), com revelação através de NP/PEG 4000 (*Natural Products*/Polietilenoglicol) e visualização em câmara de UV<sub>365nm</sub> (WAGNER; BLADT, 2001). Foram utilizados, para fins de comparação, padrões dos flavonoides vitexina, orientina, isoorientina, rutina e vitexina-2''-O-raminosídeo (Sigma-Aldrich®).

Na análise de saponinas, a fase móvel foi constituída de clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8, v/v) (WAGNER; BLADT, 2001). A revelação das placas foi realizada com solução de anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100°C por 5 minutos, com visualização sob luz visível.

Para a análise de alcaloides, a fase móvel foi constituída por clorofórmio:acetona:dietilamina (50:40:10, v/v) e a visualização foi realizada em luz visível, após aplicação do reagente de Dragendorff e observação da reação colorimétrica (WAGNER; BLADT, 2001).

O R<sub>f</sub> das amostras e dos padrões foi calculado através da equação abaixo:

$$R_f = \frac{\Delta D_{amostra} (cm)}{\Delta D_{eluyente} (cm)}$$

Onde,  $\Delta D_{amostra} (cm)$  é a distância percorrida pela amostra na placa de sílica-gel em centímetros, e  $\Delta D_{eluyente} (cm)$  é a distância percorrida pelo eluente na placa de sílica-gel em centímetros (DA SILVA et al., 2014).

### 3.8.3 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 3.8.3.1 CLAE-DAD-UV

Para as análises por CLAE-DAD-UV, extratos hidroalcoólicos de *P. alata* preparados a partir de folhas de plantas obtidas *in vivo*, produzidas *in vitro* e aclimatizadas foram diluídos em metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil) na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram



solubilizados com auxílio de banho de ultrassom por 15 minutos, filtrados em filtros Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Merck<sup>®</sup>, Alemanha) e submetidos à análise em cromatógrafo líquido Agilent<sup>®</sup> 1260 Infinity, equipado com bomba LC-10AD, misturador FCV 10AL, degaseificador DDU-14A, forno CTO-10AS, controlador SCL-10A e detector de UV com arranjo de diodos (DAD-UV) SPD-M10A. As amostras foram separadas em coluna Thermo-scientific<sup>®</sup> Hypersil Gold RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 Å).

Para a determinação do perfil cromatográfico, a fase móvel foi constituída por 95% de água ultrapura MilliQ<sup>®</sup> acidificada com ácido acético PA (Sigma<sup>®</sup>) a pH 3,3, e 5% de acetonitrila grau HPLC (Tedia<sup>®</sup>), mantendo-se por 3 minutos de forma isocrática. Em seguida (3 – 40 minutos), ocorreu um gradiente com inversão para 100% de acetonitrila e 0% de água, mantendo-se novamente isocrático até 45 minutos, e finalmente regressando à condição inicial em 47 minutos. O fluxo da fase móvel foi mantido constante, a 1 mL/min, em temperatura ambiente (23°C). O detector foi programado para realizar a varredura entre os comprimentos de 200 e 480 nm, com taxa de atualização de 1 Hz.

### 3.8.3.2 CLAE-UV-IES-EM

As análises por CLAE-UV-IES-EM foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu<sup>®</sup> UPLC acoplado a um espectrofotômetro de massa quadrupolo Bruker<sup>®</sup> MicrOTOF-QII equipado com degaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC), detector de UV de comprimento de onda fixo (SPD20A), forno (CTO20A) e interface (CSM20A). Foram utilizadas a mesma coluna e as mesmas condições de fase móvel estabelecidas para a análise por CLAE-DAD-UV. Após a detecção em detector de UV em comprimento de onda de 254 nm, a fase móvel foi gaseificada por ionização electrospray à 180°C, com fluxo de nitrogênio 4 L/min, pressão de 0,4 Bar, voltagem do capilar de 4500 V. Os espectros de massas foram obtidos em ionização no modo negativo no intervalo massa/carga ( $m/z$ ) de 100 a 2500 e com energia de ionização de 10 eV, para o detector de tempo de voo. Os sinais obtidos foram transferidos para o detector triplo quadrupolo com funil ajustado em 200 Vpp, com energia de ionização de 5 eV. Os espectros foram visualizados no software Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

As análises foram realizadas em colaboração com a Central Analítica Fernanda Coutinho, do Instituto de Química da UERJ, sob a coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Regina da Costa Marques.

### 3.9 Avaliação do potencial antioxidante

#### 3.9.1 Ensaio de captura do radical DPPH

O potencial antioxidante dos materiais foi avaliado por meio da determinação da capacidade de captura do radical DPPH, utilizando-se a metodologia descrita por Brand-Williams e colaboradores (1995) e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

Amostras dos extratos foram ressuspensas em metanol 100% e diluídas em concentrações de 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 mg/mL. Em seguida, 25 µL de cada amostra foram adicionados a 975 µL de solução metanólica de DPPH a 60 µM e incubadas no escuro por 1 hora. Uma solução metanólica de DPPH a 60 µM foi utilizada como controle negativo. As leituras de absorvância foram obtidas com espectrofotômetro a 515 nm (Shimadzu UV-B382), sendo a porcentagem de captura do radical DPPH determinada através da equação abaixo:

$$\% \text{ DPPH capturado} = \left( \frac{Ac - Aa}{Ac} \right) \times 100$$

Sendo *Ac* a absorvância do controle negativo, e *Aa* a absorvância da amostra.

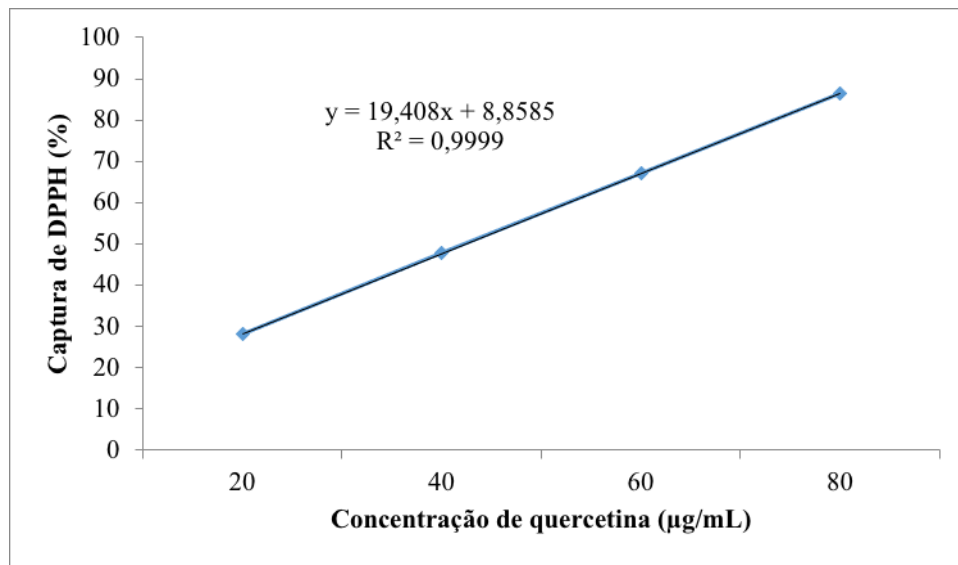
Foi calculada ainda a concentração eficaz (CE<sub>50</sub>), determinando assim a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Os valores do CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão linear dos pontos, em que o eixo das abscissas representa a concentração dos extratos (mg/mL) e o eixo das ordenadas, os valores da porcentagem de captura de DPPH, calculados pelas médias das triplicatas, de acordo com a equação abaixo:

$$y = -ax + b$$

Onde:  $y = 50$  e  $x = CE_{50}$  (mg/mL)

Os resultados foram comparados com uma curva padrão do antioxidante quercetina (Figura 7).

**Figura 7** - Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina pelo método da captura do radical DPPH.



### 3.9.2 Ensaio da capacidade quelante de íons ferrosos

O ensaio da capacidade quelante de íons ferrosos foi realizado conforme o método de Chew e colaboradores (2009) com modificações. Os extratos dos diferentes materiais foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,5; 1; 3 e 5 mg/mL), em triplicata. Alíquotas de 250 µL de cada diluição foram incubadas com 250µL de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) a 0,1 mM por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de ferrozina a 0,25 mM e as amostras incubadas por 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após este período, as leituras de absorbância foram efetuadas a 562 nm, em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S - ThermoScientific. Para fins de comparação, o

mesmo procedimento foi realizado utilizando EDTA em diferentes concentrações (5 – 50 µg/mL).

A capacidade quelante de íons ferrosos, em porcentagem, foi calculada pela equação a seguir:

$$\text{Atividade quelante de } Fe^{+2} (\%) = \frac{A_c - (A_a - A_b)}{A_c} * 100$$

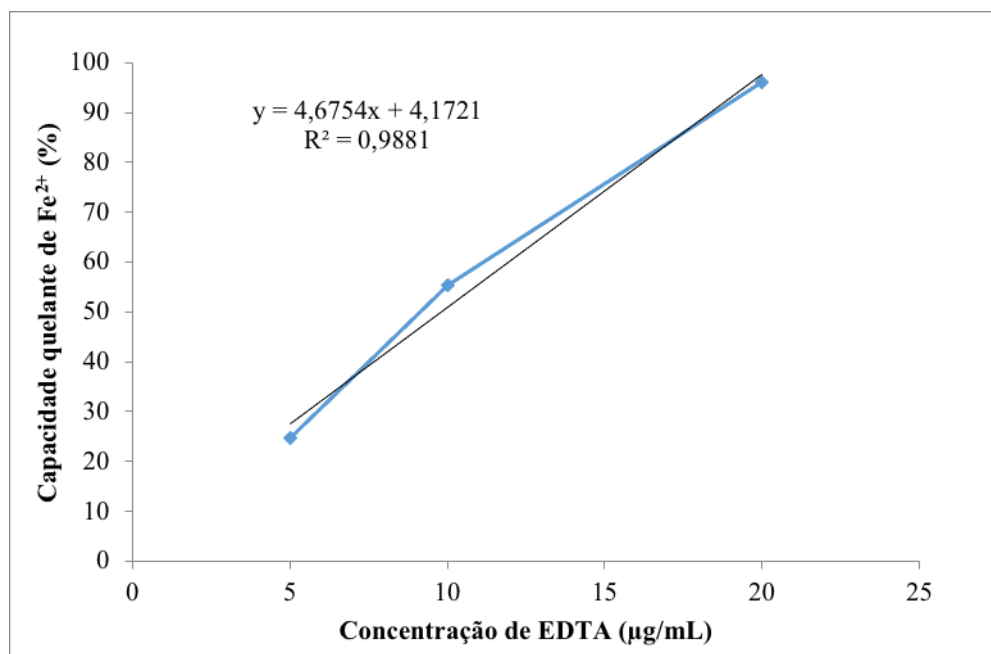
Onde  $A_c$  = absorvância do controle;

$A_a$  = absorvância da amostra;

$A_b$  = absorvância do branco.

Os resultados foram também calculados através da concentração eficaz ( $CE_{50}$ ) para a capacidade quelante de íons ferrosos, de forma similar ao descrito anteriormente. Para fins de comparação da atividade quelante dos extratos, foi obtida uma curva padrão utilizando diferentes concentrações do agente quelante EDTA (Figura 8).

**Figura 8** - Curva padrão do agente quelante EDTA pelo método da capacidade quelante de íons ferrosos.



### **3.10 Análise estatística**

Os experimentos de cultura de tecidos foram repetidos duas vezes, utilizando-se grupos de 15 explantes. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA one-way), e do teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 95% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), através do programa GraphPad Prism 7<sup>®</sup>.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Germinação *in vitro* e estabelecimento de culturas primárias

A germinação de sementes de *P. alata* após a escarificação de parte do tegumento com auxílio de bisturi, conforme estabelecido por Pacheco e colaboradores (2012), resultou em baixas taxas de germinação (dados não mostrados). Dessa forma, foi realizada a retirada completa do tegumento das sementes (Figura 9), o que resultou no desenvolvimento de plântulas de forma mais rápida e eficiente, aumentando a obtenção de matrizes.

**Figura 9** - Germinação *in vitro* de sementes de *Passiflora alata* após remoção completa do tegumento.



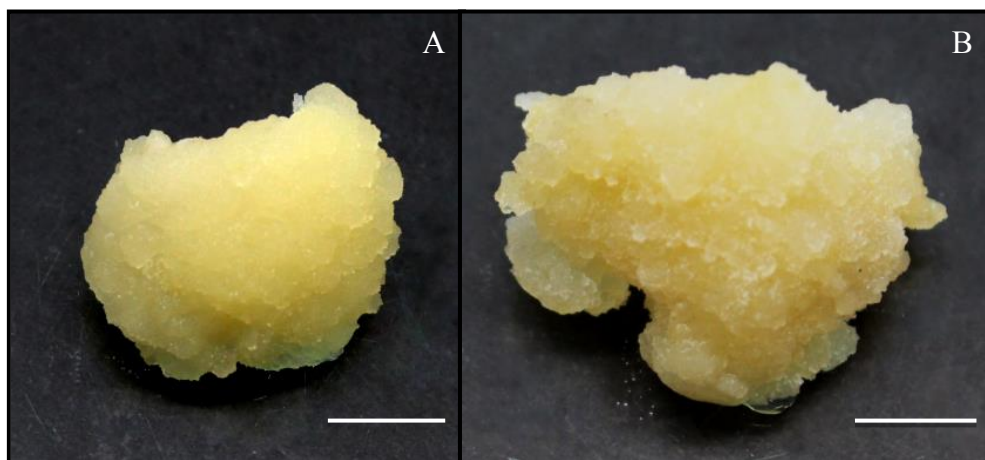
Legenda: (A) Semente de *P. alata* após remoção do tegumento e (B) plântula formada após 90 dias de cultura em meio MS  $\frac{1}{2}$ . Barras = 1 cm.

Culturas primárias foram estabelecidas a partir de ápices caulinares e segmentos nodais excisados das plântulas derivadas da germinação *in vitro*, cultivados em meio MSM ½ por 60 dias. Essas plantas eram subcultivadas a cada 30 dias para meio fresco de igual composição, constituindo um estoque de plantas propagadas *in vitro* para o fornecimento de material botânico para as próximas etapas do trabalho.

#### 4.2 Estabelecimento de culturas de calos

Calos friáveis foram produzidos a partir de segmentos foliares cultivados em meio MSM sólido suplementado com PIC a 28,9  $\mu\text{M}$ , na ausência de luz, por 60 dias. No entanto, a indução de calos na presença de luz não foi alcançada. Assim, após os calos terem sido induzidos na ausência de luz, foram realizadas subculturas, nas quais uma parte dos calos foi transferida para a presença de luz e a outra parte mantida no escuro (Figura 10). Os calos assim obtidos foram mantidos em ambas as condições de iluminação por 120 dias, com subculturas mensais para meio fresco, de igual composição.

**Figura 10** – Calos friáveis de *Passiflora alata* obtidos a partir de explantes foliares cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9  $\mu\text{M}$ , por 30 dias.

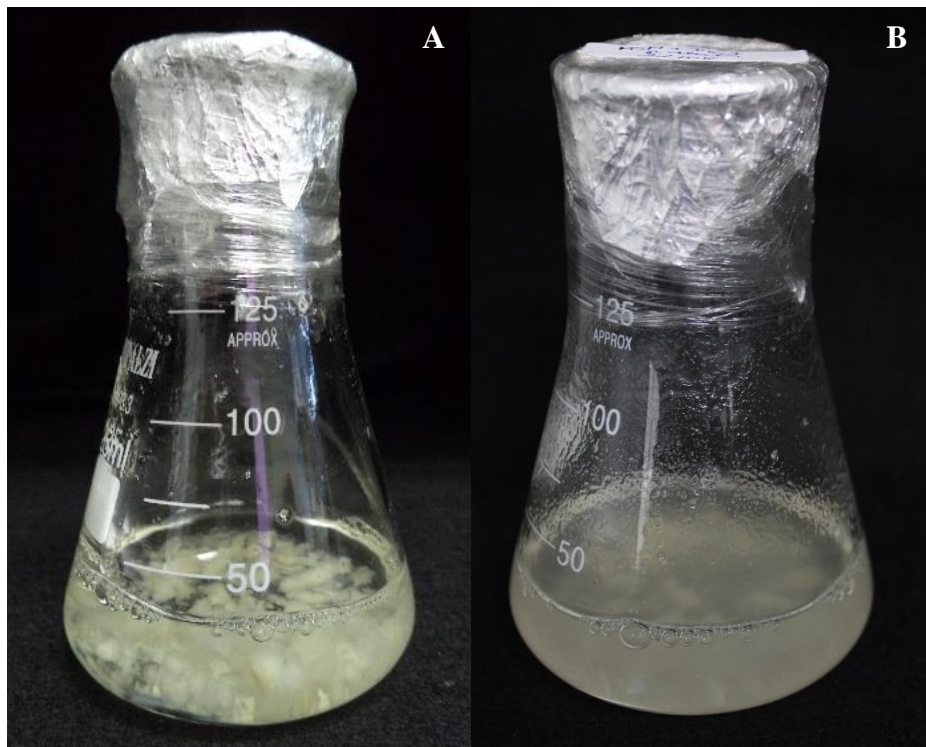


Legenda: Calos mantidos na presença (A) ou na ausência de luz (B). Barras = 1 cm.

### 4.3 Estabelecimento de culturas de células em suspensão

Suspensões celulares foram obtidas a partir da inoculação de 3 gramas de calos friáveis cultivados em meio MSM líquido suplementado com PIC a 28,9  $\mu\text{M}$ , e mantidas em mesa agitadora orbital, na presença ou ausência de luz (Figura 11).

**Figura 11** – Suspensões celulares de *Passiflora alata* mantidas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9  $\mu\text{M}$ .



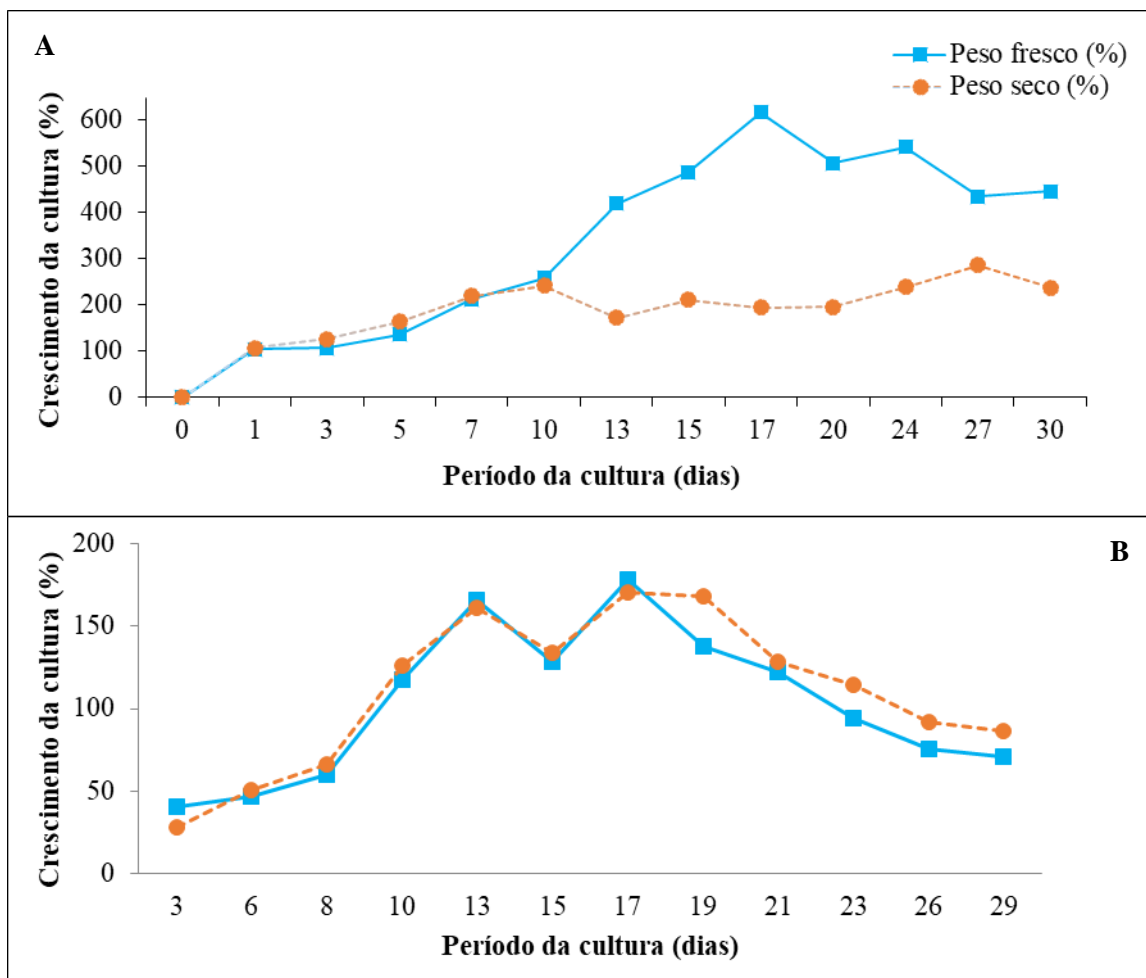
Legenda: Suspensões celulares mantidas na ausência de luz, no início (A) e após 11 dias (B) em cultivo.

As suspensões celulares mantidas na presença ou ausência de luz reproduziram as cinéticas de crescimento descritas por Pacheco e colaboradores (2012). Nas culturas mantidas no escuro, a fase exponencial ocorreu entre o 10º e 24º dia de cultura, com aumento de cerca de 3 vezes da biomassa acumulada, e foi observado um pequeno decréscimo na densidade celular após o 24º dia de cultura (Figura 12 A). Nas culturas mantidas na presença de luz, a



fase exponencial foi observada entre o 3º e o 13º dia de cultura, embora tenha havido um crescimento menos acentuado do 13º até o 17º dia de cultura (Figura 12 B).

**Figura 12** – Acúmulo de biomassa de culturas de células em suspensão de *Passiflora alata* durante 30 dias de cultivo em meio MSM suplementado com PIC a 28,9  $\mu$ M.



Legenda: Culturas mantidas na ausência (A) ou na presença de luz (B).

#### 4.4 Estabelecimento de culturas de raízes adventícias

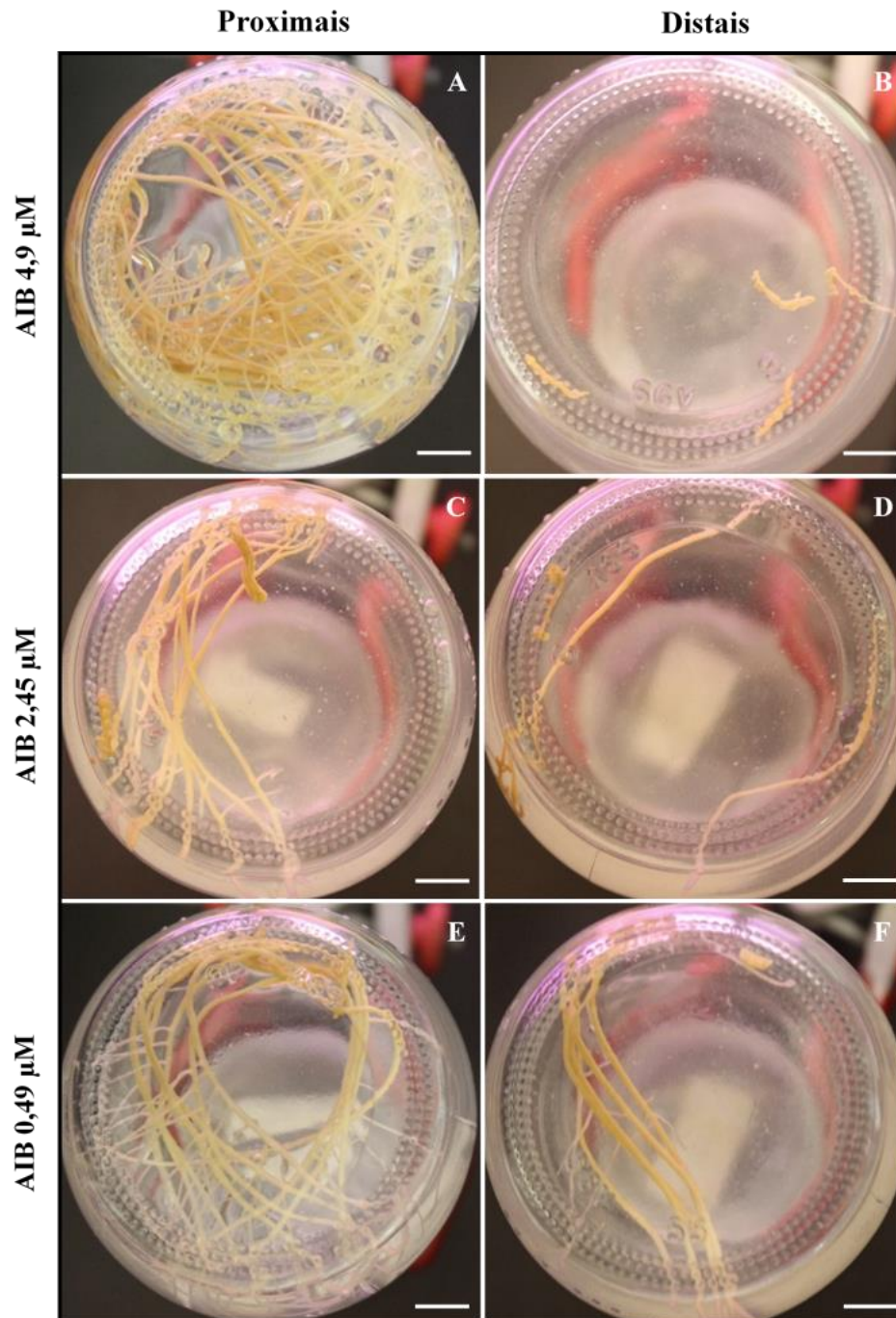
Culturas de raízes adventícias iniciadas a partir de segmentos proximais ou distais de raízes de plantas propagadas *in vitro* não apresentaram respostas morfogênicas em nenhuma das condições testadas. Dessa forma, alternativamente, foi realizado um ensaio com o objetivo de avaliar a capacidade morfogênica de segmentos radiculares proximais e distais excisados de plântulas derivadas da germinação *in vitro*, no qual foram testadas as mesmas concentrações das auxinas AIB, AIA e ANA utilizadas anteriormente, em duas condições de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ou  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Explantos cultivados a  $30^{\circ}\text{C}$  não apresentaram resposta aos tratamentos testados. O mesmo foi observado em segmentos radiculares cultivados na presença de AIA e ANA, a  $25^{\circ}\text{C}$ . A proliferação de raízes somente foi observada em resposta a AIB, quando os explantes foram mantidos a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Culturas iniciadas a partir de segmentos proximais mostraram maior capacidade de proliferação, quando comparadas àquelas iniciadas a partir de segmentos distais, sendo alcançado o maior acúmulo de biomassa na presença da maior concentração de AIB testada ( $4,9 \mu\text{M}$  - Figura 13). Culturas estabelecidas a partir de explantes proximais apresentaram tanto alongamento dos explantes primários quanto desenvolvimento de raízes laterais (Figura 13 A, C e E), enquanto os explantes distais apresentaram somente alongamento dos segmentos em resposta às concentrações de  $0,49$  e  $2,45 \mu\text{M}$  de AIB (Figura 13 D e F), com baixa formação de raízes laterais na menor concentração de AIB ( $0,49 \mu\text{M}$ ) (Figura 13 F). Esse padrão morfogênico foi inicialmente observado no 10º dia de cultura e mantido até, aproximadamente, 60 dias.

Dados quantitativos, incluindo o percentual de crescimento e acúmulo de biomassa, não puderam ser avaliados neste trabalho devido às restrições impostas pelo isolamento social em decorrência da pandemia de COVID-19.

**Figura 13** – Raízes adventícias de *Passiflora alata* obtidas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas derivadas da germinação *in vitro* e cultivados em diferentes concentrações de AIB, após 60 dias em cultura.

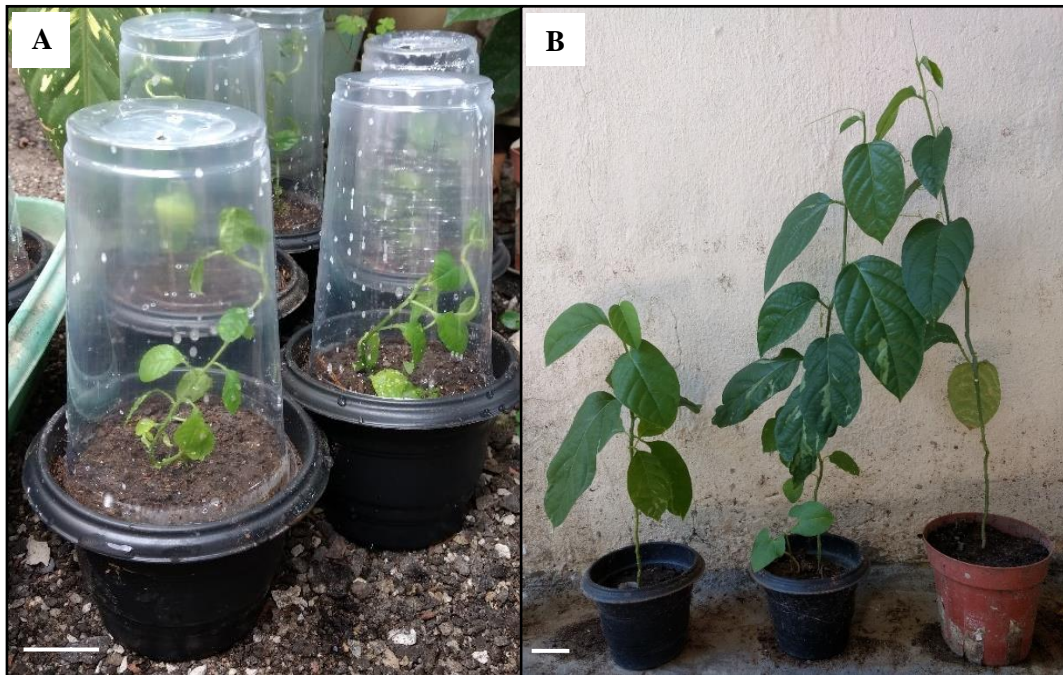


Legenda: Raízes adventícias cultivadas à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ausência de luz, em meio MSM suplementado com AIB a  $4,9 \mu\text{M}$ , a partir de segmentos proximais (A) e distais (B); com AIB  $2,45 \mu\text{M}$ , proximais (C) e distais (D); e com AIB a  $0,49 \mu\text{M}$ , proximais (E) e distais (F). Barras = 1 cm.

#### 4.5 Aclimatização

Plantas *in vitro* de *P. alata* foram submetidas ao processo de aclimatização (Figura 14 A) e apresentaram uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 70%. Após 180 dias da transferência para condições *ex vitro*, as plantas apresentaram folhas grandes e alongadas, com aspecto normal (Figura 14 B), as quais foram coletadas para o preparo de extratos.

**Figura 14** – Plantas de *Passiflora alata* em processo de aclimatização.



Legenda: Plantas de *P. alata* obtidas *in vitro*, dois (A) e 180 dias (B) após transferência para condições *ex vitro*. Barras = 5 cm.

## 4.6 Avaliação fitoquímica

### 4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

#### 4.6.1.1 Análise de flavonoides

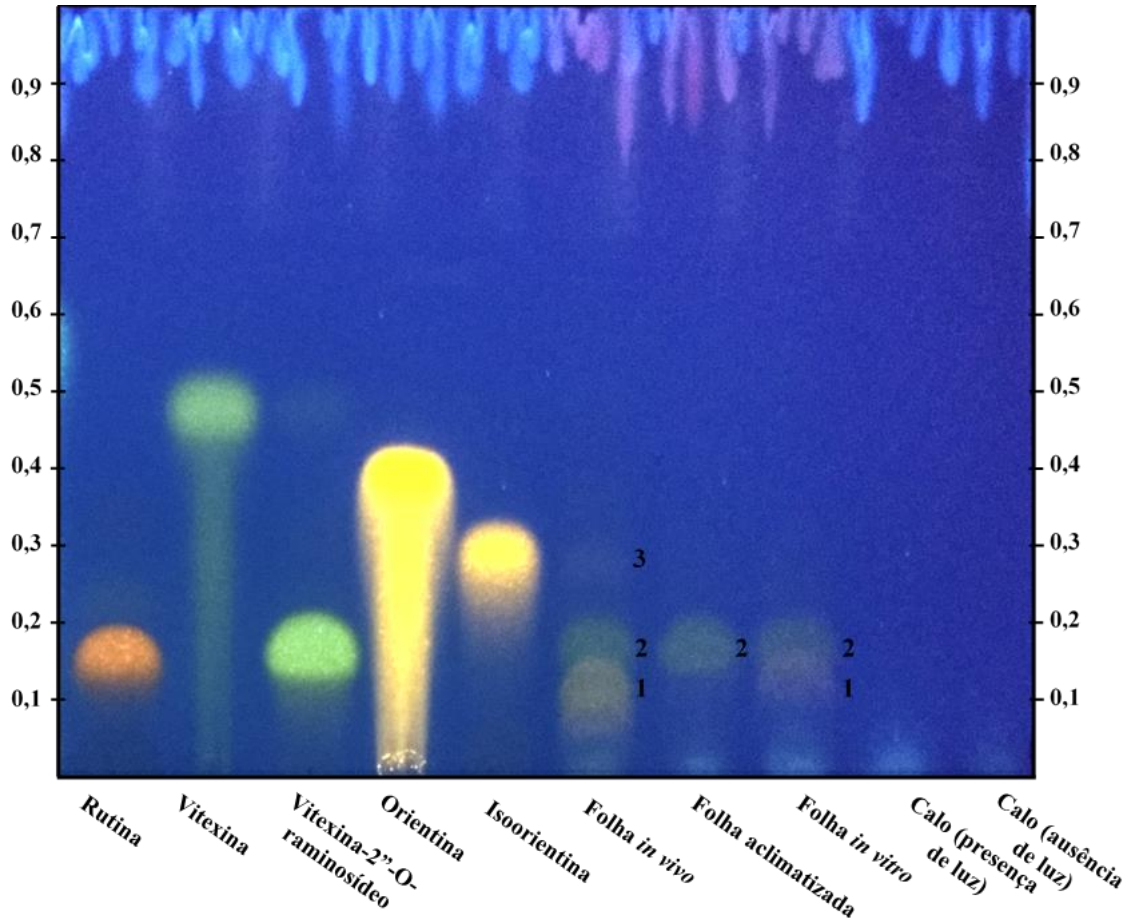
A análise por CCD para a detecção de flavonoides apontou a presença de vitexina-2''-*O*-raminosídeo (mancha 2,  $R_f = 0,19$ ) em todas as amostras de folhas avaliadas. Também pôde-se observar uma substância comum apenas às folhas de plantas obtidas *in vivo* e *in vitro* (mancha 1,  $R_f = 0,14$ ), a qual não pode ser relacionada aos padrões de flavonoides utilizados. Além disso, o extrato de folhas de plantas obtidas *in vivo* apresentou uma mancha de fraca intensidade (mancha 3,  $R_f = 0,3$ ), correspondente ao padrão de orientina (Figura 15).

Nos extratos de calos mantidos na presença ou ausência de luz, por outro lado, não foram observadas manchas indicativas da presença de flavonoides (Figura 15).

#### 4.6.1.2 Análise de saponinas

Todos os materiais analisados apresentaram manchas sugestivas de saponinas na análise por CCD (Figura 16). Duas manchas (com numeração 2 e 4 e  $R_f = 0,24$  e  $0,38$ , respectivamente) foram observadas em todos os materiais, tanto nas folhas quanto nos calos, variando apenas na intensidade e coloração entre elas. A mancha 2 ( $R_f = 0,24$ ) foi observada mais intensamente nas amostras de folhas de plantas obtidas *in vivo* e de calos mantidos na ausência de luz, com menor intensidade na amostra de folhas de plantas aclimatizadas. De forma semelhante, a mancha 4 ( $R_f = 0,38$ ) estava intensificada nas mesmas amostras, porém com menor intensidade nas amostras de folhas de plantas produzidas *in vitro* e calos mantidos na presença de luz.

**Figura 15** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de flavonoides em diferentes materiais obtidos *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora alata*.



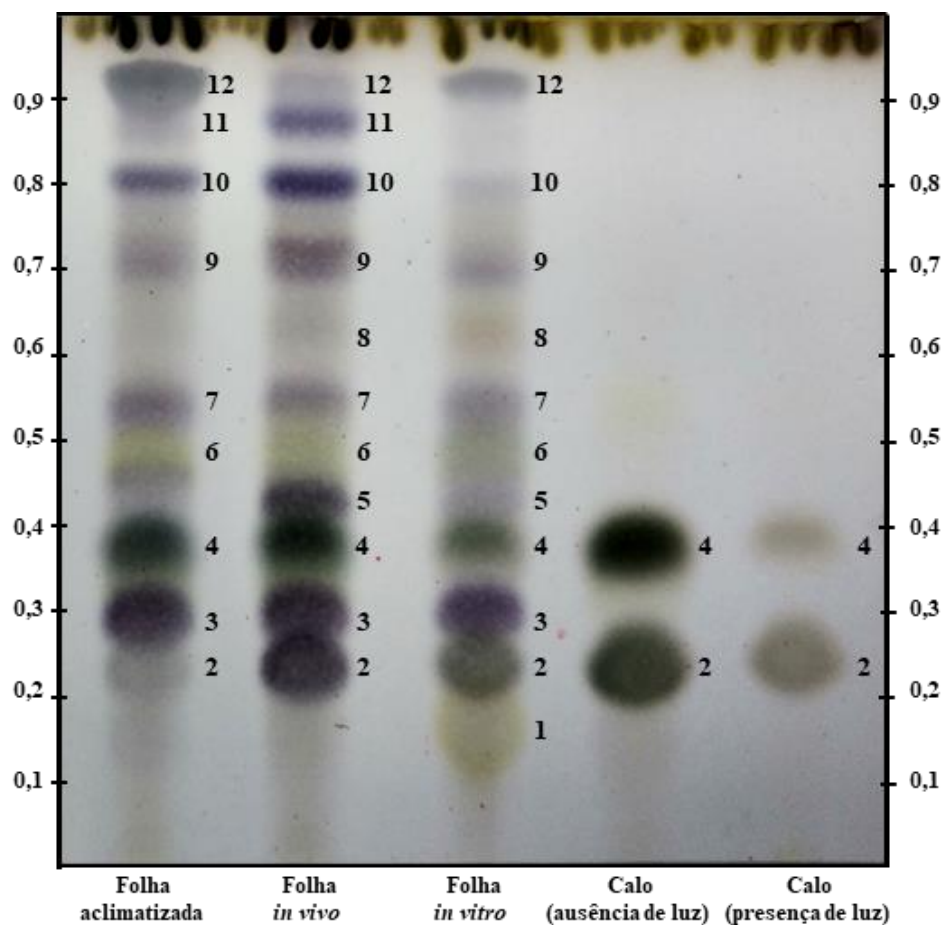
Legenda: Fase móvel: acetato de etila:ácido acético glacial:ácido fórmico:água (51:6:1:7, v/v).  
Revelação: NP/PEG 4000, e visualização sob UV<sub>365nm</sub>.

Foram detectadas ainda mais seis manchas comuns aos extratos de folhas, com mesmo R<sub>f</sub> e coloração, indicando a presença das mesmas substâncias nesses materiais. Entre elas, a mancha 3 (R<sub>f</sub> = 0,29) e a mancha 7 (R<sub>f</sub> = 0,54), ambas com coloração arroxeada, apresentaram intensidades semelhantes nas três amostras de folhas analisadas, enquanto as manchas 6 (R<sub>f</sub> = 0,49), com coloração amarelada, e 10 (R<sub>f</sub> = 0,8), com coloração arroxeada, foram detectadas em menor intensidade no extrato de folhas de plantas *in vitro*. Ainda entre as manchas comuns aos extratos foliares, a mancha 9 (R<sub>f</sub> = 0,71) foi observada com maior intensidade nas folhas de plantas obtidas *in vivo*, ao contrário da mancha 12 (R<sub>f</sub> = 0,91), com coloração

acinzentada, que se mostrou mais evidenciada nas folhas de plantas aclimatizadas e de forma mais fraca, nas folhas de plantas mantidas *in vivo* e *in vitro* (Figura 16).

Apesar da similaridade dos perfis cromatográficos das diferentes amostras de folhas analisadas, algumas manchas sugestivas de saponinas não puderam ser bem distinguidas. Como exemplo, as manchas 5 e 8 ( $R_f = 0,42$  e  $0,62$ , respectivamente) não foram identificáveis nas folhas de plantas aclimatizadas, enquanto a mancha 11 ( $R_f = 0,87$ ) não pode ser visualizada nas folhas de plantas *in vitro*. Já a mancha 1 ( $R_f = 0,16$ ), só foi evidente na amostra de folhas de plantas *in vitro* (Figura 16).

**Figura 16** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de saponinas em diferentes materias *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora alata*.

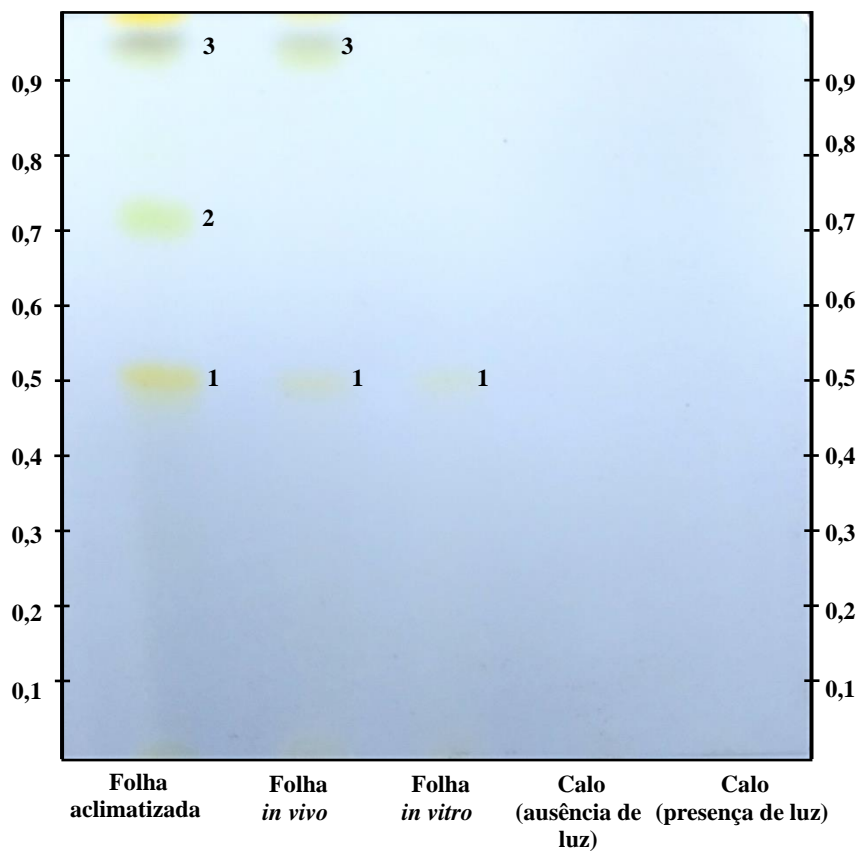


Legenda: Fase móvel: clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). Revelação: anisaldéido sulfúrico.

#### 4.6.1.3 Análise de alcaloides

Dos extratos analisados, as folhas de plantas aclimatizadas apresentaram o maior número de manchas sugestivas de alcaloides, sendo uma delas (mancha 2,  $R_f = 0,71$ ) não detectada nos demais extratos (Figura 17). A mancha 1 ( $R_f = 0,5$ ) foi comum a todas as amostras de folhas analisadas, com variação apenas em relação à intensidade, enquanto a mancha 3 ( $R_f = 0,95$ ) só foi encontrada em extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e aclimatizadas. Extratos de calos mantidos na presença ou ausência de luz não apresentaram manchas sugestivas de alcaloides (Figura 17).

**Figura 17** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de alcaloides em diferentes materiais *in vivo* e *in vitro* de *Passiflora alata*.



Legenda: Fase móvel: clorofórmio:acetona:dietilamina (50:40:10, v/v).

Revelação: reagente de Dragendorff.



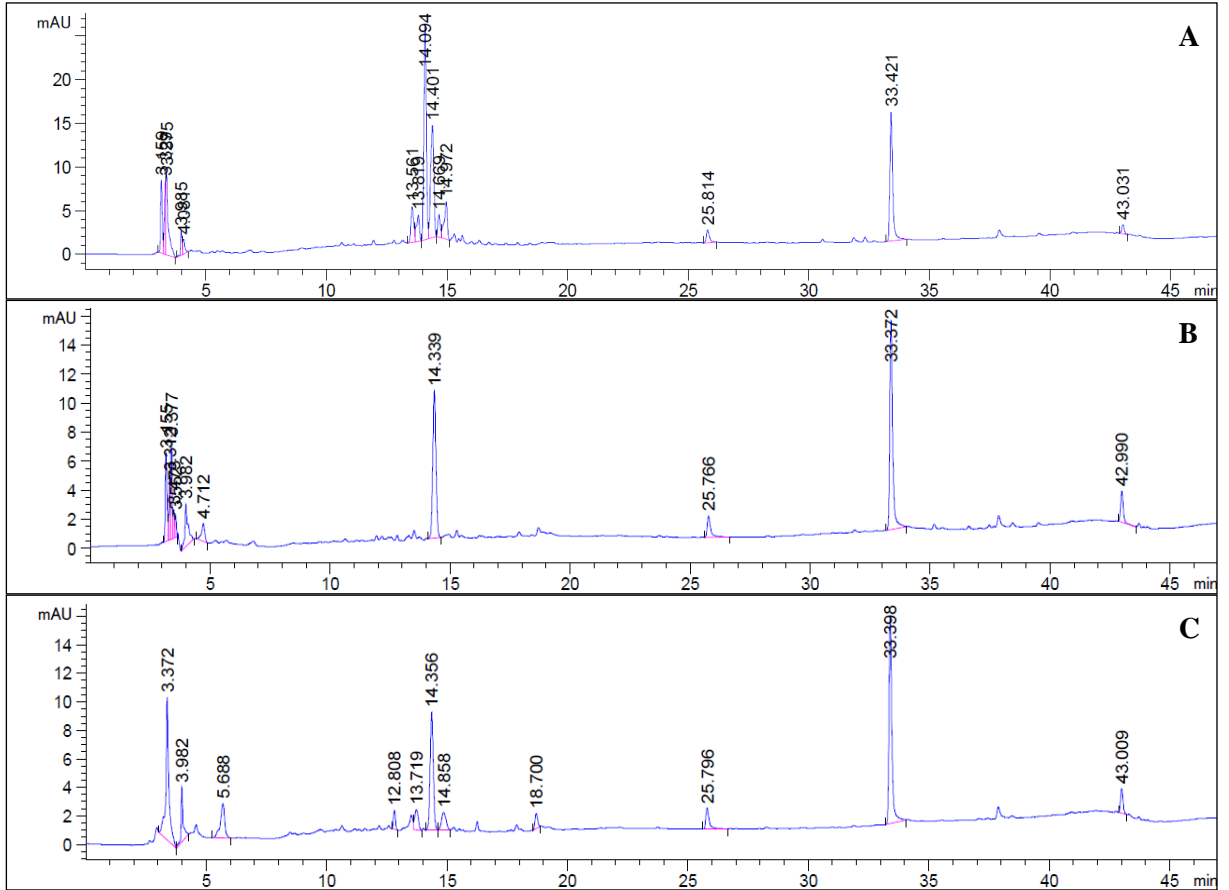
## 4.6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### 4.6.2.1 CLAE-DAD-UV

Os perfis cromatográficos, obtidos por CLAE, dos extratos de folhas (plantas *in vivo*, aclimatizadas e *in vitro*) analisados na faixa entre 200 e 480 nm, mostraram uma grande quantidade de sinais, em todas as amostras (Figura 18, 19 e 20). Entre as principais substâncias detectadas, destacam-se os sinais de tR 14,09 minutos, nas folhas de plantas obtidas *in vivo*, e 14,3 minutos, nas folhas de plantas aclimatizadas e *in vitro*, majoritárias na faixa de 254 a 340 nm (Figuras 18 e 19); tR 33,4 minutos, nas folhas de plantas *in vivo*, e 33,3 minutos, nas folhas de plantas aclimatizadas e *in vitro*, detectadas na faixa de 200 a 280 nm (Figura 18); e tR 43,0 minutos, nas folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, e 42,9 minutos, nas folhas de plantas aclimatizadas, majoritariamente detectadas nos comprimentos de onda de 420 e 480 nm (Figura 120).

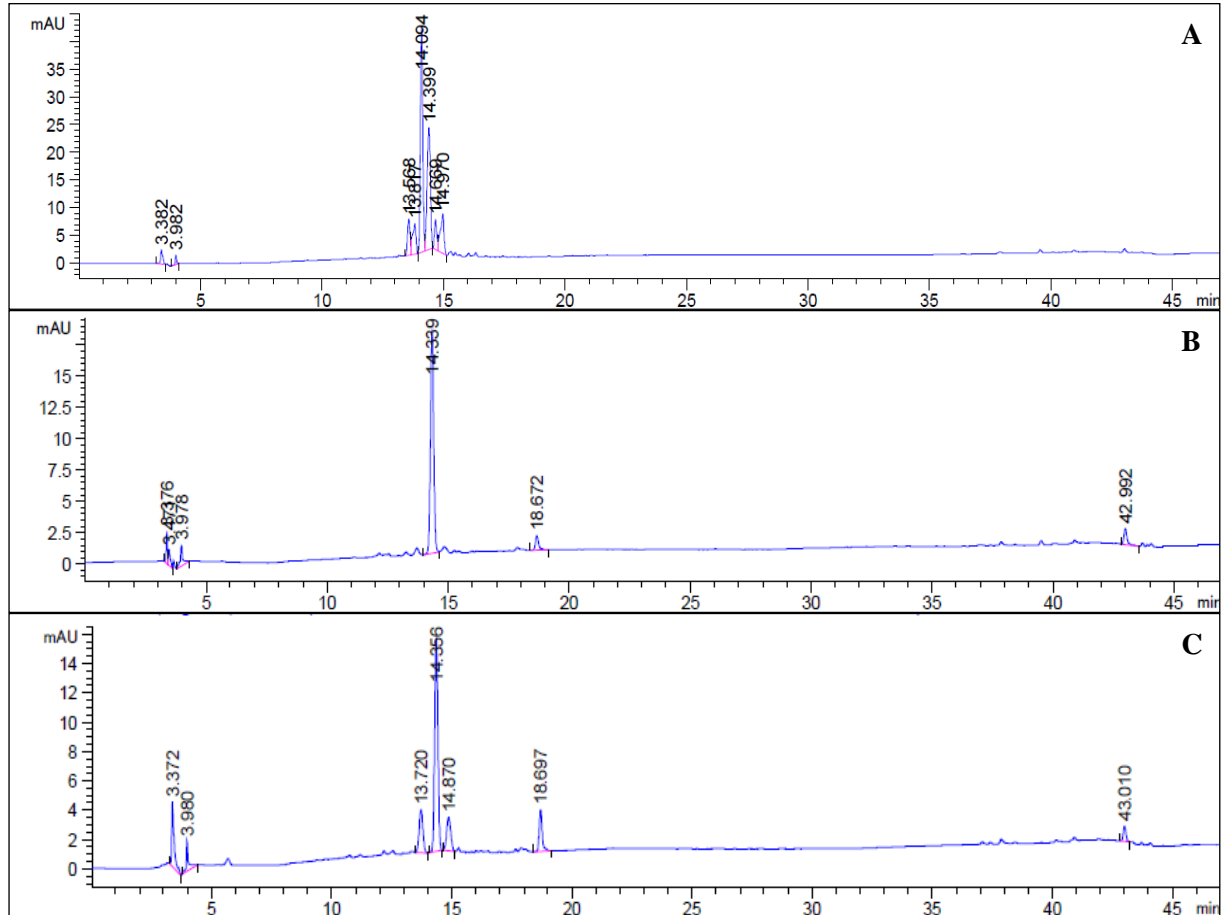
Na análise a 340 nm, foram detectadas substâncias semelhantes nos perfis cromatográficos de todos os extratos de folhas analisados. O extrato de folhas de plantas *in vivo* apresentou a maior abundância de sinais detectados a 340 nm, com a presença de uma substância majoritária com tempo de retenção (tR) de 14,09 minutos, e um segundo sinal, em intensidade, com tR de 14,3 minutos. Em contrapartida, os extratos de folhas de plantas aclimatizadas e daquelas mantidas *in vitro* exibiram a maior similaridade em relação aos sinais detectados, com a presença de uma mesma substância majoritária com tR de 14,3 minutos, e de outras três substâncias com tR de 3,3; 3,9 e 18,6 minutos, além de uma quarta substância, com tR de 42,9 e 43,0 minutos, detectada nas folhas de plantas aclimatizadas e naquelas mantidas *in vitro*, respectivamente (Figura 19).

**Figura 18** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de *Passiflora alata* obtidas *in vivo*, aclimatizadas e produzidas *in vitro*, com detecção em UV<sub>280</sub> nm.



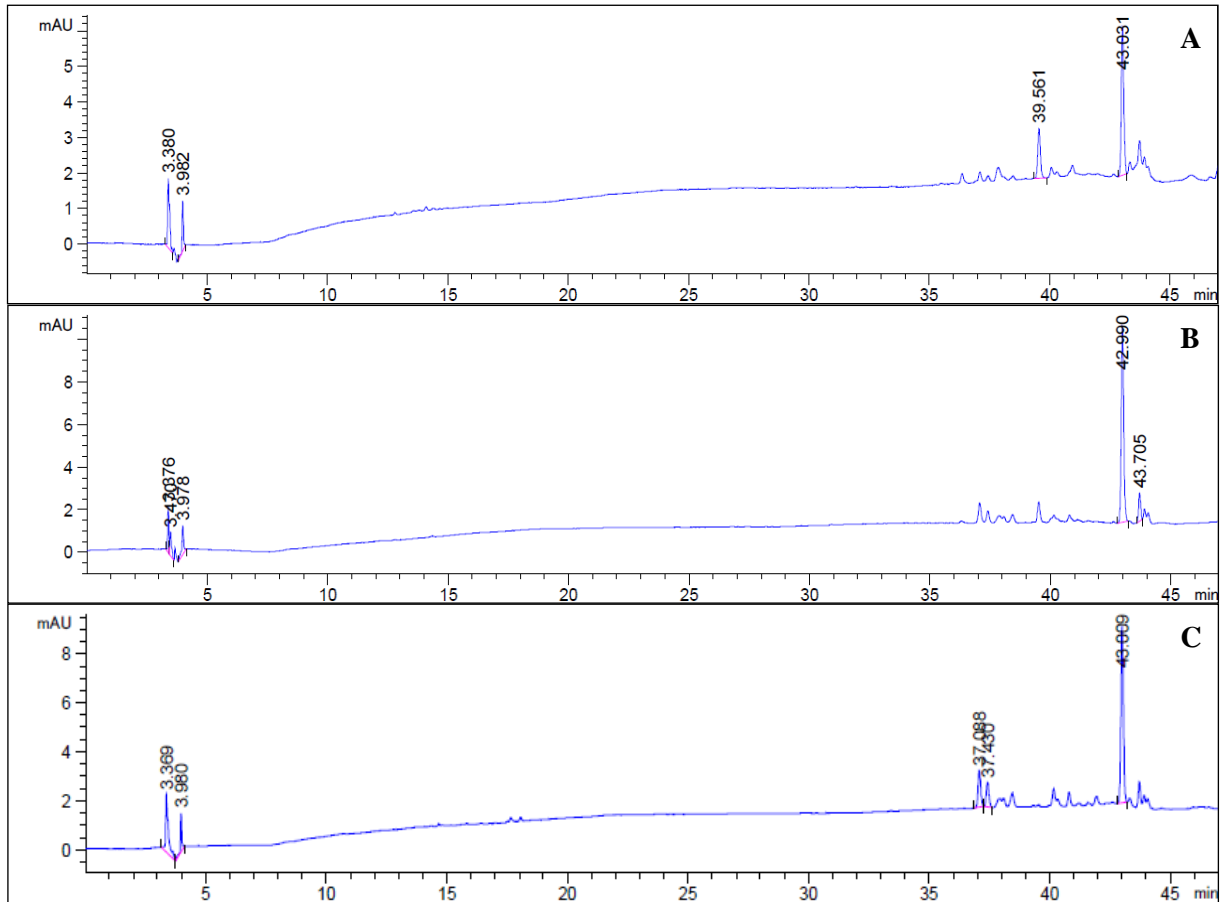
Legenda: Extratos de folhas de plantas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e *in vitro* (C).

**Figura 19** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de *Passiflora alata* obtidas *in vivo*, aclimatizadas e produzidas *in vitro*, com detecção em UV<sub>340</sub> nm.



Legenda: Extratos de folhas de plantas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e *in vitro* (C).

**Figura 20** - Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de *Passiflora alata* obtidas *in vivo*, aclimatizadas e produzidas *in vitro*, com detecção em UV<sub>420</sub> nm.



Legenda: Extratos de folhas de plantas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e *in vitro* (C).

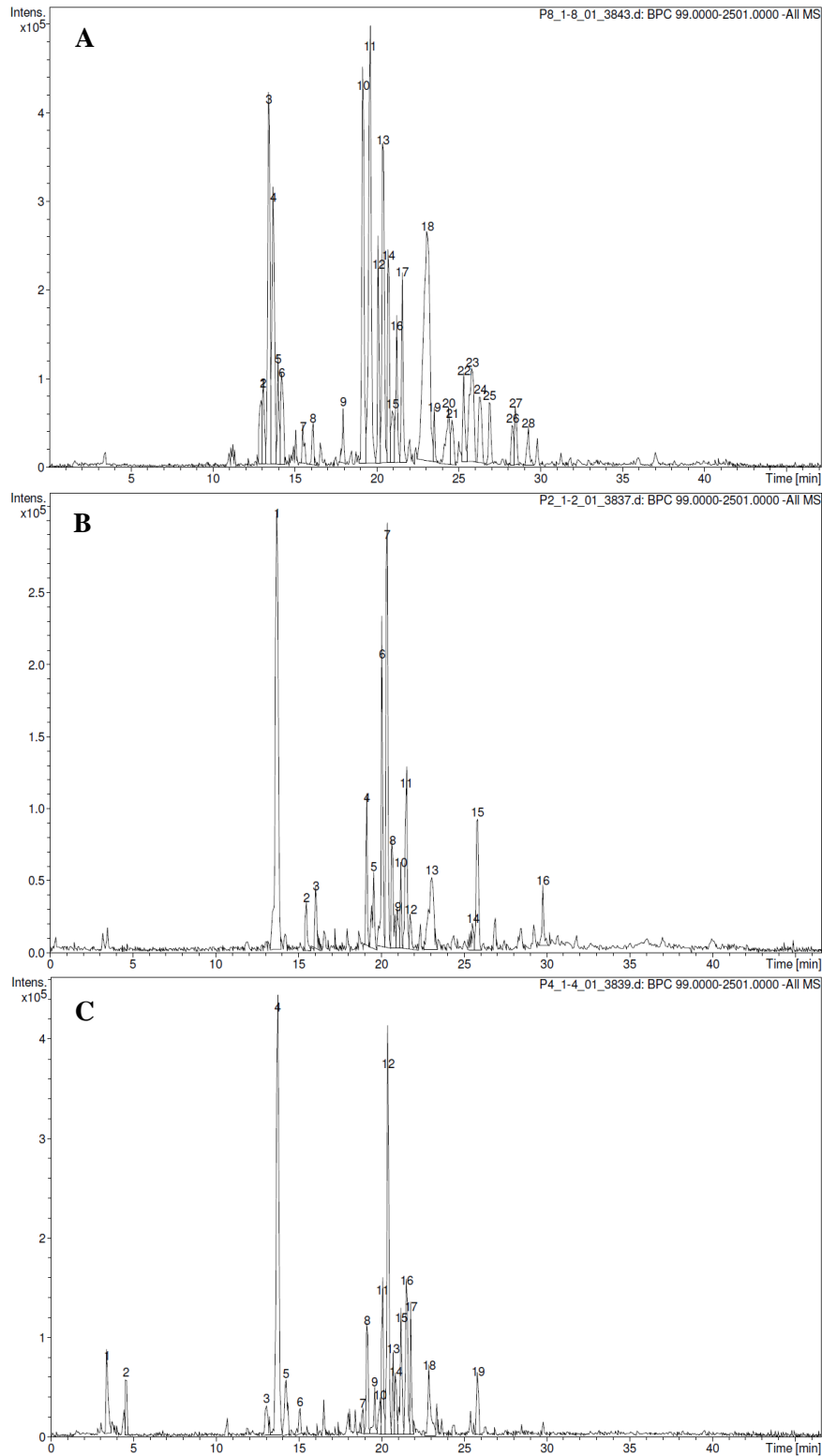
#### 4.6.2.2 CLAE-UV-IES-EM

Para melhor esclarecer e comparar a composição dos extratos etanólicos de folhas de *P. alata* excisadas de plantas com diferentes origens, as amostras foram submetidas a análises por CLAE-UV-IES-EM.

Os cromatogramas de íons totais (CIT) obtidos apresentaram uma abundância de sinais, sendo muitos deles comuns às três amostras analisadas, com maior similaridade observada entre as substâncias majoritárias detectadas nos extratos de folhas de plantas aclimatizadas e de plantas produzidas *in vitro* (Figura 21).

O maior número de substâncias foi observado no extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo*, o qual apresentou, aproximadamente, 30 sinais, com tempos de retenção variando entre 12 e 30 minutos. Entre esses sinais, destacam-se aqueles detectados com tR de 19,6; 19,1; 13,4; 20,4 e 13,7 minutos (sinais 11, 10, 3, 13 e 4, respectivamente) (Figura 21 A). Por outro lado, um número menor de sinais foi observado nos extratos de folhas de plantas aclimatizadas e daquelas obtidas *in vitro*, os quais apresentaram a mesma substância majoritária (sinais 4 e 1, respectivamente), detectada com tR de 13,7 minutos. Destacam-se ainda, nessas amostras, os sinais 7 e 12, detectados a 20,3 e 20,4 minutos, nas folhas de plantas aclimatizadas e de plantas produzidas *in vitro*, respectivamente (Figura 21 B e C). Este último sinal (tR 20,4 minutos) também pôde ser detectado, com grande intensidade, em folhas de plantas obtidas *in vivo* (Figura 21 A).

**Figura 21** - Cromatogramas de íons totais (CITs), pela técnica de CLAE-UV-ESI-EM, de extratos de folhas de *Passiflora alata*.



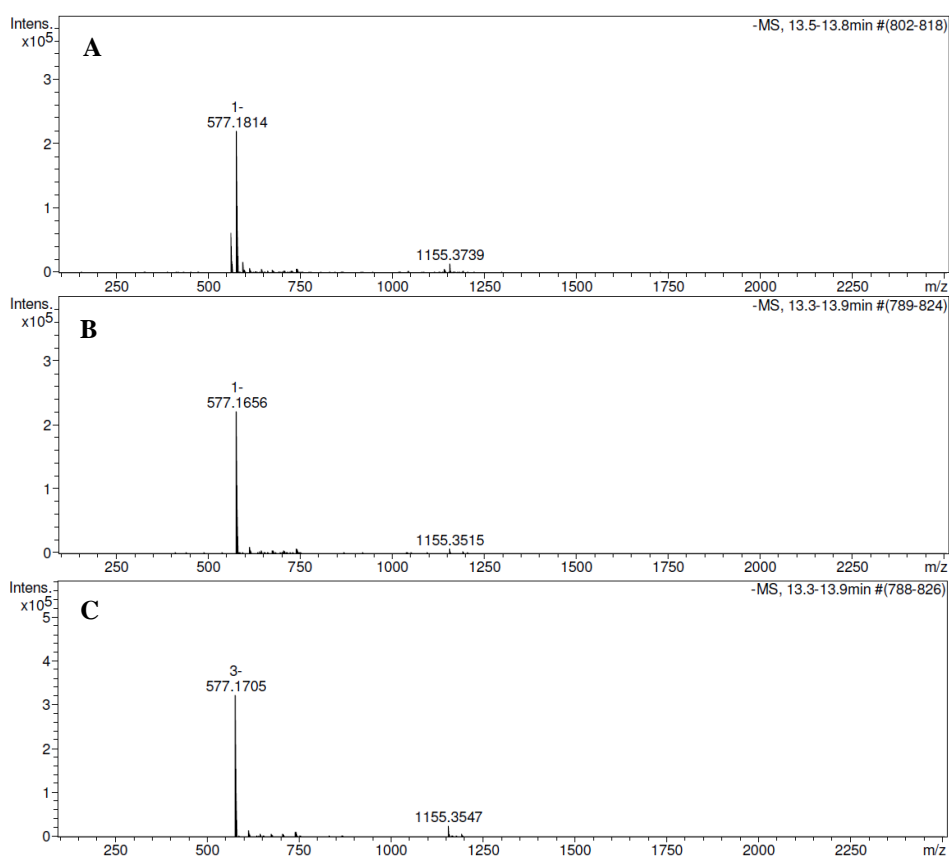
Legenda: Extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e de plantas produzidas *in vitro* (C).

Os espectros de massas dos sinais 1 (detectado em folhas de plantas aclimatizadas) e 4 (detectado em folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*), de tR = 13,7 minutos, revelaram íons pseudo-moleculares ( $m/z$ ) de 577, a mesma do flavonoide vitexina-2''-*O*-ramnosídeo (Figura 22, Tabela 1).

Foram observados ainda sinais com espectros de massa semelhantes nas três amostras de folhas analisadas, com  $m/z$  de aproximadamente 843 (tR = 20,7 minutos) e 989 (tR = 21,2 minutos). Quando essas massas foram comparadas a de substâncias já descritas em espécies de *Passiflora*, foram identificadas como ciclopassiflosídeo III e ciclopassiflosídeo III ramnosídeo, respectivamente (Figuras 23 e 24, Tabela 1).

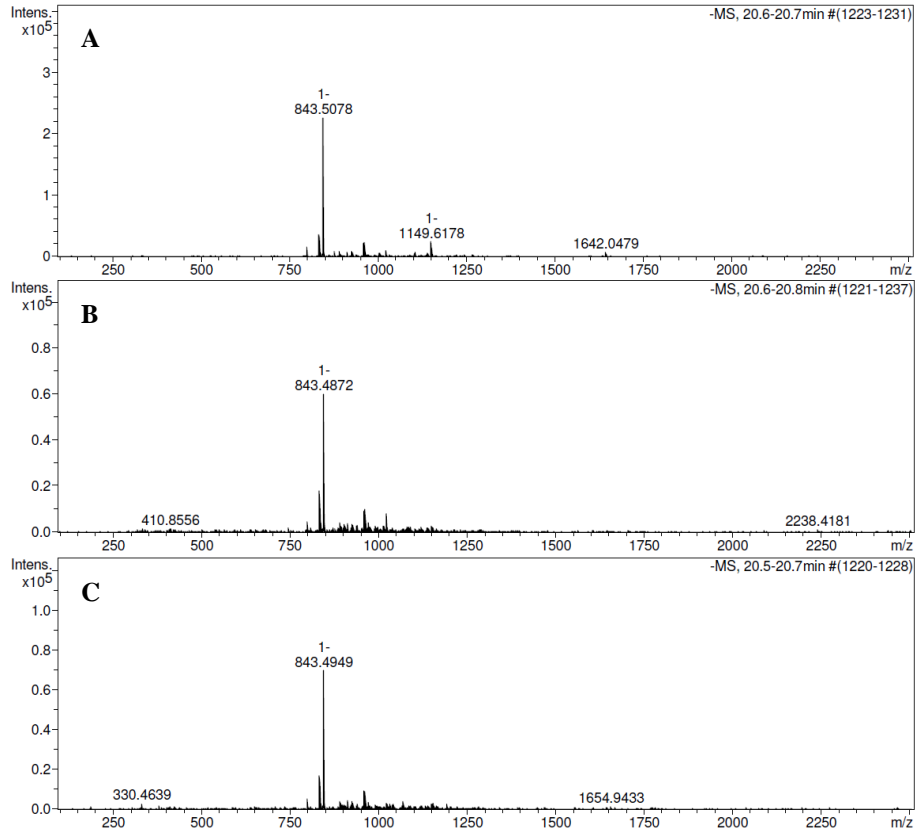
Nos extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo* e aclimatizadas foram ainda detectados sinais de baixa intensidade, aos 20,2 minutos, com  $m/z$  de 1105, similar ao já descrito para a saponina triterpênica quadrangulosídeo (Tabela 1).

**Figura 22** – Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-ESI-EM, dos extratos de folhas de *Passiflora alata*, dos 13,3 aos 13,9 minutos.



Legenda: Extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e *in vitro* (C).

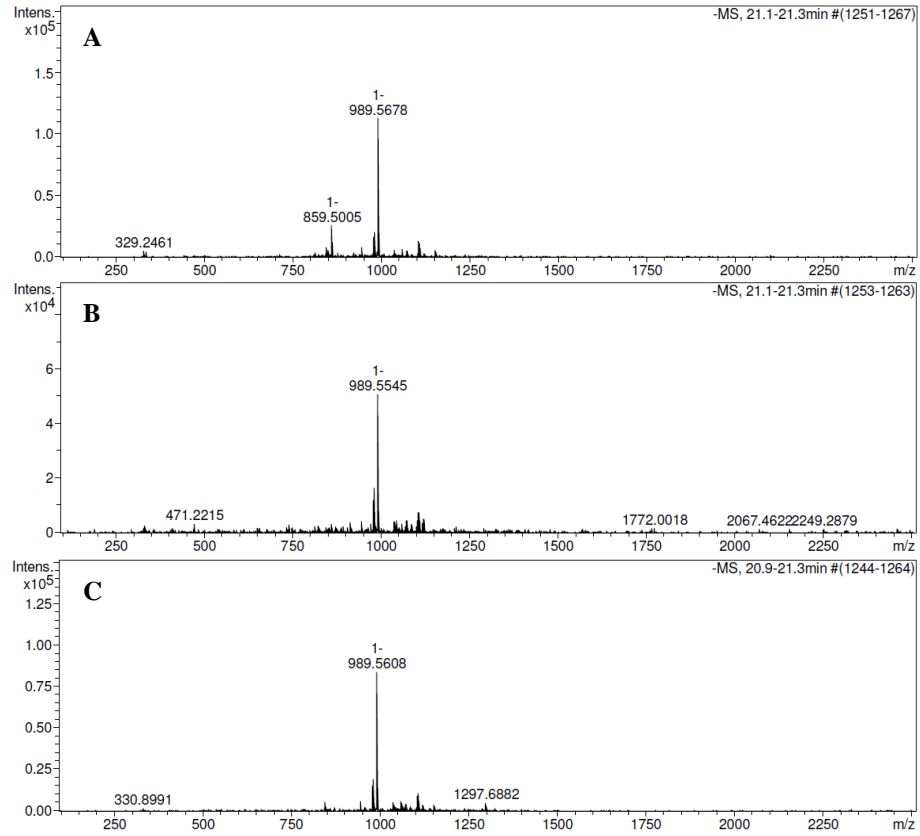
**Figura 23** – Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-ESI-EM, dos extratos de folhas de *Passiflora alata*, dos 20,5 aos 20,8 minutos.



Legenda: Extratos de folhas de plantas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e produzidas *in vitro* (C).



**Figura 24** – Espectros de massa, obtidos por CLAE-UV-ESI-EM, dos extratos de folhas de *Passiflora alata*, dos 20,9 aos 21,3 minutos.



Legenda: Extratos de folhas de plantas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) e produzidas *in vitro* (C).

**Tabela 1** – Substâncias, detectadas por CLAE-UV-ESI-EM, em extratos de folhas de *Passiflora alata*.

Sinais*	Substância sugerida	m/z (ESI) <sup>-</sup>	tR (min.)	Folhas <i>in vivo</i>	Folhas aclimatizadas	Folhas <i>in vitro</i>	Referência
2 (A) e 3 (C)	-	MS: 593; MS <sup>2</sup> : 333; 569	13,1	X	-	X	-
1 (B) e 4 (A e C)	Vitexina-2''-O- ramnosídeo	MS: 577; MS <sup>2</sup> : 293	13,7	X	X	X	COSTA et al., 2013; FERRERES et al., 2007; ZUCOLOTTO et al., 2012
5 (A)	Isovitexina	MS: 431;	14,0	X	-	-	MÜLLER et al., 2005; OZAROWSKI et al., 2018; ZUCOLOTTO et al., 2012
6 (A)	Isoscoparina 2''-O- deoxihexosídeo	MS: 607; MS <sup>2</sup> : 443	14,2	X	-	X	FERRERES et al., 2007; OZAROWSKI et al., 2018
7 (A)	Isoorientina	MS: 447; MS <sup>2</sup> : 357	15,5	X	-	-	SAKALEM et al., 2012; ZUCOLOTTO et al., 2012
-	Quadrangulosídeo	MS: 1105	20,2	X	X	-	REGINATTO et al., 2004; SAKALEM et al., 2012
14 (A), 8 (B) e 13 (C)	Ciclopassiflosídeo III	MS: 843; MS <sup>2</sup> : 797	20,7	X	X	X	SAKALEM et al., 2012; YOSHIKAWA et al., 2000a, b
16 (A), 10 (B) e 15 (C)	Ciclopassiflosídeo III ramnosídeo	MS: 989; MS <sup>2</sup> : 943	21,2	X	X	X	SAKALEM et al., 2012; YOSHIKAWA et al., 2000a, b

Legenda: \* Sinais detectados em extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo* (A), aclimatizadas (B) ou produzidas *in vitro* (C).

## 4.7 Avaliação da atividade antioxidante

### 4.7.1 Ensaio de captura do radical DPPH

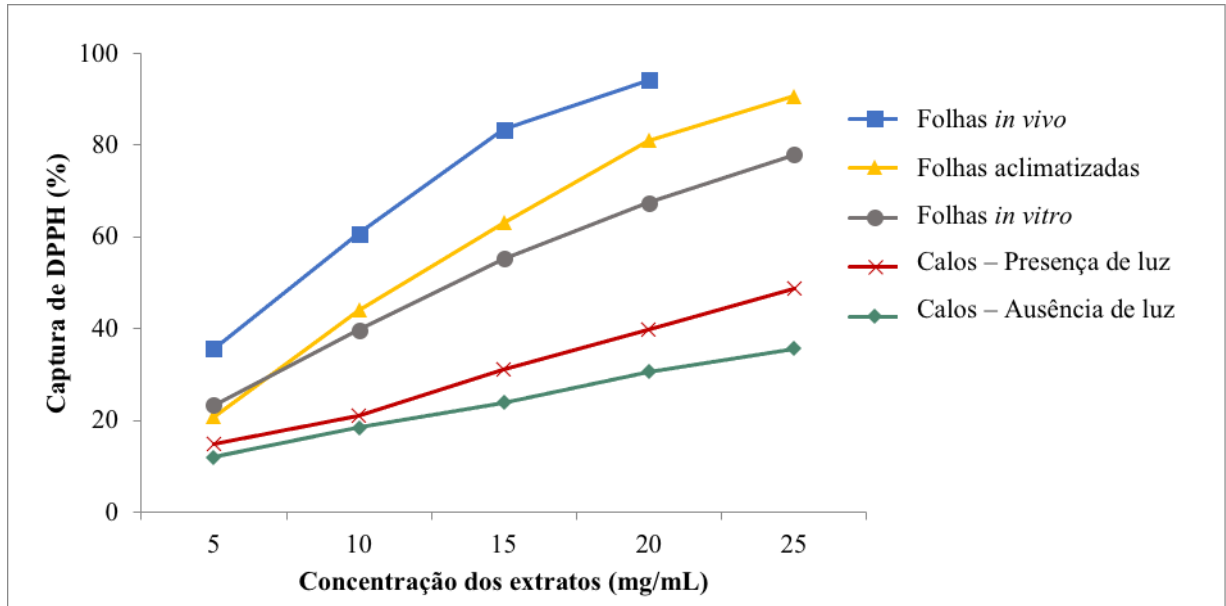
Entre as amostras analisadas, os extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* apresentaram o maior potencial antioxidante, com menor valor de CE<sub>50</sub>, seguidos pelos extratos de folhas de plantas aclimatizadas e daquelas obtidas *in vitro*. A diferença da atividade, no entanto, somente foi estatisticamente significativa entre as folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, extratos de calos obtidos a partir de explantes foliares, mantidos na presença ou na ausência de luz, mostraram baixa capacidade de captura do radical DPPH, como evidenciado pelas baixas porcentagens de captura e pelos altos valores de CE<sub>50</sub> (Tabela 2, Figura 25).

**Tabela 2** - Potencial antioxidante de diferentes materiais de *Passiflora alata* avaliados pelo ensaio de captura do radical DPPH.

Amostras	Concentração (mg/mL)	Captura (%)	CE <sub>50</sub> (g/L)
Folhas <i>in vivo</i>	2,5 – 15	19,5 – 86,48	7,55 ± 0,46 <sup>a</sup>
Folhas aclimatizadas	2,5 – 25	12,95 - 90,63	11,43 ± 1,26 <sup>ab</sup>
Folhas <i>in vitro</i>	2,5 – 25	13,76 – 86,23	12,99 ± 0,32 <sup>b</sup>
Calos (presença de luz)	5 – 30	13,63 - 50,49	27,88 ± 1,11 <sup>c</sup>
Calos (ausência de luz)	5 – 30	11,96 - 39,91	39,65 ± 2,27 <sup>d</sup>

Os resultados expressam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

**Figura 25** - Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de diferentes materiais de *Passiflora alata* obtidos *in vitro* e *in vivo*.



#### 4.7.2 Ensaio de avaliação da capacidade quelante de íons ferrosos

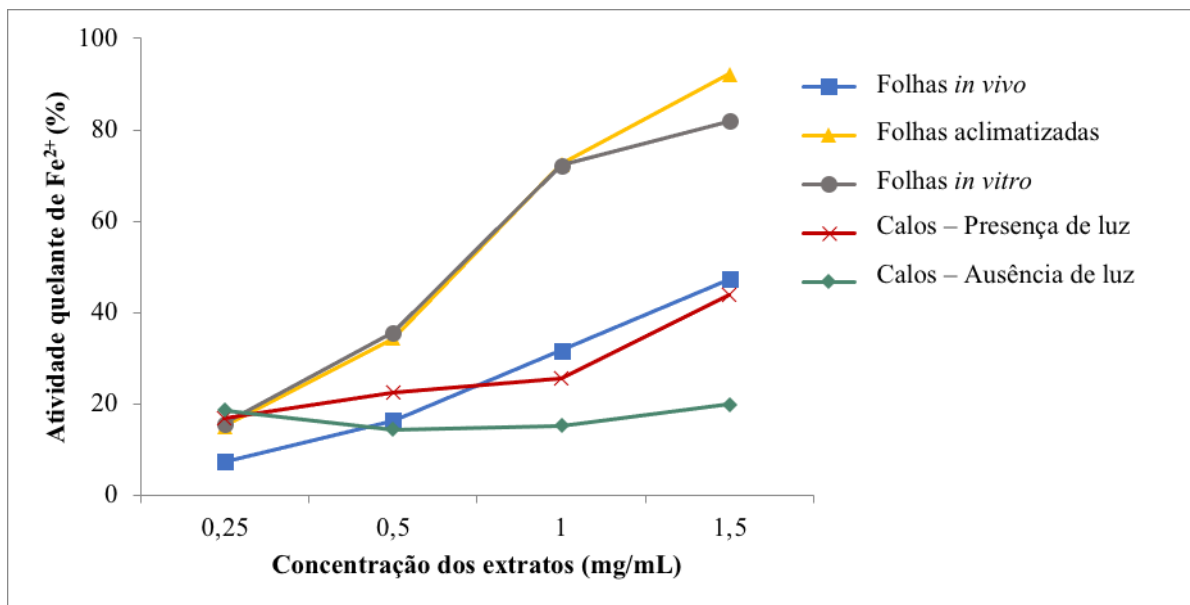
Entre os materiais avaliados, somente os extratos de calos mantidos na ausência de luz apresentaram baixa capacidade quelante de íons ferrosos (Tabela 3). Extratos de folhas de plantas *in vitro* e aclimatizadas mostraram os melhores potenciais antioxidante como quelantes de íons metálicos, com os mais baixos valores de  $CE_{50}$ , seguidos pelos extratos de folhas de plantas obtidas *in vivo* e de calos mantidos na presença de luz, também com atividade quelante significativa (Tabela 3, Figura 26).

**Tabela 3** - Potencial antioxidante avaliado pela capacidade quelante de íons ferrosos de diferentes materiais de *Passiflora alata*.

Amostras	Concentração (mg/mL)	Atividade Quelante (%)	CE <sub>50</sub> (g/L)
Folhas <i>in vivo</i>	0,125 – 1,5	5,19 – 47,30	2,25 ±1,5 <sup>a</sup>
Folhas aclimatizadas	0,125 – 1,0	15,03 - 65,85	0,66 ±0,3 <sup>a</sup>
Folhas <i>in vitro</i>	0,125 – 1,0	11,04 – 72,16	0,62 ±0,07 <sup>a</sup>
Calos (presença de luz)	0,25 – 5	9,73 - 52,63	4,69 ±1,3 <sup>a</sup>
Calos (ausência de luz)	0,25 - 5	10,19 - 20,77	27,96 ±3,2 <sup>b</sup>

Os resultados expressam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26** - Capacidade quelante de íons ferrosos por extratos de diferentes materiais de *Passiflora alata* obtidos *in vitro* e *in vivo*.



## 5 DISCUSSÃO

Considerando que a produção de metabólitos secundários pode ser modulada *in vitro*, no presente estudo foram utilizados diferentes sistemas biotecnológicos de *Passiflora alata*, visando avaliar a produção de substâncias bioativas e seu potencial antioxidante.

Os diferentes materiais *in vitro* de *P. alata* aqui descritos foram obtidos a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro*, conforme descrito por Pacheco e colaboradores (2012). Porém, o protocolo descrito anteriormente resultou em uma taxa baixa e lenta de germinação, em que muitas vezes o processo não se completava. Dessa forma, foi testada a retirada completa do tegumento antecedida pela embebição em água desionizada estéril por 5 dias para a quebra a dormência da semente.

A retirada do tegumento para germinação *in vitro* já foi testada anteriormente no gênero *Passiflora*. Para *Passiflora elegans* Mast., a retirada total do tegumento seguida de imersão em GA<sub>3</sub> foi o método mais eficaz para a quebra da dormência nas sementes (SILVA et al., 2019). A excisão do tegumento também foi o método utilizado para a obtenção de plantas *in vitro* de *P. edulis* e *P. cincinnata* (PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2009). No presente trabalho, foi observado um aumento da velocidade e da eficiência da germinação *in vitro*, o que mostra que, em alguns casos, apenas a escarificação do tegumento pode não ser suficiente para a germinação do embrião. Além disso, a embebição em giberelina antecedendo a escarificação para a quebra da dormência, etapa indicada como fundamental para a germinação de sementes de *P. alata* (CONEGLIAN et al., 2000; FERREIRA; FOGAÇA; MORO, 2001), pôde ser substituída por água, reduzindo consideravelmente os custos do processo.

Embora já tenham sido descritos protocolos para a obtenção de calos friáveis e suspensões celulares de *P. alata* (PACHECO et al., 2012), assim como a determinação preliminar dos seus potenciais antioxidante e de conteúdo fenólico (LUGATO et al., 2014), ainda são escassos os estudos visando à caracterização fitoquímica de produtos de origem biotecnológica para essa espécie, assim como para as demais espécies do gênero. Neste trabalho, calos friáveis de *P. alata* foram produzidos a partir de segmentos foliares cultivados na presença ou ausência de luz, a fim de se verificar, posteriormente, a produção de substâncias bioativas. Uma importante vantagem desse sistema biotecnológico é a possibilidade de selecionar linhagens com maior produção de determinadas substâncias, uma vez que os calos são formados por células em vários graus de diferenciação, exibindo perfis

distintos de expressão gênica (BOURGAUD et al., 2011; FUMAGALI et al., 2008; IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013). Neste trabalho, embora tenha sido aplicado o protocolo já estabelecido para a espécie (PACHECO et al., 2012), foram observadas baixas taxas de calogênese a partir de explantes foliares mantidos na presença de luz, o que pode estar relacionado a uma possível fotodegradação da auxina presente no meio de cultura (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Dessa forma, a indução dos calos ocorreu no escuro e, após a primeira subcultura, uma parte das amostras foi transferida para a presença de luz, permitindo, assim, a proliferação celular.

Os calos friáveis obtidos neste trabalho foram também utilizados para induzir suspensões celulares, conforme protocolo estabelecido por Pacheco e colaboradores (2012). As culturas de células em suspensão, mantidas tanto na presença quanto na ausência de luz, exibiram padrões de crescimento similares aos obtidos anteriormente. Dessa forma, puderam ser estabelecidos diferentes pontos de coleta de amostras de células e de meio de cultura (fase exponencial e estacionária) para a preparação de extratos e análise fitoquímica, visando maximizar a obtenção de metabólitos bioativos nessas culturas. No entanto, a interrupção das atividades laboratoriais em decorrência da pandemia de COVID-19, impossibilitou a finalização da coleta das amostras e, com isso, a obtenção dos extratos para análise fitoquímica.

Um outro sistema biotecnológico de *P. alata* estudado neste trabalho foram as raízes adventícias. Essas culturas podem constituir um interessante sistema de produção de substâncias bioativas *in vitro*, uma vez que as raízes são órgãos compartimentalizados nos quais pode ocorrer a síntese e o acúmulo de metabólitos específicos, não produzidos em folhas ou caules (SIMÕES et al., 2017). Além disso, as raízes adventícias obtidas pela manipulação das condições de cultura não requerem transformação genética, reduzindo os custos e a mão-de-obra (MURTHY; DANDIN; PAEK, 2016).

A formação de raízes adventícias é um processo complexo que envolve a interação de fatores endógenos e exógenos, sendo controlado por sinalização hormonal, notadamente auxinas, e que envolve etapas de rediferenciação celular (HASAN; HUSSEIN, 2013; SIMÃO et al., 2016). Para isso, é essencial que as células do explante estejam aptas a responderem a esses estímulos, mantendo assim a competência celular. Na indução de raízes adventícias *in vitro*, a adição de auxinas, em especial AIA, AIB e ANA, reguladores de crescimento ligados à rizogênese, mostrou-se essencial em diversas espécies (CORDEIRO et al., 2015; FRANÇA et al., 2018; LI et al., 2009, 2016; POP et al., 2011; SIMÃO et al., 2016; SIMÕES et al., 2009; TAKÁČ et al., 2016; VIEHMANNOVA et al., 2016; ZOLMAN et al., 2000). No gênero

*Passiflora*, já foram estabelecidas culturas de raízes adventícias a partir de segmentos caulinares e radiculares de plantas propagadas *in vitro* de *P. pohlii*, *P. foetida* e *P. suberosa*, em resposta a AIA, AIB ou ANA, sendo observada a produção de saponinas com atividade antioxidante nas três espécies (CARUSO, 2017; SILVEIRA, 2019; SIMÃO et al., 2016). Contudo, neste estudo, explantes excisados das regiões proximais e distais de raízes de plantas propagadas *in vitro* de *P. alata* não responderam às auxinas testadas (ANA, AIB e AIA, em diferentes concentrações), após 60 dias de cultura.

Um dos fatores que podem estar associados à sensibilização dos tecidos vegetais para ação de auxinas, permitindo assim a competência para o desenvolvimento de raízes, é o aumento dos níveis de etileno endógeno (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; ZOLMAN et al., 2000). Clark e colaboradores (1999), por exemplo, observaram menor crescimento de raízes adventícias, mesmo após a adição de AIB exógeno, em culturas de tomate cujos genes para os receptores de etileno foram retirados. Além disso, estudos realizados com *Arabidopsis*, tomate e arroz, mostraram que a imersão dos explantes em meio líquido pode induzir a formação de raízes adventícias através do acúmulo local de etileno, via transporte e acúmulo de auxina (GONIN et al., 2019; LI et al., 2009; STEFFENS; RASMUSSEN, 2016; ZOLMAN et al., 2000). Adicionalmente, em culturas de raízes *in vitro*, a taxa de biossíntese de etileno pode estar aumentada devido a condições de estresse, como adição de substâncias ao meio de cultura ou injúrias causadas pela excisão dos explantes (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; SIMÃO et al., 2016). Além disso, outros reguladores estão envolvidos de forma importante na formação de raízes adventícias, tais como ácido jasmônico, óxido nítrico, ácido salicílico e outras substâncias que em função de sua concentração podem estimular ou inibir a rizogênese (GONIN et al., 2019).

A fonte de explante utilizada para o estabelecimento da cultura de raízes adventícias é outro ponto que deve ser considerado em cada espécie. Para *P. pohlii*, segmentos internodais apresentaram indução de rizogênese em meio sólido, enquanto segmentos radiculares apresentaram altas taxas de proliferação em meio líquido (SIMÃO et al., 2016). Em estudos conduzidos com outros gêneros, a indução da rizogênese se deu a partir de outras fontes de explantes, tais como folhas e segmentos caulinares (GAO et al., 2005; HASAN; HUSSEIN, 2013; LING et al., 2009; MARTIN et al., 2008).

Embora não seja muito discutido, o tempo de cultura *in vitro* das plantas matrizes pode estar associado a uma diminuição da capacidade morfogênica de explantes radiculares. Estudos já demonstraram que a competência para formação de raízes adventícias está relacionada ao avanço do estágio de maturação em muitas espécies frutíferas e ornamentais



(BELLINI; PACURAR; PERRONE, 2014; GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009; GREENWOOD; HOPPER; HUTCHISON, 1989; VIDAL et al., 2003). Apesar das razões para esse comportamento durante a maturação ainda não estarem bem elucidadas, estudos apontam para possíveis consequências das mudanças no padrão de metilação do DNA dessas plantas (BAURENS et al., 2004; HASBÚN et al., 2007; MONTEUUIS; DOULBEAU; VERDEIL, 2008). Dessa forma, a capacidade de indução de raízes adventícias foi também avaliada em segmentos proximais e distais excisados de raízes de plântulas derivadas da germinação *in vitro*, nas mesmas condições de cultura testadas para raízes de plantas propagadas *in vitro*, a fim de avaliar se a perda da capacidade morfogênica está de alguma forma relacionada ao tempo elevado de cultura das plantas matrizes.

Embora não tenha sido evidenciada a multiplicação a partir dos segmentos radiculares de plântulas derivadas da germinação *in vitro* em resposta a temperatura mais elevada (30°C), quando os mesmos foram mantidos a 25°C foram observados o alongamento e o desenvolvimento de raízes laterais, a partir dos explantes proximais, em resposta a todas as concentrações de AIB testadas. O efeito da temperatura na capacidade de formação de raízes adventícias tem sido pouco estudado (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2009). Corrêa e Fett-Neto (2004) observaram diferenças na sensibilidade e dependência de temperatura durante o processo de formação de raízes adventícias em duas espécies de *Eucalyptus*. Temperaturas mais altas induziram o aumento da porcentagem de enraizamento, densidade e alongamento de raízes em *E. saligna*, enquanto em *E. globulus*, temperaturas mais baixas causaram estes mesmos efeitos. Reforçando a influência da temperatura, Konishi e Sugiyama (2003) avaliaram nove mutantes de *Arabidopsis* sensíveis à temperatura, que se mostraram defeituosos em vários estágios da formação de raízes adventícias.

Neste trabalho, a adição da auxina AIB ao meio de cultura estimulou o alongamento e a proliferação de raízes laterais a partir de explantes radiculares excisados de plântulas derivadas da germinação *in vitro*. O sucesso da aplicação de AIB tem sido visto em muitos protocolos de indução e multiplicação de raízes adventícias *in vitro*, inclusive de forma mais eficiente que o hormônio AIA (EPSTEIN; LUDWIG-MÜLLER, 1993; LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK; TOWN, 2005; MARTÍNEZ-BONFIL et al., 2014; RIOV; YANG, 1989; ROUT, 2006). O desempenho do AIB parece estar associado à maior estabilidade deste regulador na forma de conjugados, tanto em solução como em tecidos vegetais, além de metabolização e transporte diferentes comparado à auxina AIA (EPSTEIN; LUDWIG-MÜLLER, 1993; LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK; TOWN, 2005). Rashotte e colaboradores (2003) sugeriram que os complexos de proteínas transportadoras responsáveis

por mediar os efluxo de AIA e AIB são distintos, dado que o transporte deste último não foi alterado com o uso de inibidores de efluxo de AIA ou mutantes deficientes de proteínas de transporte desta auxina. Adicionalmente, o AIB pode ser convertido em AIA, sendo dessa forma uma fonte de liberação lenta desta auxina (EPSTEIN; LUDWIG-MÜLLER, 1993).

Alguns dos materiais biotecnológicos produzidos neste trabalho, incluindo folhas de plantas micropropagadas e aclimatizadas e calos friáveis mantidos na presença ou ausência de luz foram avaliados quanto à produção de substâncias bioativas e seu potencial antioxidante, em comparação com folhas de plantas mantidas *in vivo*. Os sistemas de suspensões celulares e raízes adventícias, apesar dos resultados promissores, não puderam ser incluídos nas análises descritas acima devido à impossibilidade de repetição dos ensaios experimentais, face à pandemia de COVID-19.

As técnicas cromatográficas são indispensáveis na caracterização fitoquímica de extratos vegetais (SIMÕES et al., 2017). Neste trabalho, a CCD foi utilizada de forma a obter uma análise preliminar dos constituintes presentes nos extratos dos materiais obtidos *in vitro*, em comparação com folhas de plantas mantidas *in vivo*. A presença de flavonoides só foi observada nos extratos de folhas, estando ausentes nas amostras de calos friáveis, derivados de explantes foliares, mantidos na presença ou ausência de luz. Esse resultado pode significar uma possível perda da capacidade biossintética dessas substâncias em calos friáveis de *P. alata*, provavelmente durante os processos de desdiferenciação celular associado à calogênese.

A presença de vitexina-2''-*O*-ramnosídeo foi detectada nos extratos de todas as amostras de folhas analisadas, com destaque para sua presença majoritária nas folhas de plantas aclimatizadas e daquelas obtidas *in vitro*. No extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo* foram ainda encontrados traços de isoorientina, de acordo com o padrão aplicado, além de uma mancha de coloração amarelada intensa, observada em menor intensidade nas folhas de plantas *in vitro*, que não pôde ser correlacionada aos padrões testados. A fluorescência amarelada dessa substância, visualizada a 365 nm, sugere se tratar de um derivado de flavona ou flavonol, assim como a orientina e isoorientina (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). Esses resultados são muito relevantes pois, apesar de diversos trabalhos relatarem a presença de flavonoides em folhas de *P. alata* (BIRK et al., 2005; CHABARIBERI et al., 2009; DOYAMA et al., 2005; MORAES et al., 1997; MULLER et al., 2005; NORIEGA et al., 2012; OGA et al., 1984; PETRY et al., 2001; PEREIRA et al., 2004; ULUBELEN et al., 1982; WOSCH et al., 2017; ZUCOLOTTO et al., 2012), existe apenas um artigo sobre a detecção dessas substâncias em materiais *in vitro* dessa espécie (SIMÃO et al., 2018).

Análises mais específicas dos extratos de folhas foram realizadas por CLAE-DAD-UV e CLAE-EM. De acordo com os resultados obtidos por CLAE-DAD-UV, a substância majoritária detectada em folhas de plantas aclimatizadas e daquelas mantidas *in vitro* (tR = 14,3 minutos) absorve  $\lambda_{\max}$  de 300 - 400 nm e possui espectro UV característico de flavonoides, com duas bandas máximas de absorção, determinadas pelo núcleo benzopirona, entre 240 – 285 nm (banda II, anel A) e 300 – 400 nm (banda I, anel B) (ABAD-GARCÍA et al., 2009; SIMÕES et al., 2017). Os sinais majoritários dessas amostras, detectados a 254 nm por CLAE-EM, possuem íon pseudo-molecular ( $m/z$ ) de 577, coincidindo com a massa do flavonoide vitexina-2''-O-ramnosídeo. Dessa forma, somando-se a esses dados o perfil cromatográfico obtido por CCD e análises fitoquímicas já realizadas com folhas de *P. alata* (COSTA et al., 2013; DA ROSA et al., 2021; OZAROWSKI, et al., 2018; WOSCH et al., 2017; ZUCOLOTTO et al., 2012), podemos sugerir que a substância majoritária encontrada nas amostras de folhas de plantas aclimatizadas e daquelas produzidas *in vitro* é o flavonoide vitexina-2''-O-ramnosídeo.

Em geral, o perfil de flavonoides dos diferentes extratos de folhas de *P. alata* foi caracterizado pela presença de flavonas de apigenina e luteolina, conforme observado pelas análises cromatográficas realizadas. O extrato de folhas de plantas obtidas *in vivo* apresentou cromatogramas com uma maior quantidade de sinais em comparação com os de folhas de plantas aclimatizadas e daquelas produzidas *in vitro*. Uma substância de  $m/z$  593, detectada nas amostras de folhas de plantas obtidas *in vivo* e *in vitro*, apresentou padrão de fragmentação diferente daqueles relatados na literatura para espécies de *Passiflora* (FERRERES et al., 2007). Ozarowski e colaboradores (2018) relacionaram uma substância de mesmo  $m/z$ , encontrada em extratos de folhas de *P. caerulea*, com a flavona derivada de luteolina, orientina 7-O-desoxihexosídeo.

A investigação de saponinas, por CCD, detectou pelo menos 11 manchas indicativas dessas substâncias em folhas de plantas *in vivo*, nove em folhas de plantas aclimatizadas e 11 em folhas de plantas *in vitro*, evidenciando perfis similares de produção de saponinas nas diferentes amostras de folhas estudadas. Duas saponinas de mesmo  $R_f$  foram encontradas em todos os extratos analisados, inclusive nas amostras de calos mantidos na presença ou ausência de luz. Trabalhos anteriores já haviam detectado a presença dessas substâncias em materiais *in vivo* e *in vitro* derivados de *P. alata* (BIRK et al., 2005; REGINATTO et al., 2004; SIMÃO et al., 2018).

A presença marcante dessa classe de substâncias em folhas de *P. alata* é ainda corroborada pela detecção de estruturas sugestivas de terpenoides na análise de CLAE-EM,

apesar de não terem sido adotadas condições específicas para a análise desse grupo. Pelo menos três substâncias, retidas após os 20 minutos de análise, apresentaram íons moleculares característicos das saponinas quadrangulosídeo, ciclopassiflosídeo III e ciclopassiflosídeo III ramnosídeo. Resultados similares foram encontrados por Ozarowski e colaboradores (2018), cujo perfil cromatográfico do extrato de folhas de *P. alata* mostrou uma grande quantidade de terpenoides, além de *O-C*-glicosídeos. Além disso, na análise por CLAE-DAD-UV foram observados sinais com  $\lambda_{\text{max}}$  de 200 – 280 nm, aos 33,4 e 33,3 minutos, os quais sustentam a presença de terpenoides (BAAS; NIEMANN, 1978). A saponina triterpênica quadrangulosídeo, já identificada como saponina majoritária em folhas de *P. alata* por Reginatto e colaboradores (2001; 2004), foi detectada em baixa intensidade nos extratos de folhas de plantas *in vivo* e aclimatizadas aqui analisados.

A análise por CCD revelou ainda a presença de alcaloides nos extratos de folhas de *P. alata*. Foram detectadas pelo menos três substâncias dessa classe de metabólitos nas amostras de folhas de plantas aclimatizadas, sendo duas delas também detectadas em folhas de plantas obtidas *in vivo* e uma substância comum às três amostras de folhas analisadas. Alcaloides do tipo indólicos, principalmente os  $\beta$ -carbolínicos como harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina, já foram descritos em espécies de *Passiflora*, entre elas *P. incarnata* e *P. alata* (ABOURASHED et al., 2003; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; FREIRE; SILVA; YARIWAKE, 2018; OGA et al., 1984; REHWALD et al., 1995; SLAYTOR; MCFARLANE, 1968; SOULIMANI et al., 1997; TSUCHIYA; SHIMIZU; IINUMA, 1999). Essas substâncias são conhecidas por seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), agindo principalmente como inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), impedindo, dessa forma, a oxidação de monoaminas como serotonina e dopamina, causando um estado de excitação, efeitos antidepressivos, entre outros. Estudos têm demonstrado ainda uma possível ação de extratos de *P. incarnata* como antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, acarretando efeitos neuroprotetores sobre doenças associadas ao SNC como depressão, ansiedade e epilepsia (APPEL et al., 2011; HAMID; RAMLI; YUSOFF, 2017; JAWNA-ZBOIŃSKA et al., 2016).

Por outro lado, os alcaloides não foram detectados nos extratos de calos de *P. alata* mantidos na presença ou ausência de luz. A não produção dessas substâncias em culturas de calos de *P. alata* também foi observada por Machado e colaboradores (2010), mesmo após o tratamento das culturas com o aminoácido *L*-triptofano, precursor de alcaloides do tipo indólicos (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015).

Outro aspecto avaliado neste trabalho foi a avaliação da capacidade antioxidante dos diferentes materiais de *P. alata* obtidos *in vitro* e *in vivo*. Substâncias antioxidantes são

capazes de impedir a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares, protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos danosos de processos oxidativos que levam ao envelhecimento e a doenças degenerativas associadas a esses processos (LIU, 2010; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). De acordo com Halliwell e Gutteridge (1998), os antioxidantes podem atuar de três diferentes maneiras: i) suprimindo a formação de espécies reativas, tanto por inibição enzimática quanto por quelação de elementos-traço; ii) eliminando espécies reativas de oxigênio e iii) regulando a defesa antioxidante.

Neste trabalho, foram empregadas duas metodologias com diferentes abordagens para análise quantitativa da atividade antioxidante. A técnica de DPPH é baseada no sequestro de radicais livres, avaliando o poder redutor dos componentes do extrato. O ensaio da capacidade quelante de íons ferrosos, por outro lado, revela o potencial de uma amostra de reduzir a ocorrência das reações de Fenton e de Haber Weiss causadas por esses íons, reduzindo assim a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas (HARB et al., 2016).

As folhas de plantas de *P. alata* mantidas *in vivo* apresentaram a maior capacidade de reduzir radicais livres, seguidas pelas folhas de plantas aclimatizadas e daquelas obtidas *in vitro*, enquanto extratos de calos não mostraram boa atividade antioxidante. Por outro lado, folhas de plantas *in vitro* e aclimatizadas apresentaram os melhores resultados em relação ao potencial quelante de íons metálicos, com  $CE_{50}$  inferior ao de folhas de plantas obtidas *in vivo*, apesar de não haver diferença significativa entre essas amostras. Além disso, calos mantidos na presença de luz apresentaram potencial antioxidante por meio da capacidade quelante de íons ferrosos, o que não foi visto em calos mantidos na ausência de luz.

Diversos estudos correlacionam a atividade antioxidante de espécies de *Passiflora* ao seu conteúdo fenólico (COLOMEU et al., 2014; GUIMARÃES; LIMA; MODOLO, 2019; GOSMANN et al., 2011; HEIM et al., 2002; RAMAIYA; BUJANG; ZAKARIA, 2014; RUDNICKI et al., 2007; SHANMUGAM et al., 2020; ZERAIK et al., 2011). Wei e colaboradores (2014) relataram efeitos de proteção contra danos por estresse oxidativo mediado por  $H_2O_2$ , em células tratadas com o flavonoide vitexina-2''-*O*-raminosídeo, através de ensaios *in vitro*. Adicionalmente, a proteção celular contra danos oxidativos também já foi associada aos flavonoides vitexina e isovitexina, em ensaios *in vitro* e *in vivo* (FERREIRA et al., 2016; PENG et al., 2008). A isoorientina, outro flavonoide detectado nas análises cromatográficas dos extratos de folhas de *P. alata* avaliados neste trabalho, foi associada à eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à inibição da enzima mieloperoxidase (MPO), observadas em extratos preparados a partir da polpa de *P. edulis* e *P. alata* (ZERAIK et al., 2011). Considerando essas informações, podemos inferir que a atividade antioxidante

observada nos extratos de folhas aqui analisados, estão relacionadas, principalmente, à presença dos flavonoides detectados por CDD e CLAE.

O menor potencial antioxidante demonstrado por extratos de calos, quando comparados aos de folhas, pode ser devido à perda ou queda da produção de substâncias antioxidantes no tecido desorganizado. O menor potencial antioxidante de extratos de calos oriundos de explantes foliares também foi observado em *Gynura procumbens* por Krishnan e colaboradores (2015). Além da redução da capacidade antioxidante avaliada por ensaios de DPPH e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), este trabalho evidenciou ainda a diminuição dos conteúdos de fenóis, flavonoides e ácido gálico de extratos de calos, quando comparados aos de folhas. Embora não seja uma regra para todas as espécies, a diminuição da capacidade antioxidante em culturas de calos já foi evidenciada por outros autores, geralmente sendo associada à diminuição da produção de substâncias fenólicas (NAHAK et al, 2014; RAJARAM et al, 2013; TANWER et al, 2010). Visando ao aumento da produção de substâncias fenólicas e flavonoides em culturas de calos e células, muitos trabalhos avaliam a exposição a eliciadores bióticos, como aminoácidos e extrato de levedura, e abióticos, como radiação UV e metais (ALI et al, 2018; DANAEI et al, 2015; JAVED et al, 2018; KHAN et al, 2019). Camarena-Rangel e colaboradores (2017) obtiveram sucesso no aumento da produção de substâncias fenólicas e flavonoides em culturas de calos de *Opuntia* após eliciação com agentes biológicos (metil jasmonato) e abióticos (luz UV e polietilenoglicol). Foi observada também uma correlação entre a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) e os conteúdos de fenóis e flavonoides, principalmente deste último. Esses trabalhos indicam que a eliciação com substâncias-chaves das vias de biossíntese de metabólitos secundários, bem como com agentes químicos e físicos presentes na interação com o ambiente, pode ser suficiente para estimular a produção de substâncias de interesse em culturas de calos.

Outro importante fator associado à produção de substâncias antioxidantes observado neste trabalho foi a influência positiva da luz, uma vez que calos mantidos na presença de luz apresentaram maior capacidade antioxidante do que os mantidos na ausência de luz. A influência da luz na produção de compostos fenólicos, especificamente flavonoides, tem sido comprovada em muitos estudos (BIEZA; LOIS, 2001; CSEPREGI et al., 2017; LANDRY; CHAPPLE; LAST, 1995; RYAN et al; 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2002). Em um estudo conduzido por Wellmann (1974), constatou-se uma relação linear direta entre a síntese de flavonoides e o tempo de exposição ao UV, assim como a indução da síntese de flavonoides pelas atividades de enzimas-chaves nas vias de produção destes metabólitos (PAL e chalcona

isomerase - CFI), após irradiação de culturas de células em suspensão de *Petroselinum hortense* Hoffm. com baixas doses de luz UV. Um outro estudo, realizado com calos derivados de folhas de *P. quadrangularis*, a eliciação com UV-B aumentou a produção de flavonoides nessas culturas (ANTOIGNONI et al, 2007). Lugato e colaboradores (2014) já haviam evidenciado um maior potencial antioxidante em culturas de calos e células em suspensão de *P. alata* mantidos na presença de luz, em comparação àqueles mantidos na ausência de luz. Com estes estudos, e levando-se em consideração a presença frequente de flavonoides em células da epiderme de folhas e tecidos suscetíveis a radiação UV, assim como as características estruturais de suas moléculas, fica reforçado o papel essencial dos flavonoides na proteção contra danos foto-oxidativos (WINKEL-SHIRLEY, 2002).

Embora não tenha sido possível a análise de todos os materiais biotecnológicos derivados de *P. alata* propostos inicialmente, os sistemas analisados neste trabalho se mostraram boas fontes de substâncias bioativas, com destaque para as folhas de plantas *in vitro*, que, apesar de não reproduzirem fielmente o perfil fitoquímico das folhas de plantas mantidas *in vivo*, apresentaram uma grande quantidade de flavonoides e saponinas, e elevada capacidade antioxidante. Além disso, a comparação dos perfis fitoquímicos exibidos pelos diferentes materiais agrega informações importantes para o estudo do funcionamento de rotas do metabolismo secundário e sua modulação, a fim de obter sistemas mais eficientes de produção de substâncias bioativas.

## CONCLUSÕES

- A remoção completa do tegumento da semente favorece a germinação *in vitro* de *P. alata*.
- A cultura de raízes adventícias pode ser estabelecida a partir de segmentos radiculares proximais excisados de plântulas derivadas da germinação *in vitro*, em meio de cultura suplementado com AIB.
- Folhas de plantas produzidas *in vitro*, aclimatizadas e obtidas *in vivo* de *P. alata* apresentaram uma produção similar de flavonoides, saponinas e alcaloides.
- Calos friáveis de *P. alata* derivados de explantes foliares são capazes de produzir saponinas, mas não produzem flavonoides ou alcaloides.
- Extratos etanólicos de folhas de plantas produzidas *in vitro*, aclimatizadas ou obtidas *in vivo* apresentam boa capacidade antioxidante nos ensaios de captura do radical DPPH e atividade quelante de íons ferrosos.
- A atividade antioxidante de calos foi observada apenas naqueles mantidos na presença de luz, com a utilização do ensaio da atividade quelante de íons ferrosos.



## PERSPECTIVAS

- Avaliar a produção de substâncias bioativas, por CCD e CLAE, e a atividade antioxidante, pelos ensaios de DPPH e capacidade quelante de íons ferrosos, de culturas de células em suspensão e raízes adventícias de *P. alata*;
- Investigar as vias metabólicas para a produção de flavonoides e saponinas em folhas e calos obtidos *in vitro* de *P. alata*, através da eliciação e modulação das condições de cultura.

## REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; GARMÓN-LOBATO, S.; GALLO, B.; VICENTE, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1216 (28), p. 5398–5415, 2009.
- ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants-II. Application to Harman Alkaloids of Genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**; v. 41, n. 2, p. 100-106, 2003.
- AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V. A.; SAVANGIKAR, C. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna. **International Atomic Energy Agency**, p. 26–30, 2004.
- ALI, A. A. M.; EL-NOUR, M. E. M.; YAGI, S. M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16 (2), p. 677-682, 2018.
- ALI, M.; ABBASI, B. H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400–406, 2013.
- AMARAL, R. G.; GOMES, S. V. F.; LUCIANDO, M. C. S.; PESSOA, C.; ANDRADE, L.; SEVERINO, P.; BRANDÃO, G. C.; BOMFIM, L. M.; SOARES, M. B. P. S.; BEZERRA, D. P.; DAVID, J. M.; CARVALHO, A. A. Cytotoxic potential of 14 *Passiflora* species against cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, p. 157-166, 2019.
- ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; SANTOS, S. A.; MENEZES, D. B.; ANDRADE, L. R. M.; SANTOS, R. S.; SANTOS, E. W. P.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A. A. Efeitos biológicos de extratos da *Passiflora alata*: uma revisão da literatura. Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - SERGIPE, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 33, 2019. Disponível em: <<https://periodicos.set.edu.br/cadernobiologicas/article/view/5913>>. Acesso em: 20 mai. 2021.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v.78, p. 345-352, 2007.
- APPEL, K.; ROSE, T.; FIEBICH, B.; KAMMLER, T.; HOFFMAN, C.; WIESS, G. Modulation of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 838–843, 2011.
- ASADUJJAMAN, M.; MISHUK, A. U.; HOSSAIN, M. A.; KARMAKAR, U. K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 121-126, 2014.

- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, B.; ASLAN, E.; YUKSEL, M. U. *Passiflora incarnata* Linneaus as an anxiolytic before spinal anesthesia. **Journal of Anesthesia**, v. 26, n.1, p. 39-44, 2012.
- AYRES, A. S.; DE ARAÚJO, L. L.; SOARES, T. C.; COSTA, G. M.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; SCHENKEL, E. P.; SOARES-RACHETTI, V. P.; ZUCOLOTO, S. M.; GAVIOLIET, E. C. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 499-505, 2015.
- BAAS, W. J.; NIEMANN, G. J. High performance liquid chromatography of terpenoids. **Journal of High-Resolution Chromatography**, v. 1, p. 18-20, 1978.
- BAIS, H. P.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. **In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant**, v. 37(6), p. 730–741, 2001.
- BALLESTEROS-VIVAS, D.; ALVAREZ-RIVERA, G.; IBÁÑEZ, E.; PARADA-ALFONSO, F.; CIFUENTES, A. Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seeds combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2019.
- BAQUE, M. A.; MOH, S.; LEE, E.; ZHONG, J.; PAEK, K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1255–1267, 2012.
- BAQUE, M. D.; HAHN, E.; PAEK, K. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morindacitrifolia* as affected by auxin and light quality. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p.71–80, 2010.
- BAURENS, F. C.; NICOLLEAU, J.; LEGAVRE, T.; VERDEIL, J. L.; MONTEUUIS, O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. **Tree Physiology**, v. 24, p. 401–7, 2004.
- BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S. S.; BORDIGNON, C. L. JR.; KAPPEL, V. D.; MARTINS, M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11(2), p. 282-8, 2008.
- BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. 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/FB12506>.
- BIEZA, K.; LOIS R. An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiology**, v.126(3), p. 1105–1115, 2001.
- BIRK, C. D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 28, n. 14, p. 2285-2291, 2005.

- BRAGA, A.; STEIN, A. C.; DISCHKALN STOLZ, E.; DALLEGRAVE, E.; BUFFON, A.; DO REGO, J. C.; GOSMANN, G.; FIALHO VIANA, A.; KUZE RATES, S. M. Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p: 59-66, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. p. 546, 2019. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em: 16, mar. 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Alimentos funcionais. Disponível em: <[https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/dicas/220\\_alimentos\\_funcionais.html](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html)>. Acesso em: 16, mar. 2021.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2 ed. John Wiley & Sons, Ltd., p. 1132, 2015.
- CAMARENA-RANGEL, N.G.; BARBA-DE LA ROSA, A.P.; HERRERA-CORREDOR, J.A.; SANTOS-DÍAZ, M.S. Enhanced production of metabolites by elicitation in *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia megacantha*, and *Opuntia streptacantha* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, p. 289–298, 2017.
- CARUSO, R. S. **Estabelecimento de culturas de raízes adventícias e avaliação fitoquímica de *Passiflora foetida* L.** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 49p, 2017.
- CASTRO, J.A.; NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Definition of morphoagronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. **Scientia Horticulturae**, 145, 17 e 22, 2012.
- CERQUEIRA-SILVA, C.; JESUS, O.; SANTOS, E.; CORREA, R.; SOUZA, A. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 14122-14152, 2014.
- CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v.45, p. 1-92, 1997.
- CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, v. 4, p. 860-864, 2009.
- CHATURVEDI, H.C.; JAIN, M.; KIDWAI, N.R. Cloning of medicinal plants through tissue culture—a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 937–948, 2007.
- CHEW, Y.L.; CHAN, E.W.L.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, v.116, p.13-18, 2009.

CLARK, D.G.; GUBRIUM, E.K.; BARRETT, J.E.; NELL, T.A.; KLEE, H.J. Root formation in ethylene-insensitive plants. **Plant Physiology**, v. 121, p. 53–59, 1999.

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

COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C. B. B.; SCHUMACHER, N. S. G.; MARÓSTICA JR, M. R.; MELETTI, L. M. M.; ZOLLNER, R. L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata*, Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v.18, p. 106-115, 2014.

CONEGLIAN, R.C. C.; ROSSETTO, C. A. V.; SHIMIZU, M. K.; VASCONCELLOS, M. A. S. Efeitos de métodos de extração e de ácido giberélico na qualidade de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.3, p.463-467, 2000.

CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 688-695, 2015.

CORRÊA, L. R.; FETT-NETO, A. G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, V. 29, p. 315–324, 2004.

CORRÊA, R.; PERALTA, R.; HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (Passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, 58, 10.1016, 2016.

COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; MADÓGLIO, F.A.; ZUCOLOTTO, S.M.; REGINATTO, F.H.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.A.; DUQUE, C; SCHENKEL, E.P. Vitexin Derivatives As Chemical Markers In The Differentiation Of The Closely Related Species *Passiflora alata* Curtis And *Passiflora quadrangularis* Linn. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36:12, p. 1697-1707, 2013.

CSEPREGI, K.; COFFEY, A.; CUNNINGHAM, N.; PRINSEN, E.; HIDEG, E.; JANSEN, M. Developmental age and UV-B exposure co-determine antioxidant capacity and flavonol accumulation in Arabidopsis leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 140, p. 19-25, 2017.

DANAEE, M.; FARZINEBRAHIMI, R.; KADIR, M.A.; SINNIHAH, U.R.; MOHAMAD, R.; TAHA, R.M. Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 265–272, 2015.

DA ROSA, L. C.; SIQUEIRA, M. R. P.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; PACHECO, G.; MANSUR, E.; MOREIRA, D. Development and validation of a new method to quantify vitexin-2-*O*-rhamnoside on *Passiflora* L. extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 15, p. 45-55, 2021.

- DA SILVA, V. A.; ALMEIDA, T. S.; DE OLIVEIRA, J. E.; MILAGRE, H. M.; NASCIMENTO, I. R. Cromatografia em Camada Delgada. 41 p, 2014.
- DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.
- DEWICK, P. M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. **John Wiley & Sons**, 507p, 2002.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora* A Review Update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative anxiolytic activity profile of various Preparations of *Passiflora incarnate* Linneaus: A Comment on Medicinal Plants Standardization. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, v. 8, n. 3, p. 283–291, 2002.
- DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; ALVES, R.C.; FERREIRA, I.C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review, **Industrial Crops and Products**, v.82, p. 9-22, 2016.
- DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEG, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371–374, 2005.
- ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *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. **Phytotherapy**, v. 17, n. 12, p. 940-949, 2011.
- EPSTEIN, E.; LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. **Physiologia Plantarum**, v 88, p. 382-389, 1993.
- FALCÃO, E. **Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, TG.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 2: (e-155), 2019.
- FARIA, R.B., DE CARVALHO, I.F., ROSSI, A.A.B. et al. High responsiveness in *de novo* shoot organogenesis induction of *Passiflora cristalina* (Passifloraceae), a wild Amazonian passion fruit species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant**, v. 54: 166, 2018.

- FERREIRA, G.; FOGAÇA, L. A.; MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.160-163, 2001.
- FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 214-223, 2007.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003.
- Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 27 Ago. 2019
- FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. “Radicle” biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 6, p. 220–226, 1999.
- FORMULÁRIO DE FITOTERÁPICOS DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, Brasil, 126p, 2011.
- FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; GUZZO, F.; LEVI, M.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 2031–2036, 2008.
- FRANÇA, J. M.; VENIAL, L. R.; COSTA, E. B.; SCHMILDT, E. R.; SCHMILDT, O.; BERNARDES, P. M.; ...; ALEXANDRE, R. S. Morphophysiology, Phenotypic and Molecular Diversity of Auxin-induced *Passiflora mucronate* Lam. (Passifloraceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1799-1814, 2018.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOLI, G.J. & OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspedosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(4), p. 627-641, 2008.
- GAO, X., ZHU, C., JIA, W.; QIU, M.; ZHANG, Y.; XIAO, P. Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1771–1775, 2005.
- GARCÍA-GONZÁLES, R.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; CALIGARI, P.D.S. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 37, n. 3, p. 5-30, 2010.
- GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 47-54, 2011a.
- GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; VIANNA, M. G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L. – slow growth storage and cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 32, n. 5, p. 377-882, 2011b.

- GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious Root Formation: New Insights and Perspectives. **Annual Plant Reviews**, p. 127–156, 2009.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. Plant tissue culture procedure-background. Plant propagation by tissue culture. **Springer Netherlands**, p. 1-28, 2008.
- GIRI, C.C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite *production in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 126: 1, 2016.
- GOMES, S.V.F.; PORTUGAL, L.A.; ANJOS, J.P.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28-35, 2017.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.
- GONIN, M.; BERGOUGNOUX, V.; NGUYEN, TD.; GANTET, P.; CHAMPION, A. What Makes Adventitious Roots? **Plants** (Basel), v. 8 (7), 240, 2019.
- GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.
- GRAFI, G.; FLORENTIN, A.; RANSBOTYN, V.; MORGENSTERN, Y. The stem cell state in plant development and in response to stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 53, 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CBAB, v.1, p. 183-260, 1998.
- GREENWOOD, M.S.; HOPPER, C.A.; HUTCHISON, K.W. Maturation in larch. I. Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. **Plant Physiology**, v. 90, p. 406–412, 1989.
- GUIMARÃES, S.F.; LIMA, I.M.; MODOLO, L.V. Phenolic content and antioxidant activity of parts of *Passiflora edulis* as a function of plant developmental stage. **Acta Botanica Brasilica**, p. 1-9, 2019.
- GUPTA, K.; GARG, S.; SINGH, J.; KUMAR, M. Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp and its up-scaling through bioreactor. **3 Biotech**, 2013.
- GUPTA, R. K.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A. K.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnate* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n.3, p. 801-806, 2012.
- HA, Y.W.; NA, Y.C.; SEO J.J.; KIMA, S.N.; LINHARDT, R.J.; KIM, Y.S. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. **Journal of Chromatograph A**, 1135 p. 27-35, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, U.K., 1998.



HARB, T.B.; TORRES, P.B.; PIRES, J.S.; DOS SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 978-85-85658-63-2, 2016.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992, **Phytochemistry**, v. 55, ed. 6, p. 481-504, 2000.

HASBÚN, R.; VALLEDOR, L.; SANTAMARIÁ, E.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R. Dynamics of DNA methylation in chestnut trees development. **Acta Horticulturae**, v. 760, p. 563–66, 2007.

ICHMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, 25(9), 3159–3173, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal de Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, 2019.

JAVED, R.; YUCESAN, B.; ZIA, M.; GUREL, E. Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown Under ZnO and CuO Nanoparticles Stress. **Sugar Tech**, v. 20, p. 194–201, 2018.

JAWNA-ZBOIŃSKA, K.; BLECHARZ-KLIN, K.; JONIEC-MACIEJAK, I.; WAWER, A.; PYRZANOWSKA, J.; PIECHAL, A.; Mirowska-Guzel, D.; Widy-Tyszkiewicz, E. *Passiflora incarnata* L. Improves spatial memory, reduces stress, and affects neurotransmission in rats. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 781–789, 2016.

KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115–38, 2018.

KHAN, T.; KHAN, T.; HANO, C.; ABBASI, B.H. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 525-535, 2019.

KIM, T.; JEON, S. H.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y.; PARK, J. K.; YOUN, N. Y.; LEE, H. L. Effects of tissue-cultured mountain ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer) extract on male patients with erectile dysfunction. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 356, 2009.

KLEIN, N.; GAZOLA, A.C.; LIMA, T.C.; SCHENKEL, E.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of Sedative Effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* Extracts in Mice, Measured by Telemetry. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 706-713, 2014.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 243–256, 2008.

KONISHI, M.; SUGIYAMA, M. A novel plant-specific family gene, ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1, is required for the maintenance of active cell proliferation. **Plant Physiology**, v. 140, p. 591–602, 2016.

KRISHNAN, V.; AHMAD, S.; MAHMOOD, M. Antioxidant potential in different parts and callus of *Gynura procumbens* and different parts of *Gynura bicolor*. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, Article ID 147909, 7 pages, 2015.

KROSNICK, S.E.; FORD, A. J.; FREUDENSTEIN, J. V. Taxonomic revision of *Passiflora* Subgenus *Tetrapathea* including the monotypic genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a new species of *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 34, n.2, p. 375–385, 2009.

KROSNICK, S.E.; PORTER-UTLEY, K.E.; MACDOUGAL, J.M.; JØRGENSEN, P.M.; MCDADE, L.A. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, n.3, p. 692–713, 2013.

KUMAR, N. Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization. 978-981-13-0535-1, **Springer Nature Singapore Pte Ltd.**, 2018.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. Bioactive saponins from plants: An update, Ed. Atta-ur-Rahman, **Studies in Natural Products Chemistry**, Elsevier, v. 21, p. 633-687, 2000.

LANDRY, L.G.; CHAPPLE, C.C.; LAST, R.L. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p.1159–1166, 1995.

LEE, Y.S.; YANG, T.; PARK, S.; BAEK, J.H.; WU, S.; LIM, K. Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. **Plant Omics Journal**, v.4, n.4, p. 190-194, 2011.

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, v. 75(2), p. 230-247, 2009.

LING, A.P.K.; KOK, K.M.; HUSSEIN, S.; ONG, S.L. Effects of Plant Growth Regulators on Adventitious Roots Induction from Different Explants of *Orthosiphon Stamineus*. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3(3), p. 493-501, 2009.

LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756–763, 2013.

LORENCINI, M.; MEDINA, S. P. H.; MOREIRA, P. L.; MARTINELLI, M.; DELARCINA, S.; SA-ROCHA, V. M.; GESZTESI, J. Flavonoids-rich *Passiflora alata* extract is effective to reduce skin micro-inflammation process in aging. In: 68th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 2008, Tokyo. **Journal of Investigative Dermatology**, 2008. v. 128. p. S42-S42.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. **Journal of Oleo Science**, v. 62, p. 235-240, 2013.

LOYOLA-VARGAS, V.M; VÁZQUEZ-FLOTA, F. Plant Cell Culture Protocols 2<sup>a</sup> ed. **Methods in Molecular Biology**, vol. 318. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.

- LUDWIG-MÜLLER, J.; VERTOCNIK, A.; TOWN, C.D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. **Journal of Experimental Botany**, v. 56 (418), p. 2095–2105, 2005.
- LUGATO, D. **Cultura de tecidos e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora alata* Curtis**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- LUGATO, D.; SIMÃO, M. J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from in vivo plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 339-346, 2014.
- LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.
- MACHADO, M.W.; NETO, C.S.; SALGADO, J.; ZAFFARI, G.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; CORILO, Y.E.; EBERLIN, M.N.; BIAVATTI, M.W. Search for alkaloids on callus culture of *Passiflora alata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.4, p.901-910, 2010.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and quantification of flavonoids. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R., Eds. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press-Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2006. p. 1-36.
- MARTÍNEZ-BONFIL, B. P., CRUZ-HERNÁNDEZ, A., LÓPEZ-LAREDO, A. R., TREJO-TAPIA, G., & TREJO-ESPINO, J. L. Effects of culture medium and auxins on growth of adventitious root cultures of *Cuphea aequipetala* Cav. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 401-408, 2014.
- MARTIN, K.P.; ZHANG, C.; HEMBROM, M.E.; SLATER, A.; MADASSERY, J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, p. 163–169, 2008.
- MCCULLAGH, M.; PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H. Use of ion mobility mass spectrometry to enhance cumulative analytical specificity and separation to profile 6-C/8-C-glycosyl flavone critical isomer pairs and known–unknowns in medicinal plants. **Phytochemical Analysis**, 2019.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 083-091, 2011.
- MERHY, T. S. M. **Tissue culture, *in vitro* conservation and assessment of genetic stability of *Passiflora pohlii* Mast**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.
- MERHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Avaliação da produção de vitexina em diferentes sistemas *in vitro* de *Passiflora suberosa* L. II Jornada Fluminense de Produtos Naturais – Arraial do Cabo – RJ, 2012.
- MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V.; CARVALHO, M.J.; BOLETI, A.P.A.; TEIXEIRA, L.S.; MATOS, H.R.; LIMA, E.S. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1367–1378, 2013.

- MONTEIRO, A. C. B. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 527-531, 2000.
- MONTEUUIS, O.; DOULBEAU, S.; VERDEIL, J.L. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. **Trees**, v. 22, p. 779–84, 2008.
- MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H.Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.
- MOREIRA, P.L.; JUNIOR, S.D.; LORENCINI, M.; GESZTESI, J.L.; ESTEVES, S.S.; FERRARI, C.; MANFIO, G.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory evidence of a standardized *Passiflora alata* dry extract. **Planta Medica**. 77. 10.1055/s-0031-1282822, 2011.
- MORRONE, M.S.; ASSIS, A.M.; ROCHA, R.F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTTI, S.M.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.
- MÜLLER, S. D. **Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá Doce**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale Itajaí, Itajaí. 2006.
- MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.399–403, 2005.
- MÜLLER, V.; CHAVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTI, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARADI, C. R. M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against *Herpes simplex* virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970-974, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; DANDIN, V.S.; PAEK, K.Y. Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p.129-45, 2016.
- MURTHY, H. N., HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Adventitious roots and secondary metabolism. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 711-716, 2008.
- NAGELLA, P.; MURTHY, H.N. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of with an olide A. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6735–6739, 2010.
- NAHAK, G.; KANUNGO, S.; SAHU, R. K. Comparative antioxidant activity and phytochemical contents of callus and leaf extracts of *Holarrhena antidysenterica* (L.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 26 (1), n. 27, p.159-164, 2014.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 26, p.1-6. 2007.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 131751883, Quadranguloside. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quadranguloside>>. Acesso em: 20 abr. 2021.

PubChem Compound Summary for CID 5282151, Vitexin 2"-O-rhamnoside. Disponível em: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitexin-2\\_-O-rhamnoside](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitexin-2_-O-rhamnoside)>. Acesso em: 20 abr. 2021.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, ed. 4, p. 418–425, 2001.

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

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A. O. *Fundamentos de Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016.

OLIVEIRA, M. S.; CAMPOS, M. A.; SILVA, F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95: 522-528, 2015.

OZAROWSKI, M.; BŁASZKIEWICZ, S.; GRYSZCZYNSKA, A.; THIEM, B.; BUDZIANOWSKI, J. Search for C-glycosyl flavones and phenolic acids in callus and shoot *in vitro* culture of *Passiflora caerulea* L. International conference: “Business meets science to cooperate in current topics”. Bioconnect. Poznan, Poland. 2012.

OZAROWSKI, M.; PASZEL-JAWORSKA, A.; ROMANIUK, A.; RYBCZYNSKA, M.; KEDZIA, B.; HOLDERNA-KEDZIA, E.; GRYSZCZYNSKA, A.; THIEM, B. Evaluation of cytotoxic activity of leaf and callus culture of *Passiflora* sp. extracts in human acute lymphoblastic leukemia cell lines and antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*. **XXV Polish – German Anniversary Symposium Poznan-Halle Perspectives and Challenges in Medicine**, 2013.

OZAROWSKI, M.; PIASECKA, A.; PASZEL-JAWORSKA, A.; CHAVES, D. S. A.; ROMANIUK, A.; RYBCZYNSKA, M.; Gryszczynska, A.; Sawikowska, A.; Kachlicki, P.; Mikolajczak, P. L.; Seremak-Mrozikiewicz, A.; Klejewski, A.; Thiem, B. 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**, v. 28, n. 2, p. 179-191, 2018.

PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.

PACHECO, G.; SIMÃO, M. J.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; VIEIRA, M. L. C.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora*—A review. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 305-311, 2016.

*Passiflora in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12508>>. Acesso em: 26 Jun. 2018.

PATEL, S. S.; VERMA, N. K.; SHRESTHA, B.; GAUTHAMAN, K. Antihypertensive effect of methanolic extract of *Passiflora nepalensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n. 1, p.187-189, 2011.

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

PINTO, D. L. P.; ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult**, v. 107, p. 521–530, 2011.

PONZILACQUA, B.; ROTTINGHAUS, G. E.; LANDERS, B. R.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of medicinal herb and Brazilian traditional plant extracts on *in vitro* mycotoxin decontamination. **Food Control**, v. 100, p. 24-27, 2019.

POP, T. I.; PAMFIL, D.; BELLINI, C. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. 1, p. 307-316, 2011.

RAJARAM, K.; MOUSHMI, M.; VELAYUTHAM DASS PRAKASH, M.; KUMPATI, P.; GANASARASWATHI, M.; SURESHKUMAR, P. Comparative bioactive studies between wild plant and callus culture of *Tephrosia tinctoria* Pers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.171, p. 2105–2120, 2013.

RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* Species. **The Scientific World Journal**, 2014.

RAMAIYA, S.D.; BUJANG, J.S.; ZAKARIA, M.H.; KING, W.S.; SAHRIR, M.A.S. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 93, p. 1198–1205, 2013.

RASHOTTE, A.M.; POUPART, J.; WADDELL, C. S.; MUDAY, G. K. Transport of the Two Natural Auxins, Indole-3-Butyric Acid and Indole-3-Acetic Acid, in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 133 n. 2, p. 761-77, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*, 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830 p, 2007.

REGINATTO, F. H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two South Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 348-51, 2006.

REGINATTO, F. H.; KAUFFMAN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Steroidal and thiterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12. p. 32-36, 2001.

REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. P. Assay of Quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v.15, p.195–197, 2004.

REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 96-100, 1995.

RIBEIRO, S. F.; TAVEIRA, G. B.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; DA CUNHA, M.; SANTA-CATARINA, C.; RODRIGUES, R.; GOMES, M. V. Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein Journal**, v. 31, n.1, p. 59-67, 2012.

RIOV, J.; YANG, S. F. Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 8, p. 131, 1989.

ROTILI, M. C. C.; COUTRO, S.; CELANT, V. M.; VORPAGEL, J. A.; BARP, F. K.; SALIBE, A. B.; BRAGA, G. C. Composição, atividade antioxidante e qualidade do maracujá amarelo durante armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 227-240, 2013.

ROUT, G. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. **Plant Growth Regulation**, v 48, p. 111-117, 2006.

RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and anti-glycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719–724, 2007.

RYAN, K. G.; SWINNY, E. E.; WINEFIELD, C.; MARKHAM, K. R. Flavonoids and UV photoprotection in *Arabidopsis* mutants. **Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 56(9-10): p.745–754, 2001.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.

SALGADO, J. M.; BOMBARDE, T. A. D.; MANSI, D. N.; PIEDADE, S. M. S.; MELETTI, L. M. M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30 n.3 , 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.600-603, 2011.

SAVANGIKAR, V. A. Role of low cost options in tissue culture. **Low Costs Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries**, p. 11-15, 2004.

SHANMUGAM, S.; MURUGAIYAN, I.; LIMA, B. S.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; NARAIN, N.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; THANGARAJ, P. HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties, **Arabian Journal of Chemistry**, v.12:6, p. 760-771, 2019.

RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. **The Scientific World Journal**, v. 2014, ID 167309, p. 10, 2014.

SIEBRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. R.; MARTINS, A. O. B. P. B.; SIEBRA, D. C.; ALBUQUERQUE, R. S.; LEMOS, I. C. S.; DELMONDES, G. A.; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 37-43, 2016.

SILVA, A.L.; HILST, P.C.; SANTOS DIAS, D.C.F.S.; ROGALSKI, M. Superação da dormência de sementes de *Passiflora elegans* Mast. (Passifloraceae). **Revista Verde**, v.14, n.3, p. 406-411, 2019.

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 138-142, 2012.

SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; MELETTI, L.M.M.; PASCHOAL, J.A.R.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.

SILVA, M.; PINTO, D. L.P.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 99, p.47–54, 2009.

SILVEIRA, A.C.M. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

SILVEIRA, F.; ROSSI, S.; FERNÁNDEZ, C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.; FERREIRA, F. Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1783-1788, 2011.

SIMÃO, M. J.; BARBOZA, T.J.S.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; IGNACIO, C.P.R.I; PACHECO, G. A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of *in vitro* derived materials of four *Passiflora* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, 2018a.



- SIMÃO, M. J.; COLLIN, M.; GARCIA, R. O.; MANSUR, E.; PACHECO, G.; ENGELMANN, F. Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique. **Protoplasma**, v. 255, n. 3, p. 741-750, 2018b.
- SIMÃO, M. J.; FONSECA, E.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 419-430, 2016.
- SIMÕES, C. **Estudos biotecnológicos e avaliação do potencial farmacológico de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae)**. Tese de doutorado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 100 p. 2009.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.
- SLAYTOR, M.; MCFARLANE, J. The biosynthesis and metabolism of harmine in *Passiflora edulis*—I, The biosynthesis of harmine. **Phytochemistry**, v. 7, p. 605-611, 1968.
- SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 11-20, 1997.
- SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. *Maracujá: espécies, variedades, cultivo*. v. 3. Piracicaba: Fealq, 1997.
- SOUZA, V.R.; PEREIRA, P.A.P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S.V.; CARNEIRO, J.D.D.S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, 134, 381 e 386, 2012.
- STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The Physiology of Adventitious Roots. **Plant Physiology**, v. 170, p. 603–617, 2016.
- STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55 (4), p. 744–757, 2011.
- SUDHA, C. G.; SEENI, S. Establishment and analysis of fast-growing normal root culture of *Decalepis arayalpathra*, a rare endemic medicinal plant. **Current Science**, v. 81, n. 4, 2001.
- SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 212-218, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TAKÁČ, T.; OBERT, B.; ROLČÍK, J.; ŠAMAJ, J. Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. **New Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 728-734, 2016.
- TANWER, B.S.; CHOUDHARY, R.; VIJAYVERGIA, R. *In Vitro* and *in Vivo* comparative study of primary metabolites and antioxidant activity in *Spilanthes Acmella* Murr. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, 0973-2691, v. 6, n. 5, p. 819–825, 2010.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. UFRGS, 182 p. 2005.

- THOMAS, D.; SILPA, P.; ROOPA, K. *Production of Plant Secondary Metabolites: Current Status and Future Prospects*. Singapore: Springer Nature, 2018.
- TIWARI, R.; RANA, C. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research And Generic Science**, v. 3, p. 661-670, 2015.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB. v.2. p.537-548, 1999.
- TSUCHIYA, H.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Beta-Carboline Alkaloids in Crude Drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, p. 440-443, 1999.
- ULMER, T.; MCDUGAL, J. M. *Passiflora* passionflowers of the world. **Portland Timber Press**, 430 p., 2004.
- ULUBELEN, A.; OSKUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosyl flavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 783, 1982.
- VAGULA, J. M.; VISENTAINER, J. V.; LOPES, A. P.; MAISTROVICZ, F. C.; ROTTA, E. M.; SUZUKI, R. M. Antioxidant activity of fifteen seeds from fruit processing residues by different methods. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 41, p. e35043, 2019.
- VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112–119, 2007.
- VIANNA, M. G. **Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- VIDAL, N.; ARELLANO, G.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, A.M.; BALLESTER A. Developmental stages during the rooting of in-vitro-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. **Tree Physiology**, v. 23:1247–54, 2003.
- VIEHMANNOVA, I.; CEPKOVA, P. H.; VITAMVAS, J.; STREBLOVA, P.; KISILOVA, J. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, n. 2, p. 293-302, 2016.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2 ed. Berlin: Springer, 2001.
- WANG, C.; XU, F.; SHANG, J.; XIAO, H.; FAN, W.; DONG, F.; HU, J.; ZHOU, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 812-817, 2013.
- WANG, J.; QIAN, J.; YAO, L.; LU, Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 5, 2015.

- WASICKY, A.; HERNANDES, L.S.; VETORE-NETO, A.; MORENO, P.R.H.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M.; YOSHIDA, M. Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25(4), p. 407-412, 2015.
- WELLMANN, E. UV Dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley. **FEBS Letters**, v. 51, p. 105–107, 1975.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of Flavonoids and Effects of Stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 218-23, 2002.
- WOSCH, L.; SANTOS, K.C.; IMIG, D.C.; SANTOS, C.A.M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27(1), 40-49, 2017.
- YANG, T., FANG, L.; NOPO-OLAZABAL, C.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, L.; BALMACEDA, C.; MEDINA-BOLIVAR, F. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 15, p. 3942-3950, 2015.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000a.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1377-1380, 2000b.
- YUE, W.; MING, Q. L.; LIN, B.; RAHMAN, K.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; QIN, L. P. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 215-232, 2016.
- ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, p. 117-123, 2000.
- ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**. 191p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. M. A.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.459-471, 2010.
- ZERAIK, M. L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J.; TITS, M.; YARIWAKE, J. H.; ANGENOT, L.; FRACK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myelo peroxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, p. 259-265, 2011.
- ZOLMAN, B. K.; YODER, A.; BARTEL, B. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. **Genetics**, v. 156, p. 1323-1337, 2000.
- ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl flavonoids

from south american *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-329, 2012.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosyl flavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, p.1221–1226, 2009.