



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

Raphaella Reis dos Santos Tierno

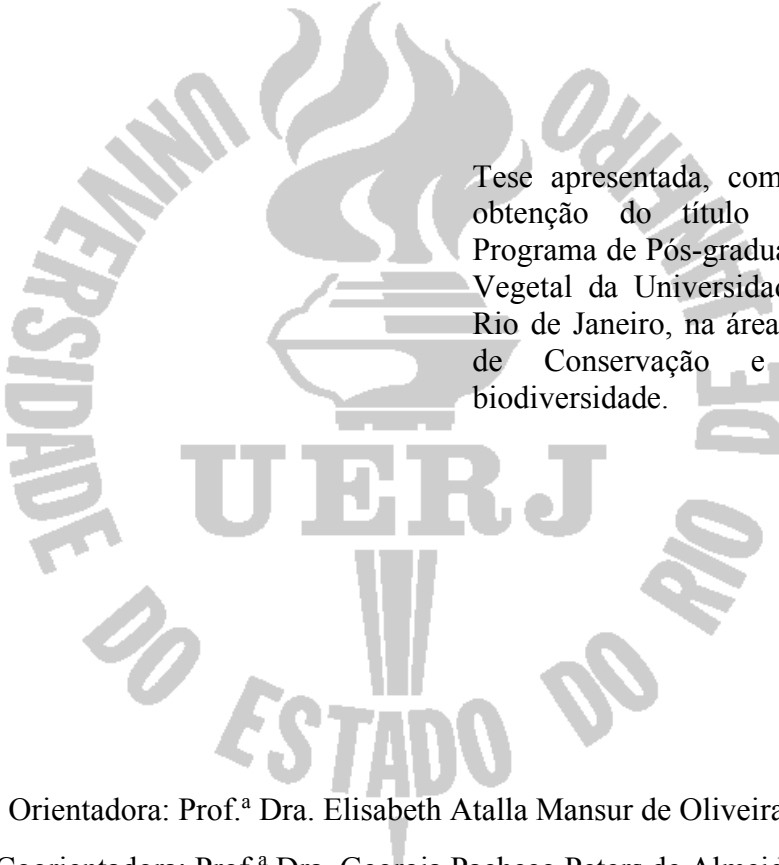
Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora setacea* DC cv “BRS Pérola do Cerrado”

Rio de Janeiro

2022

Raphaela Reis dos Santos Tierno

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de
Passiflora setacea DC cv “BRS Pérola do Cerrado”**



Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Conservação e utilização da biodiversidade.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Rio de Janeiro

2022

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

T564 Tierno, Raphaela Reis dos Santos.
Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora setacea* DC cv "BRS Pérola do Cerrado"/
Raphahela Reis dos Santos Tierno. – 2022.
138 f. : il.

Orientadora: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Passiflora - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e Meios de cultura - Teses. 3. Antioxidantes - Teses. I. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 582.842.7

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

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



Assinatura

RJ, 21 de março de 2022

Data

Raphaela Reis dos Santos Tierno

**Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de
Passiflora setacea DC cv “BRS Pérola do Cerrado”**

Tese apresentada, como requisito para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Conservação e utilização da biodiversidade.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2022.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Cláudia Simões Gurgel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. André Mesquita Marques
Farmanguinhos - FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Bianka de Oliveira Soares
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Helena Regina Pinto Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos, Davi e Laís.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por absolutamente tudo na minha vida.

Ao Pasquale, meu esposo, que tem sido meu companheiro nos últimos dez anos e com paciência e amor se tornou meu Norte na tempestade. Obrigada, meu anjo da guarda!

Aos meus pais e meus irmãos, pela base familiar que é meu alicerce de todos os dias. E aos meus sobrinhos, Davi e Laís, por todos os momentos de fofura, amor e alegria que me proporcionam todos os dias. Obrigada família!

À Profa. Dra. Elisabeth Mansur, por todos os anos de orientação, ensinamentos e principalmente pela honra de ter sido sua aluna. Pela compreensão, paciência e apoio nessa reta final do doutorado. Muito obrigada, Beth.

À Profa. Dra. Georgia Pacheco, pelas aulas de biologia celular que me fizeram conhecer o Labmit. Agradeço imensamente a oportunidade de ter vivenciado todas as experiências que esse laboratório me proporcionou. Obrigada por toda ajuda, conselhos e pela amizade de sempre.

À Dra. Renata Garcia, por toda ajuda e amizade de sempre. Por ser uma pessoa tão iluminada que emanam dela alegria e vida em todos os cantos desse laboratório. Por sempre estar disponível quando a gente mais precisa e por sempre ter a palavra certa para acalmar os alunos ansiosos. Obrigada, Renatinha!

As minhas amigas Jamine Pettinelli e Leila Cantelmo, por toda ajuda psicológica, cinema, risadas e preparação de festas. Vocês foram meu alicerce acadêmico nas horas mais difíceis e por isso e muito mais agradeço. Obrigada meninas.

Aos colegas do Labmit, Marcela, Isabela, Tielen e Vinicius, por dividirem comigo cada momento dessa jornada. Nosso laboratório é composto por pessoas com personalidades bem diferentes, mas quando a gente olha para o coletivo observamos o quanto as peças se encaixam e como é boa a nossa convivência. E por isso, apesar de não dizer com a frequência que deveria, eu agradeço a todos. Obrigada gente!

Ao Gilson e a Teresa, por toda ajuda técnica do laboratório e ainda pelas conversas e risadas que trazem leveza ao trabalho.

As professoras Rachel Gagliardi, Claudia Simões e Norma Albarello, por todo ensinamento ao longo desses anos que ajudou a formar a profissional que sou hoje. Obrigada!

Aos colegas do Labplan, que dividem conosco o espaço físico, as aflições e angústias de dias de precariedade da Universidade, mas também momentos de alegria e parceria. E um

agradecimento especial ao Matheus Tirado por salvar meu notebook e por consequência essa tese. Obrigada Matheus.

À Profa. Cátia Callado e à Jeane, do laboratório de Anatomia Vegetal, por serem essas pessoas cheias de empatia, respeito e consideração. Muito obrigada pelo carinho e pelo suporte na reta final do trabalho. Obrigada.

Ao Prof. Davyson Moreira, pelas análises fitoquímicas, fundamentais na conclusão desse trabalho.

Aos farmacêuticos, Eduardo Fonseca e Iranilda Calado, pela ajuda com as amostras de extrato e por todo apoio técnico.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

Toda vez que você planeja, seu futuro pode ser moldado da maneira que você quiser.

Cristiane Cardoso

RESUMO

TIERNO, Raphaela Reis dos Santos. **Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora setacea* DC cv “BRS Pérola do Cerrado”**. 2022. 138f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O gênero *Passiflora* ocorre principalmente em regiões de clima tropical, sendo o Brasil um importante centro de diversidade. Os maracujás, como são conhecidas as espécies do gênero, possuem um grande interesse ornamental, principalmente devido à beleza e exuberância de suas flores. Além disso, podem ser utilizados com fins alimentícios e medicinais, devido às diversas atividades farmacológicas reconhecidas, principalmente como ansiolíticos. A cultivar *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado foi desenvolvida no programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados objetivando o aumento da produtividade e tamanho do fruto, que é rico em sais minerais e substâncias antioxidantes. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi o estabelecimento de sistemas de culturas *in vitro*, a caracterização do perfil fitoquímico e avaliação do potencial antioxidante dessa cultivar. Calos friáveis foram induzidos a partir de segmentos caulinares e foliares, em meio MSM suplementado com picloram (PIC) em diferentes concentrações (4,14, 20,7 e 41,4 μM), mantidos no escuro, luz fluorescente branca ou diferentes tipos de LEDs (azul, vermelho, branco e azul + vermelho). A formação de calos foi observada em resposta a todos os tratamentos, com frequências entre 81,6 e 100%. A análise fitoquímica de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, assim como dos calos obtidos, foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e CLAE-UV acoplada à espectrometria de massas. Os flavonoides vicenina-2 e shaftosideo foram identificados como majoritários nos extratos de folhas. Por outro lado, as análises cromatográficas indicaram que o LED azul induziu maior produção de substâncias bioativas nos extratos de calos. Todas as amostras apresentaram baixa atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH, porém alta capacidade de quelar íons de ferro. Além disso, foi realizada a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Embora não tenham sido observadas diferenças na atividade de SOD e CAT, a atividade específica de APX foi aumentada em extratos de folhas de plantas micropropagadas, enquanto que os calos obtidos a partir de segmentos internodais sob LED vermelho apresentaram maior atividade das três enzimas. Este é o primeiro trabalho de avaliação da influência das condições de iluminação em sistemas *in vitro* e na produção de substâncias bioativas em *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado. No geral, a eficiência de calogênese, acúmulo de biomassa e atividade das enzimas antioxidantes foram influenciados pelo LED vermelho e a produção de substâncias de interesse biotecnológico foi influenciada pelo LED azul.

Palavras-chave: Calogênese. Ácidos graxos. Flavonoides. Enzimas antioxidantes. LED.

ABSTRACT

TIERNO, Raphaela Reis dos Santos. **Tissue culture, phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant potential of *Passiflora setacea* DC cv “BRS Pérola do Cerrado”**. 2022. 138f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The genus *Passiflora* occurs mainly in tropical climate regions, with Brazil being an important center of diversity. Passion fruit, as the species of the genus are known, are of great ornamental interest, mainly due to the beauty and exuberance of their flowers. Furthermore, they can be used for food and medicinal purposes, due to the various recognized pharmacological activities, mainly as anxiolytic. *In vitro* culture systems allow the modulation of the production of metabolites of interest by modifying culture conditions. The cultivar *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado was developed by the genetic improvement program of Embrapa Cerrados aiming to increase the productivity and size of the fruit, which is rich in mineral salts and antioxidant substances. Therefore, the general objective of this work was to establish *in vitro* culture systems, characterize the phytochemical profile and evaluate the antioxidant potential of this cultivar. Friable calluses were induced from stem and leaf segments in MSM medium supplemented with picloram (PIC) at different concentrations (4.14, 20.7 and 41.4 μM) and kept in the dark, white fluorescent light or different types of LEDs (blue, red, white and blue + red). Callus formation was observed in response to all treatments, with frequencies between 81.6 and 100%. Phytochemical analysis of leaves of plants *in vivo* and *in vitro*, as well as calluses was performed by Thin-Layer Chromatography (LCD), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and HPLC-UV coupled to mass spectrometry. The flavonoids vicenin-2 and schaftoside were identified as major constituents in both leaf extracts. On the other hand, chromatographic analyzes indicated that blue LED induced greater production of bioactive substances in callus extracts. All samples showed low antioxidant activity by the DPPH assay, but high capacity to chelate iron ions. In addition, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) was performed. Although no differences in SOD and CAT activity were observed, the specific activity of APX was increased in leaf extracts from micropropagated plants. Calluses obtained from internodal segments under red LED showed higher activity of the three enzymes. This is the first work evaluating the influence of lighting conditions in *in vitro* culture systems, on the production of bioactive substances in *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado. In general, the efficiency of callogenesis, biomass accumulation and activity of antioxidant enzymes were influenced by the red LED and the production of substances of biotechnological interest was influenced by the blue LED.

Keywords: Callogenesis. Fatty acids. Flavonoids. Antioxidants enzymes. LED.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo secundário e suas conexões com o metabolismo primário.....	21
Figura 2 –	Distribuição de espécies do gênero <i>Passiflora</i> nas regiões do Brasil.....	36
Figura 3 –	Diversidade das flores de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	38
Figura 4 –	Produção brasileira de maracujá por região em 2019.....	39
Figura 5 –	Estrutura básica dos alcaloides encontrados no gênero <i>Passiflora</i>	41
Figura 6 –	Estrutura dos principais flavonoides encontrados no gênero <i>Passiflora</i>	42
Figura 7 –	Estrutura de algumas saponinas encontradas no gênero <i>Passiflora</i>	43
Figura 8 –	Aspectos morfológicos de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	45
Figura 9 –	Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH.....	59
Figura 10 –	Curva padrão de atividade antioxidante do EDTA avaliada pelo método da atividade quelante do íon de ferro.....	60
Figura 11 -	Calos formados a partir de segmentos internodais de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 µM, após 60 dias de cultura sob diferentes qualidades de luz.....	64
Figura 12-	Perfil cromatográfico, pelo método de CCD, para identificação de flavonoides em extratos de folhas de plantas mantidas <i>in vivo</i> e produzidas <i>in vitro</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	68
Figura 13 -	Perfil cromatográfico por CLAE-UV dos extratos etanólicos obtidos de folhas <i>in vivo</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado utilizando duas metodologias de extração, na condição de triagem.....	69
Figura 14 -	Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD de extratos etanólicos de folhas <i>in vivo</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado utilizando duas metodologias de extração, na condição para detecção de flavonoides, com detecção em UV _{340nm}	70

Figura 15 - Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD de extratos etanólicos de calos obtidos a partir de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com PIC a 41,4 µM sob LED azul de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	71
Figura 16 - Análise cromatográfica por CLAE-UV-IES-EM (modo negativo) dos extratos etanólicos de folhas de plantas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	72
Figura 17 - Cromatogramas de íons totais por CLAE-UV-IES-EM de extratos etanólicos de calos derivados de segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 µM e mantidos sob diferentes qualidades de luz de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	75
Figura 18 - Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em calos derivados de segmentos internodais de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado incubados sob diferentes qualidades de luz.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas <i>in vitro</i>	29
Quadro 2 - Cultivo <i>in vitro</i> de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	47
Quadro 3 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a determinação do perfil cromatográfico de materiais <i>in vitro</i> e folhas <i>in vivo</i> de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado, por CLAE-UV.....	57
Quadro 4 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a detecção de flavonoides em materiais <i>in vitro</i> e folhas <i>in vivo</i> de <i>P. setacea</i> BRS Pérola do Cerrado, por CLAE-UV.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Calogênese (%) a partir de segmentos caulinares e foliares de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob diferentes qualidades de luz.....	65
Tabela 2 -	Peso seco (g) de calos friáveis derivados de segmentos caulinares e foliares de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC e mantidos sob diferentes qualidades de luz, por 60 dias.....	66
Tabela 3 -	Contribuição relativa do tipo de explante, condições de luz e concentração de picloram e suas interações com a variação na formação de calos de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	67
Tabela 4 -	Substâncias detectadas por CLAE-UV-IES-EM em extratos de folhas de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	73
Tabela 5 -	Substâncias encontradas em extratos de calos derivados de segmentos internodais de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 µM sob diferentes qualidades de luz, detectadas por CLAE-UV-IES-EM.....	76
Tabela 6 -	Potencial antioxidante determinado pelos ensaios de captura do radical DPPH e capacidade quelante de íons de ferro de extratos etanólicos de materiais obtidos <i>in vivo</i> e produzidos <i>in vitro</i> de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenoacético
APX	Ascorbato peroxidase
BAP	Benzilaminopurina
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
ERO	Espécies reativas de oxigênio
IBA	Ácido indol butírico
LED	<i>Light emitting diode</i>
PIC	Picloram
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	Metabolismo secundário e produção de substâncias bioativas em plantas	20
1.2	Cultura de tecidos vegetais	22
1.2.1	<u>Fatores que influenciam a cultura <i>in vitro</i></u>	25
1.2.1.1	<u>Influência da luz nos sistemas <i>in vitro</i></u>	27
1.2.2	<u>Estresse oxidativo na morfogênese <i>in vitro</i></u>	34
1.3	Gênero <i>Passiflora</i>	36
1.3.1	<u><i>Passiflora setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado</u>	44
1.3.2	<u>Cultura de tecidos e produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários em <i>Passiflora</i></u>	46
2	OBJETIVOS	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	Germinação <i>in vitro</i>	54
3.2	Indução de calogênese	54
3.3	Análise fitoquímica	55
3.3.1	<u>Preparo dos extratos</u>	55
3.3.2	<u>Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u>	55
3.3.3	<u>Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV (CLAE-UV)</u>	56
3.4	Avaliação da atividade antioxidante	58
3.4.1	<u>Ensaio de captura do radical DPPH</u>	58
3.4.2	<u>Determinação da capacidade quelante de íons ferrosos</u>	59
3.5	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	60
3.5.1	<u>Extração de proteínas</u>	60
3.5.2	<u>Análise da atividade de SOD</u>	61
3.5.3	<u>Análise da atividade de CAT</u>	62
3.5.4	<u>Análise da atividade de APX</u>	62
3.6	Análise estatística	63
4	RESULTADOS	64
4.1	Indução de calogênese	64

4.2	Análise Fitoquímica	67
4.2.1	<u>Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u>	67
4.2.2	<u>Análise por CLAE-UV</u>	69
4.2.3	<u>Análise por CLAE-UV-IES-EM</u>	71
4.3	Avaliação da atividade antioxidante	77
4.4	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	78
5	DISCUSSÃO	81
	CONCLUSÕES	86
	PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS	88
ANEXO A	Artigo intitulado “Light quality and explant type modulate growth, antioxidant properties and bioactive compounds production of calluses of <i>Passiflora setacea</i> cv BRS Pérola do Cerrado” publicado na revista Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).....	116
ANEXO B	Artigo intitulado “Flavonoid content and antioxidant potential of leaf extracts of <i>Passiflora setacea</i> cv BRS Pérola do Cerrado, a new wild passion fruit cultivar” aceito para publicação na revista Journal of Medicinal Plant Research.....	129

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* apresenta maior representatividade dentro da família Passifloraceae (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Possui aproximadamente 560 espécies e 400 híbridos, e ao menos 150 espécies são nativas do território brasileiro (BRAGA et al., 2017). Apesar disso, no Brasil, as espécies comerciais ainda estão limitadas ao maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims), sua variante de casca amarela (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e o maracujá-doce (*Passiflora alata* Custis) (MAMEDE et al., 2017). Sendo assim, o desenvolvimento de cultivares por meio de programas de melhoramento tornou-se uma estratégia interessante para atender as demandas do cultivo de maracujá nos setores produtivo, industrial e do consumidor (FALEIRO; SANTOS; JUNQUEIRA, 2018).

As cultivares de maracujás silvestres tem grande potencial para porta enxerto e são uma alternativa para diversificar os sistemas de produção para consumo *in natura* e novas opções para o setor de ornamentais e farmacêutico (FALEIRO et al., 2018), além disso apresentam resistência a patógenos. Entre as cultivares desenvolvidas pela EMBRAPA e registradas no RNC (Registro Nacional de Cultivares) estão BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, BRS Sertão Forte, BRS Mel do Cerrado e BRS Pérola do Cerrado. A cultivar *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado foi o primeiro produto biotecnológico da linha funcional-medicinal, e possui alto teor de substâncias antioxidantes e sais minerais na polpa (EMBRAPA, 2015), sendo ela o objeto desse estudo.

Considerando a importância econômica e ornamental dos maracujás, uma alternativa para o aproveitamento dos recursos vegetais, sem que haja danos ao meio ambiente, é a utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais. Esta ferramenta permite a propagação clonal sob condições controladas, conservação do germoplasma *in vitro* (CHANDRA et al., 2010; FALEIRO et al., 2018) e a produção de substâncias bioativas. Diversos fatores podem afetar as culturas *in vitro*, entre eles a qualidade da luz é um dos mais importantes que afetam o crescimento e desenvolvimento das plantas (LIU et al., 2014), bem como promover o aumento ou diminuição de substâncias provenientes do metabolismo secundário (LANDI et al., 2019).

Esse trabalho integra a rede Passitec, coordenada pela EMBRAPA Cerrados, que tem como objetivo o desenvolvimento tecnológico para o uso funcional e medicinal de espécies silvestres de passifloras nativas do Brasil, com ênfase à pesquisa de efeitos biológicos e

composição de bioativos. Considerando a importância medicinal do gênero *Passiflora* e os poucos trabalhos realizados com a cultivar *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado, o presente estudo tem como objetivo estudar a influência da qualidade da luz na morfogênese e na produção de metabólitos secundários dessa cultivar.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Metabolismo secundário e produção de substâncias bioativas em plantas

O metabolismo vegetal pode ser dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pelos processos essenciais das células, como divisão, respiração, armazenamento e reprodução (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2008). Por outro lado, o metabolismo secundário ou especial está relacionado, principalmente, com a produção de substâncias que permitem a interação da planta com o meio, garantindo sua adaptação diante de fatores bióticos e abióticos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Essas substâncias exercem funções que estão associadas a atração de polinizadores, proteção contra patógenos, radiação ultravioleta e poluição, estresse hídrico, sinalização intraespecífica, alelopatia e outras funções. As substâncias derivadas do metabolismo secundário estão distribuídas diferencialmente entre os grupos taxonômicos, expressando a individualidade de famílias, gêneros e espécies (REZENDE et al., 2016).

Os produtos do metabolismo secundário das plantas apresentam uma grande variedade de efeitos biológicos e podem ser utilizados, por exemplo, como biopesticidas, cosméticos, agroquímicos, fragrâncias, produtos farmacêuticos e aditivos alimentares (FUMAGALI et al., 2008). Os metabólitos secundários podem ser classificados, de acordo com suas rotas biossintéticas, em terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (Figura 1) (SIMÕES et al., 2017).

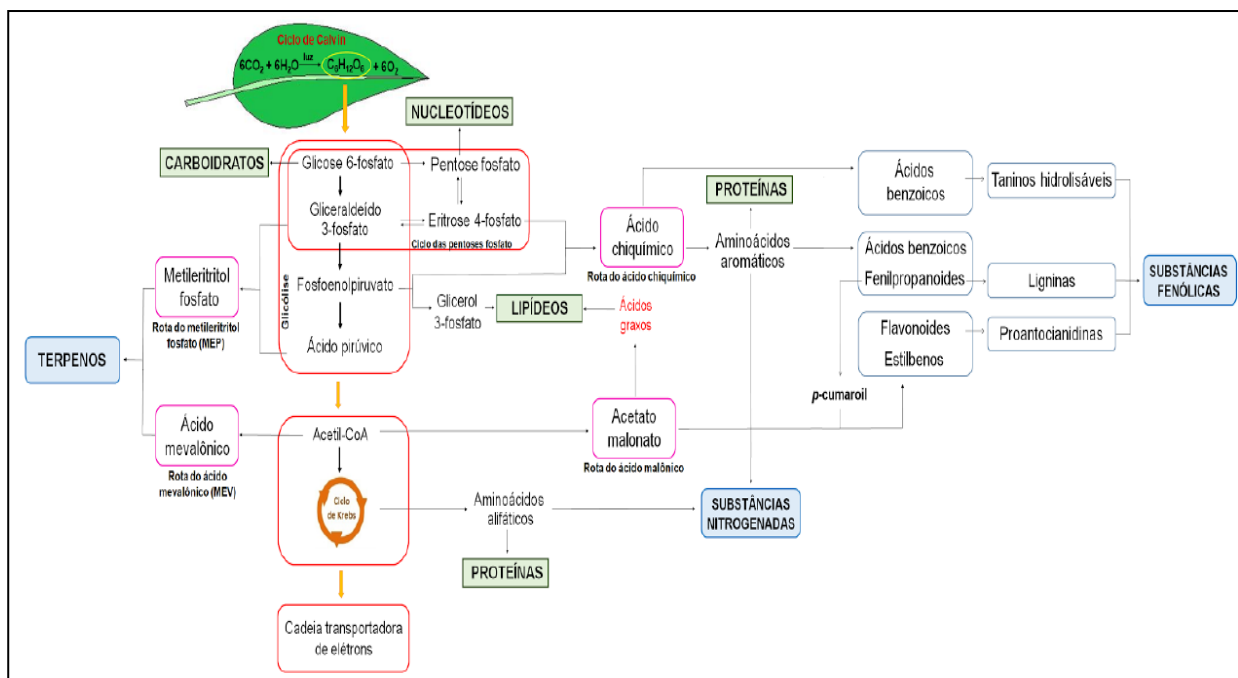
Os terpenos são derivados do ácido mevalônico ou do piruvato e 2-metileritritol (MEP). São denominados de acordo com a quantidade de isoprenos (estrutura com cinco carbonos), sendo classificados em monoterpenos (C_{10}), sequiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (mais de 40 carbonos) (WINK, 2015). Cada um desses tipos possui uma ampla gama de funções. Os monoterpenos e os sequiterpenos, por exemplo, estão presentes nos óleos voláteis e são associados com os mecanismos de sinalização das plantas (DEWICK, 2009).

As substâncias fenólicas são originadas da via do ácido chiquímico e incluem moléculas com, pelo menos, um anel aromático, em que átomos de hidrogênio são substituídos por grupos hidroxila. Ácidos fenólicos simples, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas e flavonoides são exemplos de substâncias fenólicas (SILVA et al., 2010; ROCKENBACH et

al., 2018). Esta classe está envolvida na proteção contra raios UV, insetos e fungos, além de possuírem ação alelopática (FUMAGALI et al., 2008).

As substâncias nitrogenadas são derivadas de aminoácidos alifáticos ou aromáticos, e incluem alcaloides, betalainas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Estão envolvidas na defesa anti-herbivoria e na atração de polinizadores (REZENDE et al., 2016), apresentam efeitos no sistema nervoso central e podem ser utilizadas, por exemplo, como analgésicos e no tratamento contra o câncer.

Figura 1 - Esquema geral das vias de biossíntese do metabolismo secundário e suas conexões com o metabolismo primário.



Legenda: circulado em vermelho – via de biossíntese do metabolismo primário e seus produtos (retângulos verdes); circulado em rosa – vias de biossíntese do metabolismo secundário e seus produtos (retângulos azuis).
Fonte: Moreira (2015).

Devido à presença dessas substâncias resultantes do metabolismo secundário, as plantas são utilizadas para o tratamento de doenças desde o início das civilizações. Dados da OMS (Organização Mundial da Saúde) apontam que 80% da população utiliza a medicina tradicional como primeiro recurso no tratamento de doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), sendo grande parte dos medicamentos derivados de princípios ativos de plantas. Contudo, essas substâncias são geralmente sintetizadas em baixas concentrações (menos de 1% de peso seco), variando de acordo com o estado fisiológico e o estágio de

desenvolvimento da planta (NAMDEO, 2007). Além disso, a síntese pode também ser influenciada por fatores como variações geográficas, sazonais e ambientais, concentração de gás carbônico na atmosfera, disponibilidade de nutrientes e condições de iluminação (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

A crescente demanda por plantas com propriedades curativas fez aumentar o extrativismo, levando à degradação de populações naturais e de seus habitats, além da perda de diversidade genética, o que pode acarretar na extinção de algumas espécies (DIAS et al., 2016). Nesse contexto, é necessário que haja a promoção do uso sustentável e da conservação dos recursos genéticos com potencial medicinal (CARVALHO; COSTA; CARNELOSSI, 2010).

1.2 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais, baseiam-se no cultivo *in vitro* de células, tecidos ou órgãos em meio nutritivo sólido ou líquido, sob condições assépticas e controladas de temperatura e luminosidade. Possui aplicações em diversas áreas, incluindo a conservação e o melhoramento genético, a multiplicação de espécies de difícil propagação, a limpeza clonal, a clonagem de plantas em escala comercial e a geração da variabilidade genética, além de estudos de fisiologia e genética (ANDRADE, 2002; MORAIS et al., 2012). Adicionalmente, as técnicas de cultivo *in vitro* permitem o estabelecimento de sistemas sustentáveis para a produção de metabólitos secundários, por meio da modulação das condições de cultura.

As culturas *in vitro* possuem vantagens como a possibilidade de seleção de linhagens que garantam uma qualidade consistente do produto, a utilização de um espaço reduzido e a ausência de pesticidas e herbicidas. Além disso, a produção de metabólitos *in vitro* pode ser aumentada com a utilização de eliciadores bióticos ou abióticos (DIAS et al., 2016; SOUZA; RESCAROLLI; NUNEZ, 2018). Dessa forma, as técnicas de cultura de tecidos vegetais constituem uma importante ferramenta biotecnológica para a realização de pesquisas fitoquímicas e a produção de substâncias bioativas.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são fundamentadas nos princípios de totipotência e competência celular. A totipotência consiste na capacidade que as células vegetais possuem de, em resposta a sinais específicos, regenerar indivíduos completos e geneticamente idênticos à planta doadora (BHATIA, 2015). Embora a expressão da totipotencialidade seja dependente do nível de diferenciação do tecido, todas as células vegetais, teoricamente, possuem essa

capacidade (NETO; ANDRADE, 2013). A competência celular está relacionada à capacidade das células em responder a estímulos específicos e seguir uma determinada rota morfogênica (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; ANDRADE, 2002).

O desenvolvimento de sistemas *in vitro* é iniciado com a escolha do explante (pequeno fragmento de tecido), levando em consideração o tipo de tecido, a idade e as condições fisiológicas da planta matriz (FREITAG et al., 2012). Seguem-se a descontaminação do material e sua inoculação em meio de cultura. A descontaminação visa à eliminação de micro-organismos, sendo utilizados diferentes agentes descontaminantes, concentrações e períodos de tratamento (CID, 2010).

Os meios de cultura fornecem substâncias fundamentais para o crescimento *in vitro*, sendo compostos por sais inorgânicos, uma fonte de carbono e vitaminas, além de componentes adicionais, como os reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Existem várias formulações que foram adaptadas de acordo com características da espécie estudada e do objetivo do cultivo, sendo o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) o mais utilizado.

O processo de obtenção de plantas *in vitro* pode ocorrer a partir da multiplicação de meristemas pré-existentes, por organogênese ou por embriogênese somática (NETO; ANDRADE, 2013). Na multiplicação de meristemas preexistentes, as células do explante seguem o seu curso normal de desenvolvimento a partir ápices caulinares ou radiculares e gemas axilares, sem que haja etapas prévias de desdiferenciação e rediferenciação celular. Essa via é a mais indicada para programas de conservação *in vitro*, já que o risco de alterações genéticas é reduzido (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A organogênese é o processo de formação de órgãos vegetais a partir de tecidos já diferenciados, cujas células retornam a um estágio semelhante ao meristemático (desdiferenciação) e sofrem uma nova diferenciação, levando à formação de gemas adventícias (SILVA; MENDES; MOURÃO-FILHO, 2008; BHATIA, 2015).

Os processos de desdiferenciação e rediferenciação também ocorrem na embriogênese somática, em que uma única célula ou grupo de células vegetativas dão origem a embriões sem que tenha havido fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2005; RAI et al., 2011; BHATIA, 2015). Os embriões somáticos são estruturas bipolares que possuem meristemas apicais e radiculares (REY; MROGINSKI, 2006), e que passam pelos mesmos estádios de desenvolvimento dos embriões zigóticos (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Ao contrário da via organogênica, em que o sistema vascular das gemas adventícias é conectado ao tecido do explante, os embriões somáticos possuem um sistema vascular independente (ANDRADE,

2002). A embriogênese somática é o maior exemplo da expressão da totipotencialidade das células vegetais, e diversos estudos têm sido desenvolvidos para otimização da multiplicação e conversão de embriões somáticos em plantas (AHMADI et al., 2014).

Embora a embriogênese somática apresente vantagens como altas taxas de multiplicação dos embriões (NAWROT-CHORABIK, 2012), existem limitações, como por exemplo o desenvolvimento assíncrono dos embriões, que pode acarretar anomalias e interrupção da produção após períodos prolongados (DEO et al., 2010).

Tanto a organogênese quanto a embriogênese podem ocorrer de forma direta, a partir das células dos explantes, ou de forma indireta, quando ocorre uma fase intermediária de calo, definida como uma massa celular com crescimento desordenado (SILVA; MENDES; MOURÃO-FILHO, 2008; XU; HUANG, 2014).

Além da obtenção de plantas, os sistemas *in vitro* permitem a produção de substâncias bioativas. As técnicas mais empregadas com essa finalidade são as culturas de órgãos isolados (brotos e raízes adventícias) e as culturas desorganizadas, como calos e células em suspensão, que são obtidas a partir de calos friáveis em meio líquido (FUMAGALI et al., 2008; ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013). Por exemplo, culturas de calos de *Artemisia absinthium* L. (ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013) e *Arachis hypogaea* L. (YANG et al., 2010) têm sido utilizadas para produção de flavonoides e estilbenos, respectivamente, enquanto culturas de raízes foram utilizadas para a obtenção de saponinas em *Panax ginseng* C. A. Meyer (KIM et al., 2009) e alcaloides em *Nicotiana tabacum* L. (ZHAO et al., 2012). Adicionalmente, culturas de células em suspensão de *Hypericum perforatum* L. (WANG et al., 2015), *Coscinium fenestratum* Colebr. (KASHYAP; KAPOOR; KALE, 2016) e *Datura stramonium* L. (KHATER; SHALABY; WAFA, 2018) foram empregadas para a produção de flavonoides e alcaloides.

Independentemente do sistema adotado, as culturas *in vitro* estão sujeitas a diversos fatores, tanto aqueles inerentes à planta doadora, relacionados ao seu genótipo e estado fisiológico, quanto a fatores externos, associados às condições *in vitro* (SCHUELTER et al., 2015; LAZZARINI et al., 2018). O ajuste das condições da cultura para cada espécie torna-se, portanto, um fator fundamental para o sucesso dos protocolos.

1.2.1 Fatores que influenciam a cultura *in vitro*

Os meios de cultura têm efeito significativo na resposta morfológica *in vitro*. A composição de sais minerais e a disponibilidade de fontes de carbono podem ser ajustadas às exigências nutricionais de cada espécie, obedecendo às características da nutrição mineral básica das plantas em condições naturais (MIRANDA et al., 2016). A consistência do meio de cultura (líquido ou sólido) também é um fator importante visto que pode afetar a absorção dos nutrientes (SUTHAR; HABIBI; PUROHIT, 2011).

O tipo e a concentração dos reguladores de crescimento também têm grande importância para o desenvolvimento *in vitro* (PINHAL et al., 2011; BEZERRA et al., 2014). As classes de reguladores de crescimento mais utilizadas são as auxinas, citocininas, ácido abscísico (ABA) e giberelinas.

As auxinas, em geral, promovem divisão celular, alongamento e diferenciação, e também são responsáveis pela dominância apical (TAIZ et al., 2017). No cultivo *in vitro*, atuam na diferenciação de raízes, na calogênese, no alongamento de brotos e na embriogênese somática (MELO, 2002). As principais auxinas utilizadas na cultura de tecidos vegetais são o ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), picloram (PIC) e ácido 3-indolacético (AIA).

As citocininas atuam nos processos de divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea e, por isso, possuem um papel importante no crescimento das gemas laterais (TAIZ et al., 2017). A diferenciação de gemas adventícias e a indução e proliferação de gemas axilares são algumas respostas morfológicas induzidas pelas citocininas na cultura *in vitro* (MELO, 2002). Entre as citocininas mais frequentemente adotadas, encontram-se a cinetina (CIN), o 6-benzilaminopurina (BAP) e a zeatina, assim como outras substâncias que possuem atividade citocinínica, como o tidiazuron (TDZ) e meta-topolinas (mT) (JARDIM et al., 2010).

As giberelinas estimulam o crescimento de órgãos, principalmente o alongamento caulinar, e também atuam no desenvolvimento de embriões somáticos e na germinação de sementes. Já foram identificadas 137 giberelinas, sendo as mais conhecidas as GA1, GA3, GA4, GA5, GA6 e GA7 (TAIZ et al., 2017). O ácido abscísico (ABA) normalmente está envolvido em processos de dormência e abscisão de folhas e frutos. No cultivo *in vitro*, tem sido utilizado, por exemplo, na maturação de embriões somáticos (PAIVA; PAIVA, 2001; FRAGA et al. 2015).

Além dos reguladores mais conhecidos, outras substâncias também são utilizadas na cultura *in vitro* como, por exemplo, o ácido jasmônico, ácido salicílico, os brassinosteróides e

as poliaminas (SANTNER, CALDERON-VILLALOBOS; ESTELLE, 2009). O ácido jasmônico (JA) e o ácido salicílico (AS) atuam na defesa da planta contra estresses abióticos e bióticos, e são utilizados como eliciadores em diferentes culturas *in vitro* para induzir a biossíntese de metabólitos secundários (AVANCI et al., 2010; SINGH; DWIVEDI, 2018).

Os brassinosteróides são um grupo de hormônios esteroides polihidroxilados essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo resposta a estresse e fotomorfogênese (OKLESTKOVA et al., 2015). Alguns estudos já evidenciaram a importância dessa classe no processo de embriogênese somática de *Cocos nucifera* L. (AZPEITIA et al., 2003), *Pinus taeda* L. (PULLMAN et al., 2003), *Lactuca sativa* L. (NÚÑEZ et al., 2004), *Gossypium hirsutum* L. (AYDIN et al., 2006) e *Coffea arabica* L. (CHONE et al., 2018).

As poliaminas são moléculas que apresentam em sua estrutura grupamentos amino separados por cadeias metilênicas e estão envolvidas em vários processos fisiológicos e no desenvolvimento das plantas. As poliaminas de ocorrência mais comuns são espermidina, espermina e putrescina (EL-DAWAYATI; GHAZZAWY; MUNIR, 2018). Nas culturas *in vitro*, o efeito das poliaminas na regeneração de brotos e conversão de embriões somáticos já foi demonstrado em diferentes espécies vegetais, como por exemplo, *Phoenix dactylifera* L. (HEGAZY; ABOSHAMA, 2010; EL-DAWAYATI, GHAZZAWY; MUNIR, 2018), *Daucus carota* L. (GÓRECKA et al., 2014), *Triticum aestivum* L. (AYDIN et al., 2016) e *Gloriosa superba* L. (SIVAKUMAR et al., 2019).

As culturas *in vitro* podem também ser influenciadas pelo tipo de explante utilizado (YANG et al., 2015) e pela posição em que é inoculado no meio de cultura (BUCKSETH et al., 2018), assim como o estado fisiológico, o genótipo e as condições fitossanitárias da planta matriz (ISAH, 2015).

A influência de parâmetros físicos do ambiente de cultivo, como tipo de frasco e de tampa, temperatura e condições de iluminação podem igualmente modular tanto as respostas morfogênicas como a capacidade biossintética *in vitro* (MOLLO et al., 2011; VAHDATI; HASSANKHAH, 2014; CHEN, 2015; NIEVOLA et al. 2017; LAZZARINI et al. 2019). Considerando os objetivos deste trabalho, estudos sobre a influência da luz na morfogênese e na produção de substâncias bioativas serão discutidos a seguir.

1.2.1.1 Influência da luz nos sistemas *in vitro*

A luz exerce um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, estando diretamente envolvida em processos vitais como a fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo (JUNG et al., 2021). A eficiência nas taxas fotossintéticas, por exemplo, pode aumentar em comprimentos de onda que correspondem ao vermelho (650 - 680nm), juntamente com o azul (425 - 490nm), enquanto aqueles que correspondem ao violeta (400 - 425nm) e ultravioleta (280 - 400nm) ativam o fototropismo (SORGATO et al., 2015). O processo morfogênico *in vitro* é também significativamente influenciado pelas condições de iluminação, não dependendo apenas da ausência ou presença de luz, mas também da qualidade (diferentes comprimentos de onda), quantidade (fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo) (ROCHA et al., 2010; MUNEEER et al. 2014).

A absorção dos diferentes comprimentos de onda ocorre de forma seletiva, através de fotorreceptores que interpretam o sinal e iniciam uma sequência de eventos bioquímicos envolvidos nas respostas morfogênicas (BRAGA et al., 2009). Esses fotorreceptores agrupam-se em três classes, a saber: fitocromos, criptocromos e fototropinas, e fotorreceptores de UV-B (PALMA et al., 2021).

Fitocromos são cromoproteínas que possuem absorção máxima de luz na região do vermelho (660nm) e vermelho longo (730nm), e podem existir em duas formas, a inativa e a ativa. São responsáveis por mediar respostas como a indução floral, ritmo circadiano e germinação de sementes (BATISTA et al., 2018).

Os criptocromos e as fototropinas são flavoproteínas que absorvem a luz na faixa do azul (425 a 490nm) e ultravioleta A (320 a 400nm). Os criptocromos estão associados ao cromóforo flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e inibem o crescimento caulinar e a expansão dos cotilédones (MEISEL; URBINA; PINTO, 2011). As fototropinas estão associadas ao cromóforo flavina adenina mononucleotídeo (FAM) e são responsáveis pela abertura dos estômatos e a movimentação dos cloroplastos (BRIGGS; CHRISTIE, 2002). Os fotorreceptores de UV-B, ainda pouco estudados, absorvem a radiação ultravioleta na faixa de 280 a 320nm.

Alguns dos laboratórios de cultura de tecidos vegetais utilizam lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca na faixa entre 350 a 750nm (RIBEIRO et al., 2009). Entretanto, estudos que avaliam outras faixas espectrais, como o vermelho e o azul, isoladamente ou combinados, têm demonstrado grande eficiência na morfogênese *in vitro* de diferentes espécies (NHUT et al., 2002 e 2003; POUDEL, KATAOKA; MOCHIOKA, 2008; ROCHA et al., 2010 e 2013;

CHEN et al., 2014; ARENA et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017; ZHENG; LABEKE, 2018). Embora as lâmpadas fluorescentes sejam comumente adotadas em protocolos de cultura de tecidos vegetais, o uso de diodos emissores de luz (LED, do inglês *light emitting diodes*) aumentou significativamente e diferentes estudos avaliaram a influência dos LED na morfogênese *in vitro*, na produção de metabólitos secundários (JUNG et al., 2021; HASHIM et al., 2021) e na atividade antioxidante (PASHKOVSKIY et al., 2018; KWON et al., 2018) com resultados diferentes de acordo com a espécie. Os LED emitem comprimentos de onda específicos, com baixa produção de calor e longo período de vida útil (GUPTA; KUMAR; AGARWAL, 2019), além de proporcionarem economia de energia.

Diversos estudos sobre o efeito da qualidade de luz na micropropagação e na produção *in vitro* de substâncias bioativas, com a utilização de LED, foram realizados em várias espécies (Quadro 1). Em geral, o LED vermelho tem apresentado efeitos positivos no alongamento da parte aérea, no número de brotações e no acúmulo de biomassa dos calos, além do efeito positivo na produção de alguns metabólitos secundários (CHANG et al., 2003; ROCHA et al., 2010; ROCHA et al., 2012; SILVA et al., 2017). Em contrapartida, diversos estudos demonstraram o efeito do LED azul na capacidade fotossintética, no acúmulo do teor de açúcar (POUDEL, KATAOKA; MOCHIOKA, 2008; YANG et al., 2017; PASHKOVSKIY et al., 2018).

Na produção de metabólitos secundários, a qualidade de luz tem demonstrado sua eficiência na produção ou aumento de substâncias bioativas, tais como taninos, antocianinas e flavonoides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HUI et al., 2016; HASHIM et al., 2021). Em ensaios *in vitro*, a combinação dos LED azul, vermelho e branco aumentou o acúmulo de antocianinas em *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo (PARK et al., 2013), enquanto o LED azul aumentou os níveis de ácidos fenólicos em *Ruta graveolens* L. (SZOPA et al., 2012), flavonoides em *Stevia rebaudiana* Bert. (AHMAD; RAB; AHMAD, 2016), *Lactuca sativa* L. (ZHANG et al., 2018) e *Curculigo orchioides* Gaertn (GUPTA; KUMAR; AGARWAL, 2019). Além disso, aumentou a produção de compostos voláteis como o carvacrol em *Lippia gracilis* Schauer (LAZZARINI et al., 2018). No entanto, a mesma qualidade de luz também diminuiu o conteúdo de gluconapina e aumentou o conteúdo de glucorafina de culturas de *Brassica oleracea* L. (QIAN et al., 2016). O LED vermelho aumentou a produção de flavonoides e ácidos fenólicos em *Phalaenopsis* ‘Spring Dancer’ (KWON et al., 2018) e *Silybum marianum* L. (YOUNAS et al., 2018), embora tenha reduzido o teor de monoterpenos em plântulas de *Gynura bicolor* (Roxb. & Willd.) DC (REN et al., 2014).

Quadro 1 – Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas *in vitro* (continua).

Espécie	Tipo de LED	Resposta morfológica	Referência
<i>Musa paradisiaca</i> cv. 'Nam Dinh'	Vermelho + azul (80/20%)	Maior peso fresco das plântulas	NHUT et al., 2002
<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Vermelho + azul	Maior desenvolvimento das plântulas	NHUT et al., 2003
<i>Zantedeschia albomaculata</i> (Hook.) Baill.	Vermelho; azul	O alongamento dos brotos e maior o peso fresco e seco	CHANG et al., 2003.
<i>Vitis riparia</i> x <i>V. vinifera</i> cv. Cabernet e <i>Vitis ficifolia</i> var. ganebu	Vermelho; azul	Plantas maiores com entrenó mais longos e maiores taxas de enraizamento; maior número de estômatos	POUDEL, KATAOKA; MOCHIOKA, 2008
<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	Vermelho	Aumento no crescimento de plântulas e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos	ROCHA et al., 2010
<i>Rubus</i> sp.	Vermelho	Maior número de brotações	ROCHA et al., 2013
<i>Piper aduncum</i> L.	Vermelho	Maior crescimento de brotos	SILVA et al. 2014
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.)	Azul; Azul+vermelho (3:1)	Promoveram melhores índices morfoanatômicos e fisiológicos	LIU et al. 2014

Quadro 1 – Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas *in vitro* (continuação).

Espécie	Tipo de LED	Resposta morfológica	Referência
<i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai	Vermelho; azul	Maior crescimento dos brotos; maior produção de harpagoside	JEONG et al. 2015
<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	Vermelho; azul	Maior crescimento dos brotos, maior produção de substâncias bioativas e atividade das enzimas antioxidantes	MANIVANNAN et al. 2015
<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv	Vermelho + azul; vermelho	Maior desenvolvimento dos brotos; maior acúmulo de saponinas	NHUT et al. 2015
<i>Achillea millefolium</i> L.	Azul	Maior acúmulo de matéria seca, número de raízes	ALVARENGA et al. 2015
<i>Solanum lycopersicum</i> L. <i>Platanus orientalis</i> L.	Vermelho + verde + azul (1:1:1)	Diminuiu a altura das plantas, biomassa e área foliar; menor teor de produção de monoterpenos	ARENA et al., 2016
<i>Saccharum</i> spp.	Vermelho + azul (50:50%)	Melhor desenvolvimento das plantas	SILVA et al., 2016
<i>Peucedanum japonicum</i> Thunb.	Vermelho; Vermelho + azul (1:1)	Maior biomassa dos calos; maior número de embriões por calo	CHEN et al., 2016
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Vermelho + azul (50/50%)	Aumento de biomassa de brotos e raízes	HUNG et al., 2016

Quadro 1 – Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas *in vitro* (continuação).

Espécie	Tipo de LED	Resposta morfológica	Referência
<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown.	Vermelho + azul	Maior massa fresca e seca; maiores níveis de pigmentos fotossintéticos	BATISTA et al., 2016
<i>Anthurium andreanum</i> Lind	Azul + Vermelho; azul	Maior número de brotações; maior crescimento e conteúdo de clorofila	MARTÍNEZ-ESTRADA et al. 2016
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Vermelho	Maior alongamento dos brotos	EDESI, PARTILÄ; HÄGGMAN, 2017.
<i>Musa acuminata</i> Colla	Verde	Maior altura de brotos	ROCHA et al., 2017
<i>Dendrobium</i>	Amarelo	Maior proliferação de brotos	BILLORE, JAIN; SUPRASANNA, 2017.
<i>Saccharum</i> spp.	Vermelho+ azul (82/18%)	Maior multiplicação dos brotos	FERREIRA et al., 2017
<i>Bacopa monnieri</i> L.	Vermelho + azul (1:1)	Maior número de brotos por explante	KARATAS; AASIM; DAZKIRILI, 2017.
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Vermelho	Maior comprimento da parte aérea e maior acúmulo de carvacrol	SILVA et al., 2017
<i>Vanilla planifolia</i> G. Jackson	Vermelho + azul (1:1)	Brotos mais alongados e maior teor de clorofila	RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; LUNA-SÁNCHEZ, 2017.

Quadro 1 – Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas *in vitro* (continuação).

Espécie	Tipo de LED	Resposta morfológica	Referência
<i>Cymbidium devonianum</i> Paxt.	Verde	Aumento de massa fresca dos brotos	HAQUE, NAHAR; SHIMASAKI, 2017.
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Azul	Aumento do teor de açúcar	YANG et al., 2017
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	Branco; vermelho+ azul (4:10)	Melhor desenvolvimento das plântulas	ANDRADE et al., 2017
<i>Myrtus communis</i> Linn.	Vermelho	Maior taxa de multiplicação dos brotos	CIOĆ et al., 2018
<i>Diospyros kaki</i> L.	Vermelho	Maior número de nós	ASAKUMA; CHIJIWA; SHIRAISHI, 2018
<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat	Azul; vermelho	Maior biomassa e inibição do fotossistema II, respectivamente	ZHENG; LABEKE, 2018
<i>Ajuga multiflora</i> Bunge	Vermelho	Maior média de brotos por explante; menor conteúdo de luteína	JEONG; SIVANESAN, 2018
<i>Rhodiola imbricata</i> Edgew	Vermelho; azul	Maior biomassa dos calos; maior acúmulo de metabolitos secundários	KAPOOR et al., 2018
<i>Phalaenopsis</i> 'Spring Dancer'	Azul; vermelho; vermelho+ azul (60/60%)	Aumento do número de folhas, teor de flavonoides e ácidos fenólicos; aumento da catalase; aumento da peroxidase	KWON et al., 2018

Quadro 1 – Estudos sobre a investigação do efeito da qualidade de luz na morfogênese e produção de substâncias bioativas *in vitro* (continuação).

Espécie	Tipo de LED	Resposta morfológica	Referência
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	Vermelho	Maior número de folhas e de peso seco	LAZZARINI et al., 2018
<i>Eutrema salsugineum</i> (Pall.)	Azul	Maior atividade da catalase e APX	PASHKOVSKIY et al., 2018
<i>Gerbera jamesonii</i> cv. Dura	Vermelho+ azul (70:30%); vermelho	Maior multiplicação de brotos e aumento do teor de clorofila e carotenoides; Maior formação de raízes adventícias	PAWŁOWSKA et al., 2018
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Vermelho; azul	Melhor desenvolvimento das folhas; maior acúmulo de biomassa	CHEN et al., 2019
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham	Azul	Aumento no teor de mircenos e limoneno	DE HSIE et al., 2019
<i>Fritillaria cirrhosa</i> D. Don	Vermelho	Aumento na produção de embriões somáticos e no teor de peimisina, peimina e peiminina	CHEN et al., 2020
<i>Verbena officinalis</i> L.	Azul; Vermelho +azul (70:30%)	Aumento no teor de verbacosídeo, isoverbacosídeo e ácidos fenólicos	KUBICA et al., 2020
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Vermelho; vermelho+azul	Aumento da biomassa; Produção de ácido ascórbico	NGUYEN et al., 2020
<i>Perilla frutescens</i> var. crispa	Vermelho	Aumento no teor do ácido rosmarínico e cafeico	NGUYEN; OH, 2021

1.2.2 Estresse oxidativo na morfogênese *in vitro*

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a atuação dos sistemas antioxidantes e a geração de espécies reativas, que são moléculas ou átomos que apresentam alta reatividade e podem ser classificadas em espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) ou de enxofre (ERE) (DEMIDCHIK, 2015).

As ERO podem ser constituídas por radicais livres, como óxido nítrico (NO), superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e hidroperoxila (OOH^{\cdot}), os quais possuem pelo menos um elétron não pareado em sua última camada eletrônica, permitindo a captação de elétrons de moléculas vizinhas (TOKARZ et al., 2018), ou por compostos não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2), que não possuem elétrons desemparelhados, mas ainda assim podem reagir com moléculas adjacentes (CARVALHO; NETO, 2016).

A formação de radicais livres é um processo fisiológico normal e resulta de processos metabólicos, como a respiração e a fotossíntese desempenhando funções biológicas relevantes, tais como a sinalização de células defeituosas e micro-organismos invasores (COTINGUIBA et al., 2013). Entretanto, o excesso de produção dos radicais livres pode levar à peroxidação dos lipídeos, à oxidação de proteínas e até à morte celular (SHARMA et al., 2012; KIM et al., 2017).

A formação das ERO é iniciada pela redução monovalente do oxigênio molecular originando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em diferentes compartimentos celulares, principalmente nos cloroplastos (fotossistemas I e II) e nas mitocôndrias (complexos I e III). O $O_2^{\cdot-}$ é pouco reativo, tem meia vida curta e dificilmente consegue atravessar as membranas, mas é a partir dele que são geradas ERO mais reativas e mais citotóxicas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DEMIDCHIK, 2015). O H_2O_2 é formado pela dismutação do radical superóxido por ação de enzimas ou pela β -oxidação de ácidos graxos. Apesar de não apresentar alta reatividade, pode transpor membranas celulares e gerar o radical hidroxila (OH^{\cdot}) a partir de reações com metais de transição (íons de Cu^{+3} e Fe^{+3}). Os radicais hidroxila são os mais reativos e podem causar danos às moléculas de DNA, RNA, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (BARREIROS et al., 2006; SHARMA et al., 2012; CARVALHO; NETO, 2016; KIM et al., 2017).

Os sistemas antioxidantes são responsáveis por limitar os níveis intracelulares das espécies reativas. Estes sistemas podem ser não-enzimáticos, incluindo substâncias como o ácido ascórbico, flavonoides, carotenoides e tocoferol, ou enzimáticos, que incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) (YU et al., 2017).

A SOD é a enzima responsável pela dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Considerada primeira linha de defesa contra as ERO, esta enzima está distribuída em vários compartimentos celulares como os cloroplastos, citosol, mitocôndrias e peroxissomos (KIM et al., 2017). São conhecidas três formas distintas de SOD, de acordo com o metal ligado em seu grupo prostético, Cu/ZnSOD (cobre e zinco), FeSOD (ferro) e MnSOD (manganês) (RACCHI, 2013).

A CAT é uma hemeproteína que decompõe duas moléculas de peróxido de hidrogênio, geradas durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos, em água e oxigênio (DUBEY, 2011). Em plantas, pode ser encontrada principalmente nos peroxissomos, onde há intensa produção de H_2O_2 (FERNANDES et al., 2013). Embora possua baixa afinidade, apresenta alta especificidade pelo substrato, atuando principalmente em condições de estresse severo, nas quais as concentrações de H_2O_2 encontram-se elevadas (BARBOSA et al., 2014).

A APX atua nos peroxissomos, mitocôndrias e, principalmente, nos cloroplastos. Também tem a função de degradar o H_2O_2 em água e utiliza o ascorbato como cofator, gerando o monodeidroascorbato (MDHA). A obtenção do ascorbato pode ocorrer por duas vias, a redução do MDHA pela ação da monodeidroascorbato redutase (MDAR) ou a redução do dehidroascorbato (DHA) no ciclo ascorbato-glutationa (KIM et al., 2017). A CAT e a APX são extremamente importantes na degradação do H_2O_2 . Contudo, por apresentar afinidade mais alta pelo substrato, a APX pode remover o peróxido de hidrogênio em concentrações mais baixas (BARBOSA et al., 2014).

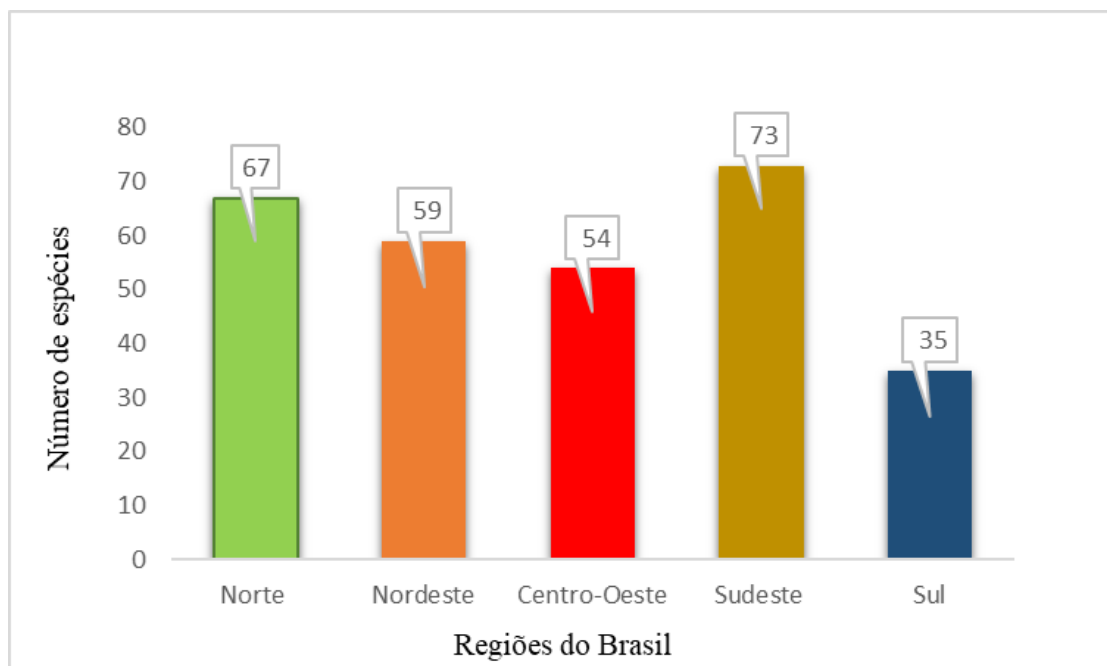
Alterações nos sistemas *in vitro*, em especial nas condições de iluminação, podem induzir ao acúmulo de ERO, que ao exceder a capacidade antioxidante das células, levam ao estresse oxidativo. Diversos trabalhos têm investigado esses aspectos em materiais obtidos *in vitro*. Por exemplo, as atividades da SOD e da CAT em culturas de *Camptotheca acuminata* Decne. foram aumentadas na presença de LED azul em comparação com culturas mantidas sob luz fluorescente branca (YU et al., 2017). O mesmo comportamento foi observado em relação à atividade da APX em culturas de *Eutrema salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & Warwick (PASHKOVSKIY et al., 2018). Manivannan e colaboradores (2015) também demonstraram um aumento nas atividades de APX, SOD e CAT em culturas de *Rehmannia glutinosa* Libosch. mantidas sob LED azul e vermelho em comparação à luz fluorescente branca. Um aumento na atividade da peroxidase (POD) foi observado em culturas de *Silybum marianum* L. Gaerth. incubadas sob LED verde (YOUNAS et al., 2018), assim como de *Phalaenopsis* ‘Spring Dancer’ mantidas sob LED misto (associação de vermelho com azul) (KWON et al., 2018).

Os sistemas *in vitro* têm sido utilizados para diversas espécies com o objetivo de estudar a produção de substâncias de interesse biotecnológico. Entre elas encontram-se as espécies do gênero *Passiflora*, conhecidas como maracujás, cujo o interesse medicinal é bem documentado.

1.3 Gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* compreende cerca de 560 espécies e é considerado o mais economicamente importante da família Passifloraceae (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). As espécies de *Passiflora*, conhecidas como maracujás, estão agrupadas em cinco subgêneros, de acordo com os caracteres morfológicos de suas estruturas florais: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb., *Passiflora* L. e *Tetrapathea* (FREITAS, 2011; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Estima-se que, aproximadamente, 150 espécies de *Passiflora* tenham seu centro de origem no Brasil (BRAGA et al., 2017), considerado um importante centro de diversidade. As espécies do gênero são encontradas principalmente nas regiões Norte e Sudeste do país (FLORA DO BRASIL, 2020) (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição de espécies do gênero *Passiflora* nas regiões do Brasil.



Fonte: Adaptado de Flora do Brasil 2020.

Os representantes do gênero são, em grande parte, plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas, de crescimento rápido e contínuo, podendo atingir 5 a 10 metros de comprimento (LIMA et al., 2006). A expansão dos ramos ocorre por meio de gavinhas solitárias e axilares, robustas ou tênues, que emergem de caules cilíndricos, angulares, subangulares ou quadrangulares, em geral estriados longitudinais. As espécies podem apresentar hábitos arbustivos ou arbóreos de pequeno porte. As folhas podem ser de diversos formatos e tamanhos, porém seguindo o padrão do gênero, que apresenta folhas alternas espiraladas, simples ou raramente compostas, frequentemente lobadas, com bordo liso, dentado ou serrado. As flores possuem coloração diversificada, contendo cinco sépalas, cinco pétalas, tubo andrógino formado por estames com cinco anteras e gineceu normalmente com três estigmas (CUNHA et al., 2004; SOUZA; LORENZI, 2008; MODIN et al., 2011).

Os maracujás possuem um grande interesse ornamental, principalmente devido à beleza e exuberância de suas flores, com grande variação de cores e tamanhos (Figura 3). São conhecidas como flor-da-paixão, por possuir elementos que remetem ao calvário de Jesus Cristo. Os três estigmas remetem aos três cravos que prenderam Cristo na cruz, as cinco anteras simbolizam as chagas e o formato da flor como a coroa de espinhos (BERNACCI et al., 2005; CARVALHO et al., 2017).

Além da importância ornamental, os maracujás também são muito utilizados para fins alimentícios e medicinais. São conhecidas em torno de 60 espécies que podem ser utilizadas como alimento, podendo seus frutos serem consumidos *in natura*, na forma de doces, licores, farinhas de casca e semente, chás e sucos (COELHO et al., 2016). Entretanto, somente *Passiflora edulis* Sims (maracujá roxo), sua variedade amarela (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) são amplamente comercializados (LIMA et al., 2006; MAMEDE et al., 2017).

A comercialização do maracujá no Brasil foi iniciada na década de 1970 e o país tem sido o maior produtor mundial de maracujá, seguido do Equador, Peru e África do Sul (PIRES et al., 2011; BORGES; TONON; SILVA, 2019). No ano de 2019, foram produzidas aproximadamente 593.429 toneladas de maracujá, sendo a maior produção encontrada no Nordeste (IBGE, 2019) (Figura 4).

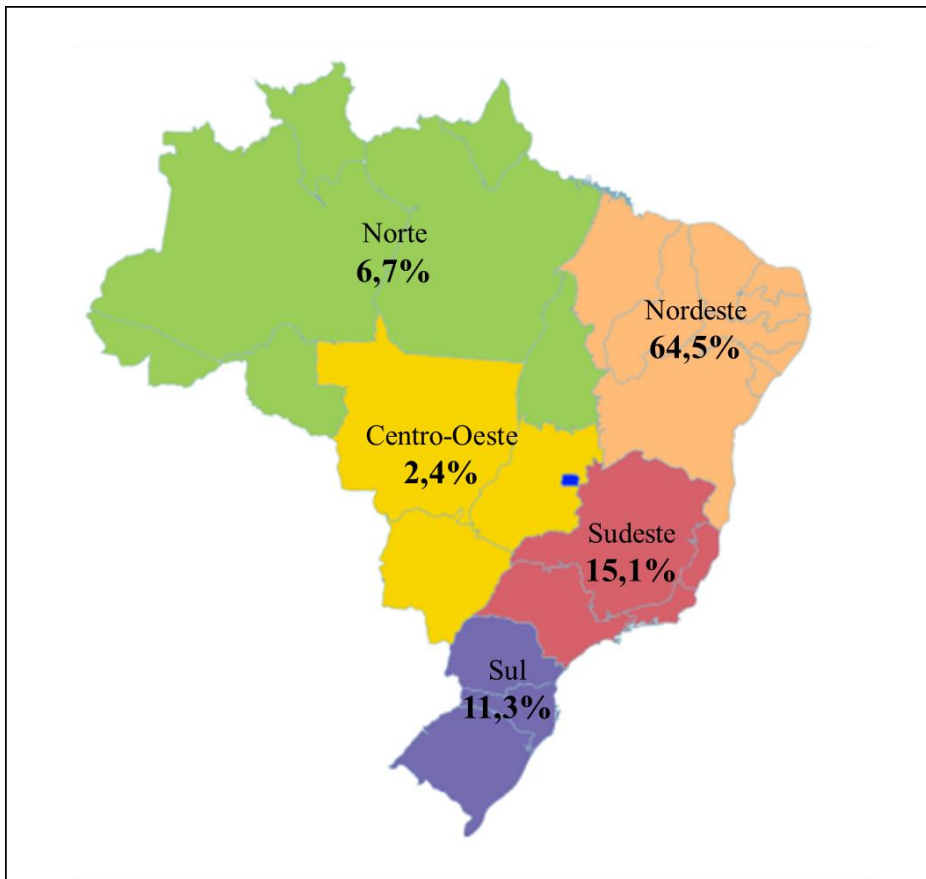
Figura 3 – Diversidade das flores de espécies do gênero *Passiflora*.



Legenda: A- *Passiflora longifilamentosa* A.K.Koch, A.Cardoso & Ilk.-Borg.; B- *Passiflora mansoi* (Mart.) Mast.; C- *Passiflora misera* Kunth.; D- *Passiflora nítida* Kunth.; E- *Passiflora pedata* L.; F- *Passiflora picturata* Ker Gawl.; G- *Passiflora quadriglandulosa* Rodschied; H- *Passiflora spinosa* (Poepp. & Endl.) Mast.; I- *Passiflora tholozanii* Sacco; J- *Passiflora vesicaria* L.; K- *Passiflora cincinnata* Mast.; L- *Passiflora foetida* L. var. *foetida*

Fonte: Adaptado de Koch et al. (2021) e Souza et al. (2021).

Figura 4 – Produção brasileira de maracujá por região em 2019.



Fonte: Adaptado de IBGE, 2019.

O maracujá-amarelo ou azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) corresponde a 95% da área plantada de maracujá no Brasil, chegando a uma produção entre 12 a 15 toneladas por hectare (COELHO et al., 2016). É a espécie com maior interesse comercial devido ao seu vigor, qualidade dos frutos e alta produtividade (ZERAİK et al., 2010; CORRÊA et al., 2016). O maracujá-roxo (*P. edulis*) é uma espécie adaptada a locais com maior altitude e clima frio. Produz frutos menores e com menor acidez, sendo geralmente consumidos *in natura* e usados na indústria alimentar (sucos, doces, licores etc.). Sua produção pode atingir cerca de 30 toneladas por hectare (MELETTI; SOARES-SCOTT; BERNACCI, 2005), embora no Brasil a produtividade chegue apenas a 5 toneladas por hectare (SOUZA et al., 2016). O maracujá-doce (*P. alata*) possui frutos em formato oval, com peso que varia entre 80 a 130g, com aroma agradável, sabor doce e baixa acidez (MEDEIROS et al., 2009).

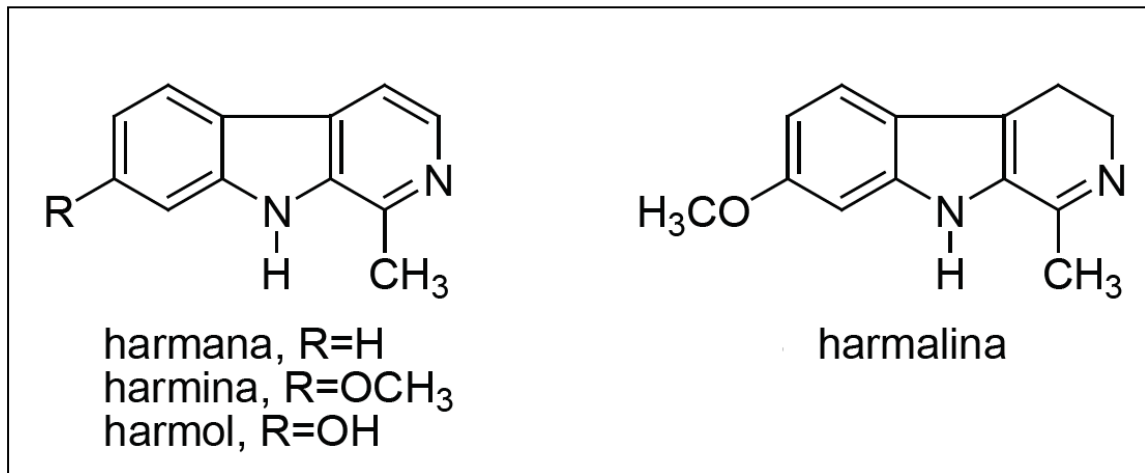
Espécies de maracujá também têm sido utilizadas para fins terapêuticos desde o século XVII, sendo plantadas em pomares e quintais antes de grandes culturas serem estabelecidas (MELETTI, 2011). Na medicina tradicional, preparações como chás e infusões de diferentes partes das plantas (folhas, raízes e frutos) são utilizadas como sedativos e anticonvulsivantes (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA et al., 2004).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar diferentes atividades biológicas das espécies de maracujá, incluindo ansiolítica (DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002; ASLANARGUN et al., 2012), analgésica (SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; ASADUJJAMAN et al., 2014), antibacteriana (BANDARA, PADUMADASA; PEIRIS, 2018; SIMÃO et al., 2018), antidepressiva (WANG et al., 2013), anti-inflamatória (MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013; SASIKALA, SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011), antioxidante (MÜLLER et al., 2005; ARUNG et al., 2009; LUGATO et al., 2014; SIMÃO et al., 2016), antifúngica (QURESHI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2012), antiviral (MÜLLER et al., 2007), diurética (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004), anticonvulsivante (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007), anti-hiperglicêmica (BARBALHO et al., 2011; GUPTA et al., 2012; SUDASINGHE; PEIRIS, 2018), anti-hipertensiva (PATEL et al., 2011), antitumoral (PURICELLI et al., 2003), imunoestimulante (SILVEIRA et al., 2011) e neuroprotetora (WATTANATHORN et al., 2012).

Estas atividades estão associadas à presença de diferentes constituintes, como ésteres, aldeídos, cetonas e álcoois, desde a casca até a semente (ZERAİK et al., 2010), além de ácidos fenólicos, cumarinas, fitoesteróis, heterosídeos cianogênicos e alcaloides (LEAL et al., 2016). Entretanto, as principais classes de substâncias bioativas encontradas no gênero são os alcaloides, flavonoides e saponinas (BARBALHO et al., 2011; WANG et al., 2013; GAZOLA et al., 2015).

Os alcaloides descritos no gênero incluem os do tipo harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol (Figura 5). Essas substâncias podem atuar como tranquilizantes e na inibição da enzima monoamina oxidase (MAO) (KUKULA-KOCH; WIDELSKI, 2017) e têm sido encontradas em diferentes espécies do gênero, como *P. incarnata*, *P. caerulea*, *P. edulis* e *P. alata* (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; FRYE; HAUSTEIN, 2007; PEREIRA; RODRIGUES; YARIWAKE, 2014; LOPES; TIYO; ARANTES, 2017; FREIRE; SILVA; YARIWAKE, 2017).

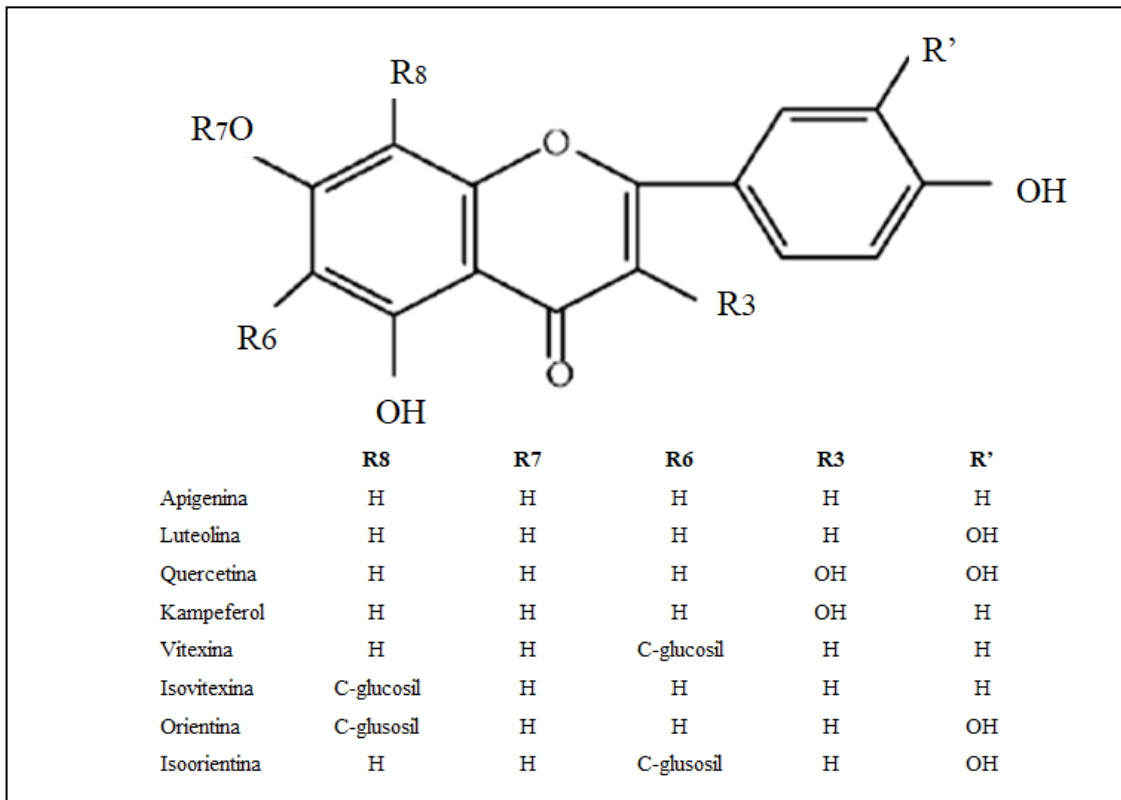
Figura 5 - Estrutura básica dos principais alcaloides encontrados no gênero *Passiflora*.



Fonte: Zeraik et al. (2010).

Os flavonoides encontrados em *Passiflora* são principalmente do tipo C-glicosídeo, sendo os principais vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosideo (Figura 6) (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Os flavonoides C-glicosilados possuem açúcares diretamente ligados ao núcleo aromático da molécula através de uma ligação carbono-carbono resistente a hidrólise (ZERAİK et al., 2010; LOPES; TIYO; ARANTES, 2017). Já foram identificados flavonoides em diferentes partes da planta, como em folhas de *P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. caerulea* (PEREIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2005; CHABARIBERI et al., 2009; NORIEGA et al., 2012; ZUCOLOTTI et al., 2012), na polpa de *P. edulis* (ZERAİK et al., 2012) e em parte aérea de *P. incarnata* (PEREIRA; VILEGAS, 2000).

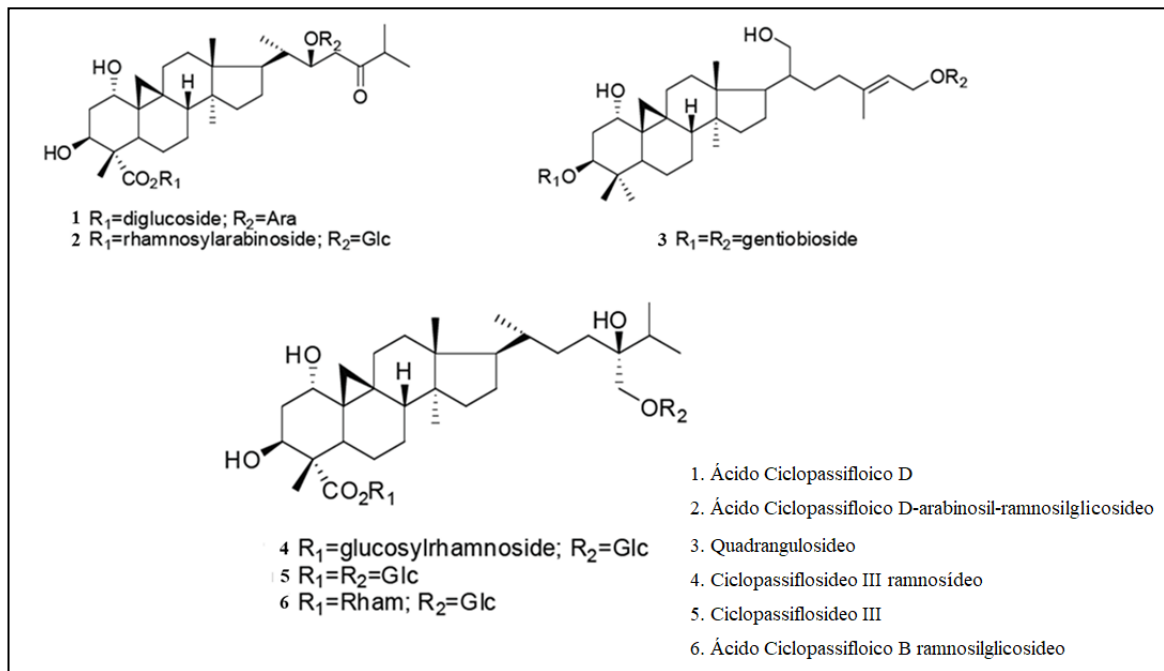
Figura 6 - Estrutura dos principais flavonoides encontrados no gênero *Passiflora*.



Fonte: Adaptado de Dhawan; Dhawan; Sharma, 2004.

As saponinas são outro grupo de substâncias encontradas nos maracujás (Figura 7). Já foram identificadas saponinas triterpênicas do tipo cicloartano em *P. quadrangularis* (ORSINI et al., 1987, 1986; SAKALEM et al., 2012) e em *P. edulis* (WANG et al., 2013), assim como saponinas esteroidais em folhas e caules de *P. edulis* e *P. alata* (YOSHIKAWA et al., 2000a, 2000b; REGINATTO et al., 2001 e 2004). Também foram encontradas saponinas em folhas e raízes de *P. pohlii* (SIMÃO et al., 2016).

Figura 7 – Estrutura de algumas saponinas encontradas no gênero *Passiflora*.



Fonte: Adaptado de Sakalem et al. (2012).

A detecção, isolamento, identificação e quantificação dessas substâncias bioativas em diferentes espécies do gênero *Passiflora* têm sido realizadas por técnicas cromatográficas, incluindo a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (DE PARIS et al., 2002; REGINATTO et al., 2006; ZERAIK et al. 2010; OZAROWSKI; THIEM, 2013; SIMÃO et al., 2016, 2018; PONZILACQUA et al., 2019).

A CCD é uma técnica de análise rápida que possibilita o estudo de um grande número de amostras ao mesmo tempo, além de ser de baixo custo e fácil execução (BIRK et al., 2005). Na CLAE, a separação das substâncias ocorre de modo mais específico que na técnica de CCD. Este método é utilizado para análise qualitativa e quantitativa, além de permitir a utilização de diferentes detectores (UV, fluorescência e de índice de refração) associados ao sistema de análise (TONHI et al., 2002; ZERAIK, 2010). Embora seja uma das técnicas mais utilizadas, outros métodos são necessários para a identificação e elucidação estrutural das substâncias, tais como a espectrometria de massas acoplada à CLAE (CLAE-EM) ou a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017).

O efeito da qualidade de luz na morfogênese *in vitro*, na produção de metabólitos secundários e no estresse oxidativo será avaliado, neste trabalho, em culturas de uma cultivar do gênero *Passiflora*.

1.3.1 *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

Passiflora setacea DC., popularmente conhecida como maracujá-sururuca e maracujá-do-sono, é uma espécie silvestre nativa dos Cerrados Brasileiros. Seus frutos doces e de aroma agradável são muito apreciados nas regiões interioranas do Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). Possui também, grande valor nutricional e potencial farmacêutico pelo alto teor de compostos fenólicos na polpa (SOZO et al., 2016). Além disso, segundo o uso popular, a polpa ajuda a prevenir a insônia, evidenciando sua propriedade medicinal (COSTA et al., 2015). Apresenta tolerância a algumas doenças e pragas, como por exemplo, fusariose e antracnose, o que a torna uma fonte de resistência genética a fitopatógenos que atacam a cultura do maracujá (JUNQUEIRA, 2005; BRAGA et al., 2006).

Com o objetivo de aumentar a produtividade e tamanho do fruto de *P. setacea*, o programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados desenvolveu a cultivar *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado (JUNQUEIRA, 2005). Resultante de um processo de seleção massal esta cultivar foi obtida por policruzamento através de uma população de acessos silvestres da espécie *P. setacea* (EMBRAPA, 2015). E foi a primeira cultivar de maracujazeiro silvestre registrada (RNC N° 21714) e protegida (SNPC Certificado N° 20120197) no Ministério da Agricultura (EMBRAPA, 2013).

A cultivar *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado é uma alternativa para o mercado de maracujás destinado para indústria alimentícia, como a produção de sucos, sorvetes, doces e consumo *in natura*. Também apresenta grande potencial ornamental para paisagismo de grandes áreas pela beleza de suas flores brancas e sua ramificação densa. As suas flores possuem aproximadamente 7,9 cm de diâmetro, compostas por cinco pétalas e cinco sépalas, de cor branca em ambos os lados, com a veia central de cor esverdeada (Figura 8 A) (RANGEL JUNIOR et al., 2018). Os seus frutos são verdes-amarelados, com listras verdes, e possui 5-6 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura, pesando em torno de 50 a 120g (Figura

8 B). Essa cultivar é muito produtiva e, em sistemas bem manejados, o florescimento ocorre dois meses após o plantio (GUIMARÃES et al., 2013).

Outra vantagem desta cultivar é a qualidade físico-química e funcional da polpa, que possui coloração amarela-perolada, sabor adocicado e baixa acidez. É rica em sais minerais, como magnésio, ferro, fosforo e zinco e substâncias antioxidantes, que atuam na prevenção de doenças degenerativas, no fortalecimento do sistema imunológico e na regeneração celular. Entre as substâncias antioxidantes, destacam-se as substâncias fenólicas e as aminas bioativas. A casca é rica em fibras solúveis e as sementes apresentam óleo rico em ômega 6, importante na formação de membranas celulares e no equilíbrio do colesterol (EMBRAPA, 2013). Essas características tornam essa cultivar uma alternativa ao cultivo do maracujá-azedo.

Figura 8 – Aspectos morfológicos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Legenda: A) Flor; B) fruto.
Fonte: Embrapa Cerrados

Apesar de alguns trabalhos terem abordado seu potencial agrônomo e ornamental (RINALDI et al., 2017; RANGEL JUNIOR et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2018; KOHL; DUARTE, 2019), e poucos estudos sobre o desenvolvimento de sistemas *in vitro* e a avaliação biológica e fitoquímica dessa cultivar (PERDOMO, 2016; SOZO, 2014; TERHAAG, 2020).

1.3.2 Cultura de tecidos e produção *in vitro* de metabólitos secundários em *Passiflora*

Diversos sistemas *in vitro* têm sido estabelecidos para espécies do gênero *Passiflora* (Quadro 2). Estudos de regeneração *in vitro* foram descritos primeiramente por Nakamaya (1966) para *P. caerulea* L.. Posteriormente, outros protocolos com diferentes tipos de explantes foram desenvolvidos para diversas espécies do gênero (PACHECO et al., 2016).

A organogênese é a principal via estudada no gênero *Passiflora*, já tendo sido obtida direta ou indiretamente, a partir de diferentes explantes, incluindo segmentos nodais e internodais (KANTHARAJAH; DODD, 1990; FARIA; SEGURA, 1997; MONTEIRO et al., 2000; BIASI et al., 2000; GARCIA et al., 2011; SEVERIN et al., 2011; PACHECO et al., 2012; ANAND et al., 2012), ápices caulinares (SCORZA; JANICK, 1980; DREW, 1991; JUNGHANS et al., 2002; ISUTSA, 2004; RAGAVENDRAN et al., 2012), protoplastos (OTONI et al., 1995; RICARDO; MARGARITA, 2004), brotos (KAWATA et al., 1995); folhas (AMUGUNE et al., 1993; DORNELAS; VIEIRA, 1994; BECERRA et al., 2004; BUSILACCHI et al., 2008; GARCIA et al., 2011; PACHECO et al., 2012), hipocótilos (DIAS et al., 2009; RÉGO et al., 2011; SOARES et al., 2012), raízes (ROSA et al., 2016) e embriões zigóticos (GUZZO et al., 2004; GERRA et al., 2009; PAIM PINTO et al., 2011; ROSA; DORNELAS, 2012; ROSA et al., 2014; ROCHA et al., 2015; CARVALHO et al., 2017).

A embriogênese somática foi relatada em poucas espécies do gênero e ainda é relativamente pouco estudada. Além disso, geralmente é induzida a partir de embriões zigóticos (PACHECO et al., 2016). Inicialmente, a embriogênese foi descrita em culturas de células em suspensão obtidas a partir de folhas de *P. gibertii* N. E. Br. (ANTHONY et al., 1999). Posteriormente, foi observada a embriogênese em *P. cincinnata* Mast. (REIS et al., 2007; SILVA et al., 2009; PAIM PINTO et al., 2010; ROCHA et al., 2012; SILVA; CARVALHO, 2014; SILVA et al., 2015; VIEIRA et al., 2018) e recentemente, um estudo com essa espécie visou o desenvolvimento de um sistema eficiente de produção de embriões somáticos induzidos a partir de anteras (SILVA et al., 2021). Também foi observada essa via em *P. edulis* (PAIM PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2015; ROCHA; MONTE-BELLO; DORNELAS, 2015; ROCHA et al., 2016), *P. miniata* Vanderpl. (FERREIRA et al., 2015; LEITE et al., 2019), *P. speciosa* Gardn. (FERREIRA et al., 2015), *P. ligularis* (PRUDENTE et al., 2017), *P. morifolia* Mast. (ALBINO, 2013), *P. molissima* (PARRA-PEÑALOSA; CANCINO-ESCALANTE, 2019), *P. alata*, *P. gibertii* e *P. crenata* Feuillet & Cremers (ROSA et al., 2015).

Quadro 2 – Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* (continua).

Espécie	Explante	Sistema de regeneração	Referências
<i>P. caerulea</i>	Gemas axilares e raízes	Organogênese	NAKAYAMA, 1966
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. caerulea</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. coccinea</i> , <i>P. herbertiana</i> , <i>P. suberosa</i>	Segmento nodal, ápice caulinar e folha	Organogênese	DREW, 1991
<i>P. edulis f. flavicarpa</i> , <i>P. mollissima</i> , <i>P. giberti</i> , <i>P. maliformis</i>	Folha, cotilédone, hipocótilo e raiz	Organogênese	DORNELAS; VIEIRA, 1994
<i>P. edulis</i>	Brotos	Organogênese	KAWATTA et al., 1995
<i>P. coccínea</i>	Protoplasto	Organogênese	OTONI et al., 1995
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Ápice caulinar	Organogênese	FARIA; SEGURA, 1997
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Folha	Organogênese	APPEZATO-DA-GLORIA et al., 1999
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Entrenó	Organogênese	BIASI et al., 2000
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Segmento nodal	Organogênese	MONTEIRO et al., 2000
<i>P. edulis</i>	Ápices	Rizogênese	MAROTA et al., 2001
<i>P. edulis</i>	Ápices	Meristemas pré-existent	REIS et al., 2003

Quadro 2 – Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* (continuação).

Espécie	Explante	Sistema de regeneração	Referências
<i>P. morifolia</i> , <i>P. palmeri</i> , <i>P. nitida</i> , <i>P. coccinea</i>	Embriões zigóticos e endosperma	Organogênese	GUZZO et al., 2004
<i>P. edulis</i>	Hipocótilo	Organogênese	REIS et al., 2005
<i>P. cincinnata</i>	Discos foliares e raiz	Organogênese	LOMBARDI et al., 2007
<i>P. edulis</i> ; <i>P. cincinnata</i>	Raiz	Organogênese e Embriogênese	REIS et al., 2007
<i>P. coerulea</i> , <i>P. costaricensis</i> , <i>P. foetida</i>	Segmento nodal Botão floral Gavinhas	Organogênese	PIPINO et al., 2008
<i>P. cincinnata</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	SILVA et al., 2009
<i>P. cincinnata</i> , <i>P. edulis</i>	Hipocótilo	Organogênese	DIAS et al., 2009
<i>P. alata</i>	Folha e Hipocótilo	Organogênese	PAIM PINTO et al., 2010
<i>P. cincinnata</i>	Hipocótilo	Organogênese	DIAS et al., 2010
<i>P. cincinnata</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	PAIM PINTO et al., 2010
<i>P. edulis</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	PAIM PINTO et al., 2011

Quadro 2 – Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* (continuação).

Espécie	Explante	Sistema de regeneração	Referências
<i>P. suberosa</i>	Segmentos caulinares e folha	Organogênese	GARCIA et al., 2011
<i>P. cincinnata</i> , <i>P. edulis</i>	Raiz	Organogênese	SILVA et al, 2011
<i>P. caerulea</i>	Segmentos nodal e internodal	Organogênese	SEVERIN et al., 2011
<i>P. alata</i>	Segmentos caulinares e folha	Organogênese	PACHECO et al., 2012
<i>P. foetida</i>	Segmento nodal	Organogênese	RAGAVENDRAN et al., 2012
<i>P. foetida</i>	Embriões zigóticos	Organogênese	ROSA; DORNELAS, 2012
<i>P. foetida</i>	Folhas	Embriogênese	PATIL; PAIKRAO, 2012
<i>P. edulis</i>	Raiz	Organogênese	ROCHA et al., 2012a
<i>P. cincinnata</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	ROCHA et al., 2012b
<i>P. caerulea</i> <i>P. incarnata</i>	Ápices e segmento nodal	Organogênese	OZAROWSKI et al., 2013
<i>P. gibertii</i>	Folhas	Calogênese e organogênese	CARVALHO et al., 2014
<i>P. gibertii</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. crenata</i> , <i>P. edulis</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	ROSA, MONTE-BELLO; DORNELAS, 2014

Quadro 2 – Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* (continuação).

Espécie	Explante	Sistema de regeneração	Referências
<i>P. pohlii</i>	Segmentos caulinares	Organogênese	MERHY et al., 2014
<i>P. setacea</i>	Folha, hipocótilo e raiz	Organogênese	VIEIRA et al., 2014
<i>P. miniata</i> , <i>P. speciosa</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	FERREIRA et al., 2015
<i>P. gibertii</i>	Folhas cotiledonares	Calogênese	CARVALHO et al., 2015
<i>P. edulis</i>	Embriões zigóticos	Organogênese e Embriogênese	ROCHA, MONTE-BELLO; DORNELAS, 2015
<i>P. edulis</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	DIAS et al., 2015
<i>P. cincinnata</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	SILVA et al., 2015
<i>P. pohlii</i>	Segmentos caulinares	Rizogênese	SIMÃO et al., 2016
<i>P. edulis</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	ROCHA et al., 2016b
<i>P. edulis</i>	Hipocótilo e raiz	Organogênese	ROCHA et al., 2016a
<i>P. suberosa</i>	Raiz	Organogênese	ROSA, BELLO; DORNELAS, 2016
<i>P. miniata</i>	Embriões zigóticos	Organogênese	CARVALHO et al., 2017
<i>P. ligularis</i>	Embriões zigóticos	Embriogênese	PRUDENTE et al., 2017
<i>P. edulis</i>	Endosperma	Organogênese	ANTONIAZZI et al., 2018
<i>P. cristalina</i>	Folha, hipocótilo, raiz e cotilédone	Organogênese	DE FARIA et al., 2018
<i>P. cincinnata</i>	Embriões Zigóticos	Embriogênese	VIEIRA et al., 2018
<i>P. miniata</i>	Raiz	Organogênese	CARVALHO et al., 2019

Quadro 2 – Cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Passiflora* (continuação).

Espécie	Explante	Sistema de regeneração	Referências
<i>P. mollissima</i>	Cotilédone	Embriogênese	PARRA-PEÑALOSA; CANCINO- ESCALANTE, 2019
<i>P. foetida</i> , <i>P. miniata</i>	Embriões zigóticos	Organogênese, Embriogênese	LEITE et al., 2019
<i>P. cincinnata</i>	Endosperma	Organogênese	SILVA et al., 2020
<i>P. edulis</i>	Disco foliar e segmento nodal	Organogênese	ASANDE et al., 2020
<i>P. edulis</i>	Segmento nodal	Organogênese	KHAS et al., 2020
<i>P. foetida</i>	Endosperma	Organogênese	MIKOVSKI et al., 2021
<i>Passiflora xishuangbannaensis</i>	Segmentos internodais e pecíolo	Organogênese	MENG; SONG, LANDREIN, 2021
<i>P. edulis</i>	Segmentos internodais	Organogênese	BURBULIS et al., 2021
<i>P. gibertii</i>	Antera	Embriogênese	SOARES et al., 2021
<i>P. cincinnata</i>	Antera	Embriogênese	SILVA et al., 2021

Na última década, vários estudos biotecnológicos foram publicados com espécies de *Passiflora* relatando a produção *in vitro* de substâncias bioativas e a avaliação de propriedades farmacológicas (FALEIRO et al., 2019). Substâncias fenólicas foram detectadas em calos friáveis de *Passiflora quadrangularis* (ANTOIGNONI et al., 2007), *P. alata* (LUGATO et al., 2014), enquanto flavonoides foram detectados em calos de *P. caerulea* e *P. incarnata* (BUSILACCHI et al., 2008; OZAROWSKI; THIEM, 2013). Substâncias aromáticas foram produzidas em culturas de células eliciadas por leveduras em *P. garckeii* (FRACCAROLI et al., 2008). Mais recentemente, Simão e colaboradores (2016) relataram alto potencial antioxidante em culturas de raízes adventícias de *P. pohlii*, produtoras de diferentes

saponinas. Além disso, extratos de folhas e raízes de plantas cultivadas *in vitro* de *P. alata* e *P. foetida* apresentaram atividade antibacteriana, que foi associada à presença de flavonoides e saponinas (SIMÃO et al., 2018). Sozo e colaboradores (2016) observaram altos teores de substâncias fenólicas em extratos de calos de *P. tenuifila*, associadas à elevada atividade antioxidante, ao contrário do observado em *P. setacea*, onde culturas de calos apresentaram alta atividade antioxidante, apesar do baixo conteúdo fenólico.

O Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ) realiza pesquisas visando à micropropagação, à conservação *in vitro* e à produção de substâncias bioativas em espécies do gênero *Passiflora* há mais de uma década. Esses trabalhos resultaram no estabelecimento de protocolos visando à regeneração de plantas e indução de calos (GARCIA et al., 2011a), e à criopreservação de *P. suberosa* (GARCIA et al., 2011b; VIANNA et al., 2019) e *P. foetida* (FALCÃO, 2011). Para *P. alata*, foram estabelecidas culturas de plantas, calos e células em suspensão (PACHECO et al., 2012) e realizada a avaliação da atividade antioxidante de extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e de materiais obtidos *in vitro* (LUGATO et al., 2014; SILVA, 2021). Além disso, foram estabelecidos diferentes protocolos para a produção de plantas (MERHY, 2014), proliferação de raízes adventícias (SIMÃO et al., 2016) e criopreservação de *P. pohlii* (MERHY et al., 2014; SIMÃO et al., 2018a), além da avaliação do seu potencial antioxidante (SIMÃO et al., 2016). Foi também realizado um estudo comparativo do potencial antibacteriano de folhas e raízes de *P. suberosa*, *P. foetida*, *P. pohlii* e *P. alata* (SIMÃO et al., 2018b).

Considerando os trabalhos já desenvolvidos no NBV/UERJ com espécies de *Passiflora* que evidenciam seu potencial farmacológico, neste trabalho foram desenvolvidos estudos com o objetivo de estabelecer culturas de calos, realizar análises fitoquímicas para a identificação de substâncias bioativas e avaliar o potencial antioxidante de extratos de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos gerais o estabelecimento de sistemas de culturas de calos, a caracterização do perfil fitoquímico e a avaliação do potencial antioxidante de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito de diferentes comprimentos de onda na indução de calos a partir de segmentos caulinares e foliares de plantas obtidas *in vitro* cultivados em meios de cultura suplementados com picloram (PIC);
- ✓ Caracterizar o perfil cromatográfico de extratos de calos obtidos sob diferentes condições de iluminação, assim como de folhas de plantas mantidas *in vitro* ou em condições naturais com a utilização de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Identificar, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-UV-IES-EM), as substâncias majoritárias detectados nos diferentes extratos;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos, por meio dos ensaios de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e da capacidade quelante do íon ferroso;
- ✓ Avaliar o estresse oxidativo de folhas *in vivo* e de materiais obtidos *in vitro* por meio da determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germinação *in vitro*

Sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado foram cedidas pelo Dr. Fábio Faleiro (Embrapa Cerrados) ou adquiridas comercialmente. As sementes foram lavadas com detergente sob água corrente e descontaminadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,0% por 20 minutos, sob agitação. Após três lavagens com água deionizada estéril, as sementes foram escarificadas mecanicamente com auxílio de bisturi e distribuídas entre duas camadas de três folhas de papel de filtro umedecidas com solução de GA₃ a 2,5% por cinco dias (GARCIA et al., 2011) em câmara de fluxo laminar. Decorrido esse tempo, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais e vitaminas (MS ½), sendo mantidas em câmara de crescimento a 25°C ± 2°C.

As plântulas derivadas da germinação *in vitro* foram utilizadas para o estabelecimento de culturas primárias, 15 dias após a sementeira. Ápices caulinares foram inoculados em meio MSM (MONTEIRO et al., 2000), contendo a metade da concentração de sais, sacarose e vitaminas do meio MS (MSM ½) por 60 dias. As plantas obtidas foram utilizadas como doadoras de explantes para multiplicação *in vitro* e indução de calogênese.

3.2 Indução de calogênese

Segmentos nodais (0,5 cm), internodais (1,0 cm) e foliares (1,0 cm²) foram excisados assepticamente de plantas *in vitro* e inoculados em meio MSM solidificado, suplementado com diferentes concentrações de picloram (PIC) (4,14; 20,7; 41,4 µM). As culturas foram incubadas na ausência de luz, sob luz fluorescente branca ou sob LED das cores vermelha (660 nm), azul (450 nm), branca (4000 k) ou mista (vermelha + azul – 450 e 660 nm), com intensidades luminosas de 47 µmol m⁻²s⁻¹, 45 µmol m⁻²s⁻¹, 42 µmol m⁻²s⁻¹, 43 µmol m⁻²s⁻¹ respectivamente. A intensidade luminosa foi mensurada utilizando o Fotômetro Li. 250 A Light Meter. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 h.

Para cada tratamento, foram utilizados três frascos (10 cm altura x 5,5 cm largura, com tampa de polipropileno transparente), contendo três explantes cada. Os experimentos foram repetidos por duas vezes. Os explantes caulinares foram inoculados horizontalmente,

enquanto os segmentos foliares foram posicionados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Após 60 dias de cultura foram avaliadas as percentagens de calogênese e determinado o acúmulo de biomassa pela quantificação dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). A massa seca foi obtida após secagem a $48^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa Tecnal[®] TE-393/1, até atingir peso constante.

3.3 Análise fitoquímica

3.3.1 Preparo de extratos

Folhas excisadas de plantas mantidas *in vitro* ou em condições naturais, assim como amostras de calos produzidos em resposta às diferentes concentrações de PIC e condições de iluminação, foram secas em liofilizador por cinco dias e trituradas manualmente com auxílio de almofariz e pistilo. Para determinar o melhor método de extração, primeiramente, os extratos de folhas de plantas *in vivo* foram preparados utilizando 1 g de material seco em 50 mL de etanol 40% e mantidos por 1 hora em refluxo (BIRK et al., 2005). Em seguida, os extratos foram secos em banho-maria a 60°C . Alternativamente, uma segunda metodologia de extração também foi avaliada. Folhas de plantas *in vivo* foram maceradas em etanol 90%, utilizando ultrassom por 15 minutos e, em seguida, os extratos foram evaporados sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 40°C para retirada do solvente. Todos os extratos foram armazenados a -20°C .

3.3.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise de flavonoides, extratos de calos e folhas de plantas mantidas *in vitro* ou em condições naturais foram ressuspensos em metanol com auxílio de ultrassom (10 mg/mL) e aplicados em placa de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} (Marcherey-Nagel), com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, em temperatura ambiente.

A fase móvel foi constituída de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26 v/v). A placa foi revelada com NP:PEG (Natural Products – Polietilenoglicol). A visualização foi realizada em câmara de UV_{365nm} (WAGNER; BLADT, 2001).

O fator de retenção (R_f) foi calculado conforme a equação abaixo:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra (cm)}}{\text{distância percorrida pelo eluente (cm)}}$$

3.3.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV (CLAE-UV)

Os extratos dos diferentes materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado foram diluídos em metanol grau espectroscópico (Tedia, Brasil) na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram solubilizados em ultrassom por 15 minutos, filtrados (Millipore de 0,45 μm , Merck Alemanha) e submetidos à análise em cromatógrafo líquido (ultra) Shimadzu, equipado com bomba LC-20AD, degaseificador DGU-20AS, forno CTO-20AS e controlador CBM20A e detector de UV SPD-M20A. As amostras foram separadas em coluna Thermo-scientific[®] Hypersil Gold RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 \AA) e o forno colocado em temperatura de 25°C.

Foram utilizadas duas condições de fase móvel: a primeira para determinar o perfil cromatográfico e a segunda condição para detecção de flavonoides. A eluição da fase móvel ocorreu por gradiente do tipo rampa, constituído pelas soluções A (água ultrapura MilliQ[®] acidificada com ácido acético glacial a 1%, pH 3,0) e B (acetonitrila, Tedia[®]), como descrito no Quadro 3.

Para a detecção de flavonoides, foi utilizada uma fase móvel que consistiu em um gradiente composto pelas mesmas soluções A e B, em proporções diferentes (Quadro 4). O fluxo foi de 1 mL/min e um volume de injeção de 10 μL .

Quadro 3 – Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a determinação do perfil cromatográfico de materiais *in vitro* e folhas de plantas *in vivo* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, por CLAE-UV.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
2	95	5
45	0	100
55	0	100
61	95	5

Quadro 4 – Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a detecção de flavonoides em materiais *in vitro* e folhas de plantas *in vivo* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, por CLAE-UV-DAD.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0 – 2	95	5
2 – 30	80	20
30 – 40	80	20

Com base nos resultados obtidos por CLAE-UV, foram conduzidas novas análises cromatográficas aplicando a técnica de ionização por *eletrospray*, acoplada à espectrometria de massas (CLAE-UV-IES-EM). O equipamento utilizado foi um UPLC (ultra) Shimadzu® com desgaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC),

detector de UV de comprimento de onda fixo (SPD20A), forno (CTO20A) e interface (CSM20A). As amostras foram separadas na mesma coluna empregada na análise por CLAE-UV, assim como a eluição da fase móvel também seguiu os parâmetros acima descritos. Após a passagem pelo detector de UV, com lâmpada fixa em 408 nm, a fase móvel foi gaseificada por ionização *electrospray* (200 °C - 9 µL/min - 4 psi) e seguiu para o espectrômetro de massas (Bruker®MicrOTOF-QII). Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo no intervalo massa/ carga (m/z) de 50 a 1000. O gás empregado durante a dessolvatação foi o nitrogênio com fluxo de 400 L/h, submetido à temperatura de 250°C. A energia de ionização foi de 10 eV, com análise de varredura de massas. As análises foram realizadas em colaboração com a Central Analítica Fernanda Coutinho, do Instituto de Química da UERJ, sob a coordenação da Prof.^a Dr.^a Mônica Regina da Costa Marques.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1 Ensaio de captura do radical DPPH

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada utilizando-se o ensaio de captura do radical DPPH, no qual é determinada a capacidade do extrato de sequestrar o radical livre, reduzindo-o a hidrazina, com base no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura Calixto (1998).

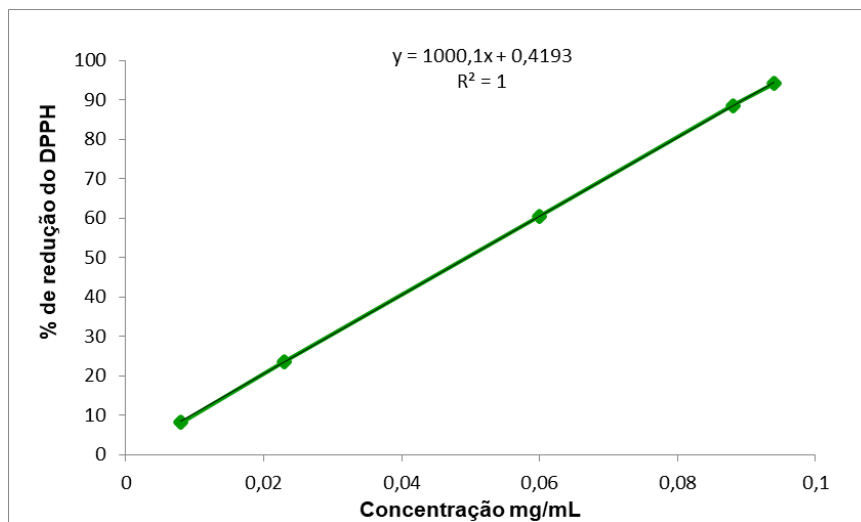
Os extratos foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em diferentes concentrações (1 - 30 mg/mL). Amostras de 25 µL foram incubadas com 975 µL de solução metanólica do radical DPPH (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, Wisconsin, EUA) na concentração de 0,6 mM por 1 hora no escuro, em triplicata. Em seguida, as leituras de absorbância foram efetuadas a 515 nm, em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (ThermoScientific). A porcentagem de captura do radical foi determinada pela equação abaixo:

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

Onde: Ac = absorbância do controle negativo; Aa = absorbância da amostra.

Os valores de CE_{50} (concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH) foram calculados a partir de curva analítica, obtida por regressão linear. Como controle positivo, foi determinada a curva padrão da quercetina (Figura 9).

Figura 9 – Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH.



3.4.2 Determinação da capacidade quelante de íons ferrosos

O ensaio que avalia a capacidade das amostras de quelar os íons ferrosos (Fe^{+2}) foi realizado de acordo com Chew e colaboradores (2009), com algumas modificações. Os extratos foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em diferentes concentrações (0,25 - 5 mg/mL). Amostras de 250 μ L de cada extrato foram incubados com 250 μ L sulfato ferroso ($FeSO_4$) a 0,1 mM por 5 minutos. A reação foi iniciada com adição de 250 μ L de ferrozina a 0,25 mM e as soluções deixadas em repouso por 10 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Em seguida, as leituras de absorvância foram efetuadas a 562 nm, em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (ThermoScientific). O mesmo procedimento foi realizado para o EDTA em diferentes concentrações (5 – 30 μ g/mL) (Figura 10).

A capacidade quelante de íons ferrosos foi calculada pela equação abaixo:

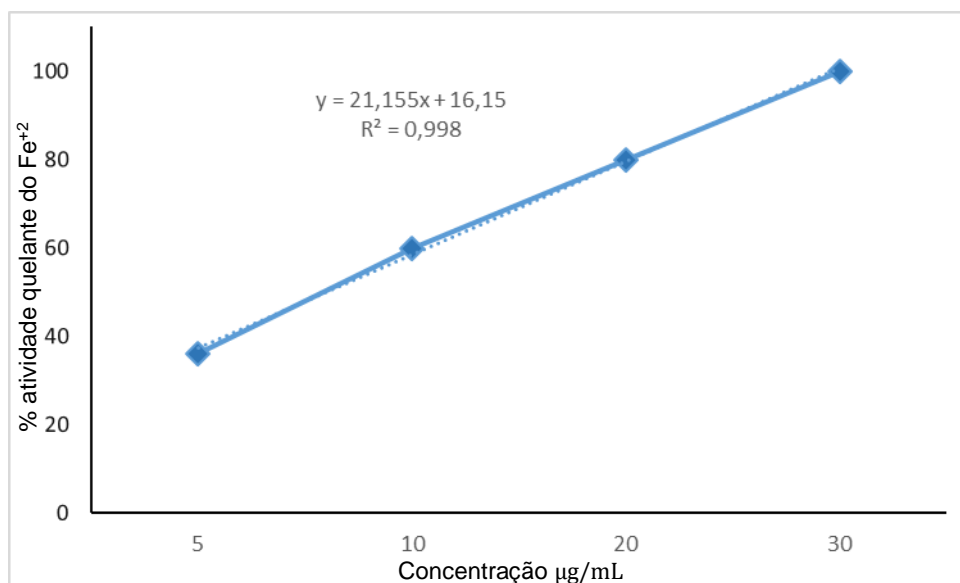
$$\text{Habilidade quelante de Fe}^{+2}(\%) = \frac{A_0 - (A - A_b) \times 100}{A_0}$$

Onde A_0 = absorvância do controle.

A = absorvância da amostra.

A_b = absorvância do branco.

Figura 10 – Curva padrão de atividade antioxidante do EDTA avaliada pelo método da atividade quelante do íon de ferro.



3.5 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

3.5.1 Extração de proteínas

A extração de proteínas nos diferentes materiais foi realizada de acordo com Azevedo e colaboradores (1998), com modificações. Aproximadamente 300 mg de material vegetal fresco foram triturados na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 20% e nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato a 100 mM (pH 7,5), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 1 mM e 1,4-Ditiotreitol

(DTT) a 3 mM, antes da centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos, a 4°C. As alíquotas do sobrenadante foram coletadas e mantidas em gelo até o momento das análises.

3.5.2 Análise da atividade de SOD

A atividade da enzima SOD foi avaliada espectrofotometricamente pela sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitroazultetrazólio (NBT), levando à formação de um precipitado de cor azul violáceo, denominado formazana (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O ensaio foi realizado em sistema fechado, em uma cuba de madeira (28 × 65 × 33 cm), contendo uma lâmpada tubular de LED branca fria, revestimento de alumínio e uma placa de isopor (63 x 26 x 0,15 cm), como suporte para os tubos de ensaio (2 x 10 cm), disposta a 15 cm da fonte luminosa.

Tubos de ensaio contendo 3 mL de solução de reação (tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,8, metionina a 13 mM, NBT a 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina a 5 µM) e 50 µl de extrato vegetal foram transferidos para o suporte de isopor da cuba de madeira e expostos à luz por 5 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela incubação do material no escuro. Em seguida, a fotorredução das amostras foi avaliada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma mistura contendo apenas solução de reação, sem extrato vegetal, e não exposta à luz, foi designada como branco. Tubos contendo a solução de reação, sem extratos vegetais, mas expostos à luz, foram utilizados como controles da produção de formazana. Os valores foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (U SOD mg⁻¹ proteína).

$$U \text{ SOD} = (Abs_{\text{formazana total}} / Abs_{\text{amostra}}) - 1 * (1000/vol_{\text{amostra}} * 1/ [\text{ }]_{\text{proteína totais}})$$

Onde:

$Abs_{\text{formazana total}}$ = valor máximo da fotorredução do NBT à formazana;

Abs_{amostra} = valor da absorbância da amostra

vol_{amostra} = volume do extrato vegetal em µL.

3.5.3 Análise da atividade de CAT

A atividade da enzima CAT foi determinada por meio do monitoramento do consumo de H₂O₂, de acordo com a metodologia descrita por Havir e McHale (1987) e adaptada por Azevedo e colaboradores (1998). Para isso, 50 µL de extrato vegetal e 60 µL de H₂O₂ a 0,34 M foram adicionados a 1390 µL de tampão fosfato a 100 mM (pH 7,5), a 25°C. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ e o seu consumo foi monitorado espectrofotometricamente pelo declínio da absorbância a 240 nm, durante um minuto, em intervalos de cinco segundos. Uma solução constituída por tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) e H₂O₂ foi utilizada como branco.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi considerado o coeficiente de extinção molar (CE) do H₂O₂ (39,4 mM⁻¹ cm⁻¹), e os resultados foram expressos em µmol. min⁻¹. mg⁻¹ proteína.

$$\frac{\Delta abs}{CE} \times \frac{V_{total}}{V_{extrato}} \times \frac{1}{prot. totais} \times 1000 = [] \text{ CAT}$$

Onde,

Δ_{abs} = valor da diferença entre a absorbância inicial (A0) e absorbância final (A1)

V_{total} = volume total da solução de reação em µL (1500 µL)

$V_{extrato}$ = volume do extrato vegetal em µL (50 µL).

3.5.4 Análise da atividade de APX

A determinação da atividade da enzima APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), com modificações. Inicialmente, 50 µL de extrato vegetal foram adicionados a uma solução de reação contendo 650 µL de tampão fosfato a 80 mM, pH 7,0, 100 µL de ácido ascórbico a 0,5 mM e 100 µL de EDTA a 1 mM, mantida em banho-maria a 30°C. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL H₂O₂ a 10 mM e a atividade enzimática foi avaliada por meio do monitoramento espectrofotométrico do declínio da absorbância a 290 nm, durante um minuto, em intervalos de cinco segundos. Para o cálculo da atividade enzimática foi

considerado o coeficiente de extinção molar da APX ($2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

$$\frac{\Delta \text{abs}}{CE} \times \frac{V \text{ total}}{V \text{ extrato}} \times \frac{1}{\text{prot. totais}} \times 1000 = [\text{APX}]$$

Onde:

Δabs = valor da diferença entre a absorbância inicial (A0) e absorbância final (A1)

V_{total} = volume total da solução de reação em μL (1000 μL)

V_{extrato} = volume do extrato vegetal em μL (50 μL).

3.6 Análise estatística

Todos os experimentos de cultura de tecidos foram realizados, por duas vezes, utilizando grupos de nove explantes. As análises das atividades antioxidantes e enzimáticas foram realizadas em triplicatas obtidas de dois experimentos independentes.

A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, com o auxílio dos programas Graphpad InStat e Gaphpad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), sendo consideradas significativas as diferenças com valores de $p \leq 0,05$ ou pacote estatístico MStat-C.

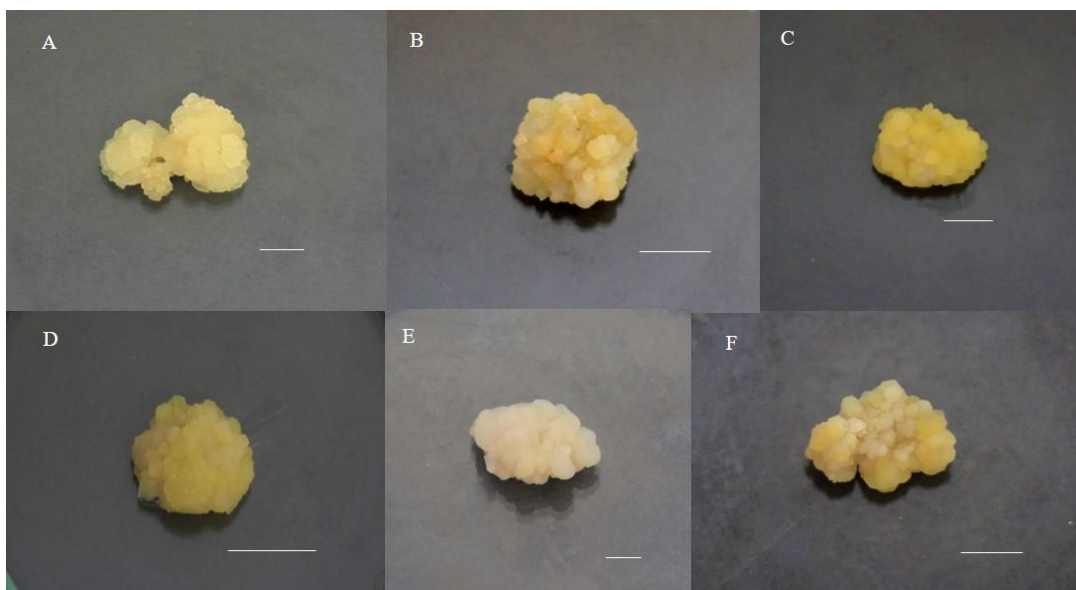
4 RESULTADOS

4.1 Indução de calogênese

O processo de indução de calos foi estudado em segmentos caulinares e foliares excisados de plantas *in vitro*, sendo avaliadas diferentes qualidades de luz e concentrações de PIC. Os explantes apresentaram formação de calos em resposta a todos os tratamentos, com frequências entre 81,6 e 100% (Tabela 1). Os calos obtidos eram friáveis e apresentavam coloração verde amarelada em todas as condições testadas (Figura 11).

Segmentos internodais apresentaram o maior percentual de calogênese (100%) na maioria das qualidades de luz testadas, com exceção dos explantes incubados no escuro em meio suplementado com PIC a 20,7 μM e 41,4 μM , e sob LED azul em meio com PIC a 20,7 μM . Por outro lado, segmentos nodais e foliares apresentaram percentuais de calogênese entre 81,6 e 100 % dependendo da qualidade de luz e da concentração de PIC testada (Tabela 1).

Figura 11 – Calos formados a partir de segmentos internodais de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 μM , após 60 dias de cultura sob diferentes qualidades de luz



Legenda: Calos obtidos sob diferentes qualidades de luz: A- escuro; B- Luz fluorescente; C- LED branco; D- LED vermelho; E- LED azul; F- LED misto (associação azul + vermelho). Barra = 1cm

Tabela 1 – Calogênese (%) a partir de segmentos caulinares e foliares de plantas *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura sob diferentes qualidades de luz

Condições de luz	PIC (μM)	Calogênese (%)		
		Explante		
		Nó	Entrenó	Folha
ESC	4,14	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
	20,7	91,2 \pm 0,6 ^b	91,5 \pm 0,5 ^b	100 \pm 0,0 ^a
	41,4	93,2 \pm 1,8 ^b	92,7 \pm 1,0 ^b	93 \pm 1,7 ^b
LF	4,14	94,4 \pm 3,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	81,6 \pm 0,7 ^c
	20,7	94,4 \pm 3,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
	41,4	94,4 \pm 3,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	84,4 \pm 2,5 ^c
LA	4,14	92,2 \pm 1,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	81,6 \pm 0,9 ^c
	20,7	100 \pm 0,0 ^a	92 \pm 1,1 ^b	92,1 \pm 1,2 ^b
	41,4	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	92,1 \pm 1,2 ^b
LV	4,14	92,2 \pm 1,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
	20,7	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	92,2 \pm 1,2 ^b
	41,4	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
LB	4,14	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
	20,7	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a
	41,4	92,2 \pm 1,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	84,4 \pm 2,5 ^c
LM	4,14	92,2 \pm 1,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	81,6 \pm 0,9 ^c
	20,7	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a	81,6 \pm 0,9 ^c
	41,4	92,2 \pm 1,2 ^b	100 \pm 0,0 ^a	100 \pm 0,0 ^a

Legenda: ESC- escuro; LF- luz fluorescente; LA- LED azul; LV – LED vermelho; LB- LED branco; LM- LED misto (vermelho+ azul).

A influência da qualidade da luz na produção de biomassa (g) variou de acordo com o explante inicial. Calos friáveis formados a partir de segmentos nodais apresentaram maior acúmulo de biomassa quando cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 4,14 μM e mantidos sob luz fluorescente branca. Por outro lado, os calos formados a partir de segmentos internodais apresentaram maiores valores de biomassa quando incubados sob os LEDs vermelho ou branco, em meio com PIC a 41,4 μM e 20,7 μM , respectivamente (Tabela 2). Os calos derivados de segmentos foliares apresentaram maior acúmulo de biomassa em meio suplementado com PIC a 4,14 μM somente quando mantidos sob LED vermelho (0,93 \pm 0,03 g peso seco), embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre esse tratamento e a incubação em meio com PIC a 20,7 μM sob LED misto.

Tabela 2 – Peso seco (g) de calos friáveis derivados de segmentos caulinares e foliares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC e mantidos sob diferentes qualidades de luz, por 60 dias

Condições de luz	PIC (µM)	Tipo de explante		
		Nó	Entrenó	Folha
ESC	4,14	0,43±0,02 ^c	0,36±0,03 ^c	0,62±0,04 ^b
	20,7	0,38±0,03 ^{cd}	0,45±0,01 ^c	0,22±0,03 ^e
	41,4	0,31±0,07 ^d	0,50±0,05 ^b	0,42±0,03 ^c
LF	4,14	0,85±0,02 ^a	0,27±0,02 ^{cd}	0,15±0,02 ^e
	20,7	0,25±0,02 ^e	0,61±0,02 ^a	0,35±0,03 ^d
	41,4	0,17±0,02 ^e	0,36±0,06 ^c	0,25±0,01 ^e
LA	4,14	0,65±0,04 ^b	0,62±0,02 ^a	0,67±0,06 ^b
	20,7	0,57±0,03 ^b	0,52±0,1 ^b	0,47±0,04 ^c
	41,4	0,41±0,02 ^c	0,39±0,07 ^c	0,44±0,03 ^c
LV	4,14	0,36±0,04 ^d	0,67±0,02 ^a	0,93±0,03 ^a
	20,7	0,68±0,01 ^b	0,58±0,04 ^b	0,47±0,03 ^c
	41,4	0,56±0,05 ^b	0,71±0,03 ^a	0,35±0,03 ^d
LB	4,14	0,29±0,02 ^e	0,54±0,02 ^b	0,41±0,02 ^c
	20,7	0,66±0,02 ^b	0,73±0,04 ^a	0,49±0,03 ^c
	41,4	0,47±0,02 ^c	0,64±0,05 ^a	0,56±0,03 ^b
LM	4,14	0,38±0,05 ^{cd}	0,36±0,03 ^c	0,58±0,07 ^b
	20,7	0,62±0,01 ^b	0,13±0,005 ^d	0,89±0,02 ^a
	41,4	0,28±0,04 ^e	0,39±0,06 ^c	0,51±0,03 ^d

Legenda: ESC- Escuro; LF- Luz fluorescente branca; LA- LED azul; LV- LED vermelho; LB- LED branco; LM- LED misto (vermelho+ azul).

O tipo de explante foi a variável que teve a contribuição mais significativa para a formação de calos (53,7%), em comparação com os outros parâmetros testados. Por outro lado, a qualidade da luz e a concentração de PIC foram mais significativas para o acúmulo de biomassa (29,05 e 25,13%, respectivamente). A interação entre o tipo de explante e a condição de luz, bem como a interação entre as três variáveis testadas, não influenciaram de modo significativo os parâmetros avaliados (menos de 10%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Contribuição relativa do tipo de explante, condições de luz e concentração de picloram e suas interações com a variação na formação de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

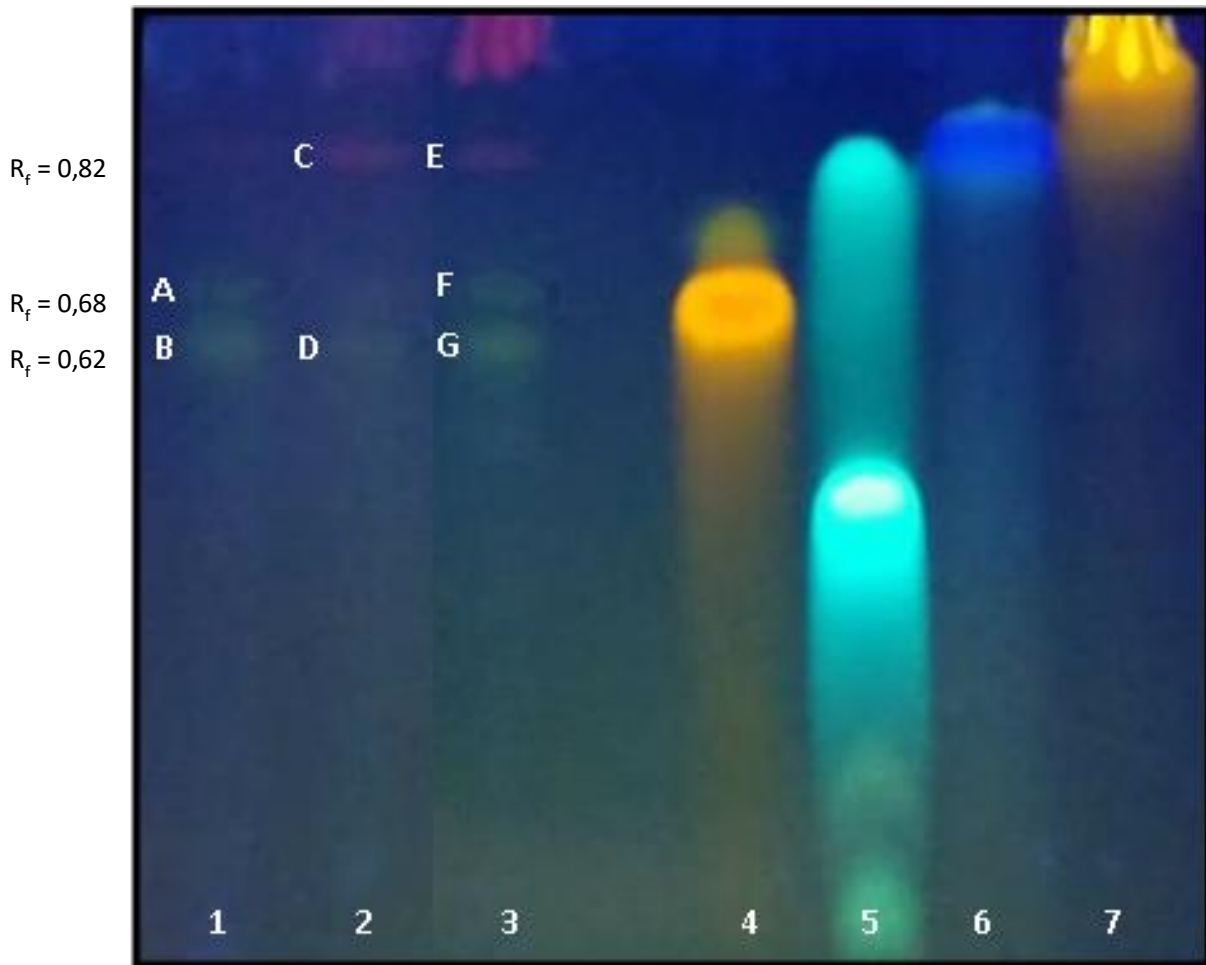
Fonte de variação	Calogênese (%)	Acúmulo de biomassa (%)
Tipo de explante	53.7	1.67
Condições de iluminação	8.55	29.05
Regulador de crescimento	1.89	25.13
Tipo de explante x Condições de luz	9.27	8.37
Tipo de explante x Regulador de crescimento	5.43	15.08
Condições de iluminação x Regulador de crescimento	12.09	10.61
Tipo de explante x Condições de iluminação x Condições de luz	8.55	9.49

4.2 Análise fitoquímica

4.2.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na análise para detecção de flavonoides foram observadas manchas esverdeadas e alaranjadas nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vitro* ou sob condições naturais, com valores de 0,68 e 0,82 (Figura 12). Não foram observadas manchas indicativas de flavonoides nas amostras de calos obtidos sob as diferentes qualidades de luz testadas (dados não mostrados).

Figura 12 – Perfil cromatográfico, pelo método de CCD, para identificação de flavonoides em extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e produzidas *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Legenda: Extrato de folhas *in vivo* utilizando método de extração por refluxo (1) e ultrassom por 15 minutos (2); Extrato de folha *in vitro* utilizando método de extração por ultrassom por 15 minutos (3); Padrões comerciais: Rutina (4), Ácido clorogênico (5), Ácido gálico (6), Quercetina (7). Fator de retenção: 0,687 (A e F); 0,625 (B, D e G); 0,825 (C e E); Rutina (0,687); Ácido clorogênico (0,5); Ácido gálico (0,875); Quercetina (0,95). Fase móvel: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26 v/v).

4.2.2 Análise por CLAE-UV

As análises por CLAE-UV foram inicialmente realizadas para determinar a melhor metodologia de extração. Para isso, foram utilizadas folhas de plantas mantidas em condições naturais, submetidas a dois processos extrativos: etanol 40% sob refluxo por 1 h ou etanol 90% sob ultrassom por 15 minutos. Foram também avaliadas duas condições de corrida,

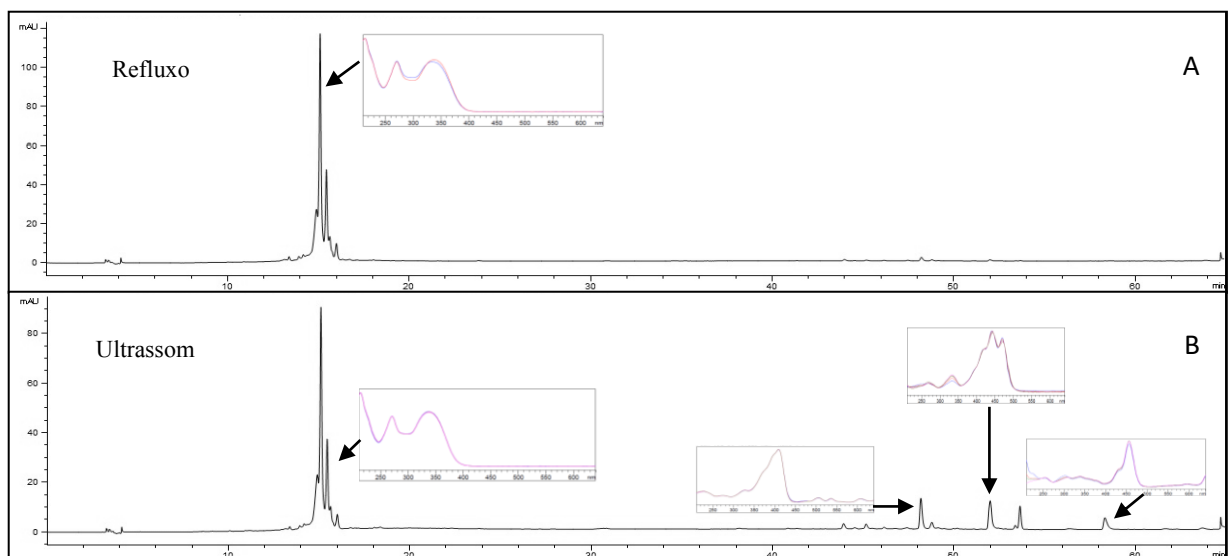
utilizando fases móveis para a determinação do perfil cromatográfico (condição de triagem) e para detecção de flavonoides.

Na condição de triagem, a análise de extratos de folhas de plantas *in vivo* preparados com o uso de ultrassom revelou a presença de quatro sinais os quais não foram detectados no extrato preparado sob refluxo. Esses sinais com tempos de retenção (t_R) variando entre 43 a 58 minutos apresentaram espectro de absorção característico de carotenoides (Figura 13).

Na condição para detecção de flavonoides, não foram observadas diferenças entre os sinais detectados, independentemente do método de extração (Figura 14). Os sinais apresentaram tempos de retenção variando entre 29 a 32 minutos com absorção a 340nm evidenciando a presença de flavonoides nesses extratos.

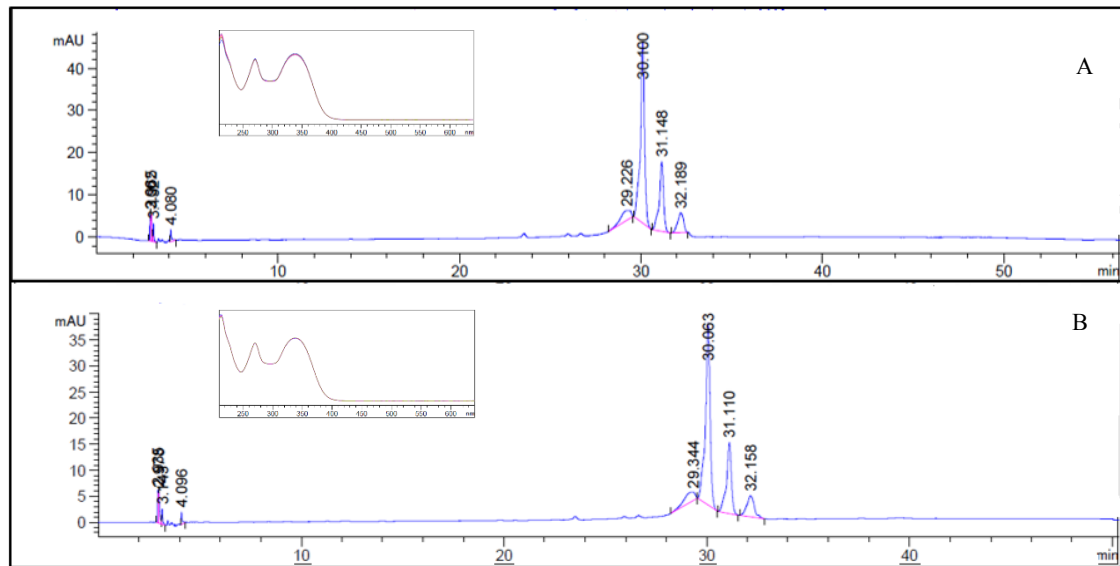
Com base nesses resultados, a maceração em etanol 90% sob ultrassom por 15 min foi adotada como método de preparo de extratos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, assim como de calos derivados de explantes caulinares e foliares, para as análises por CLAE-UV-IES-EM.

Figura 13 – Perfil cromatográfico por CLAE-UV dos extratos etanólicos obtidos de folhas *in vivo* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado utilizando duas metodologias de extração, na condição de triagem.



Legenda: A- Extração em etanol a 40% sob refluxo; B- Extração em etanol a 90 % sob ultrassom 15 minutos. Condição de corrida: soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial) e B (acetonitrila); gradiente: 95% de A; 5% de B (0 a 2 min); 100% de B (45 a 55 min); 95% de A; 5% de B (56 a 61 min).

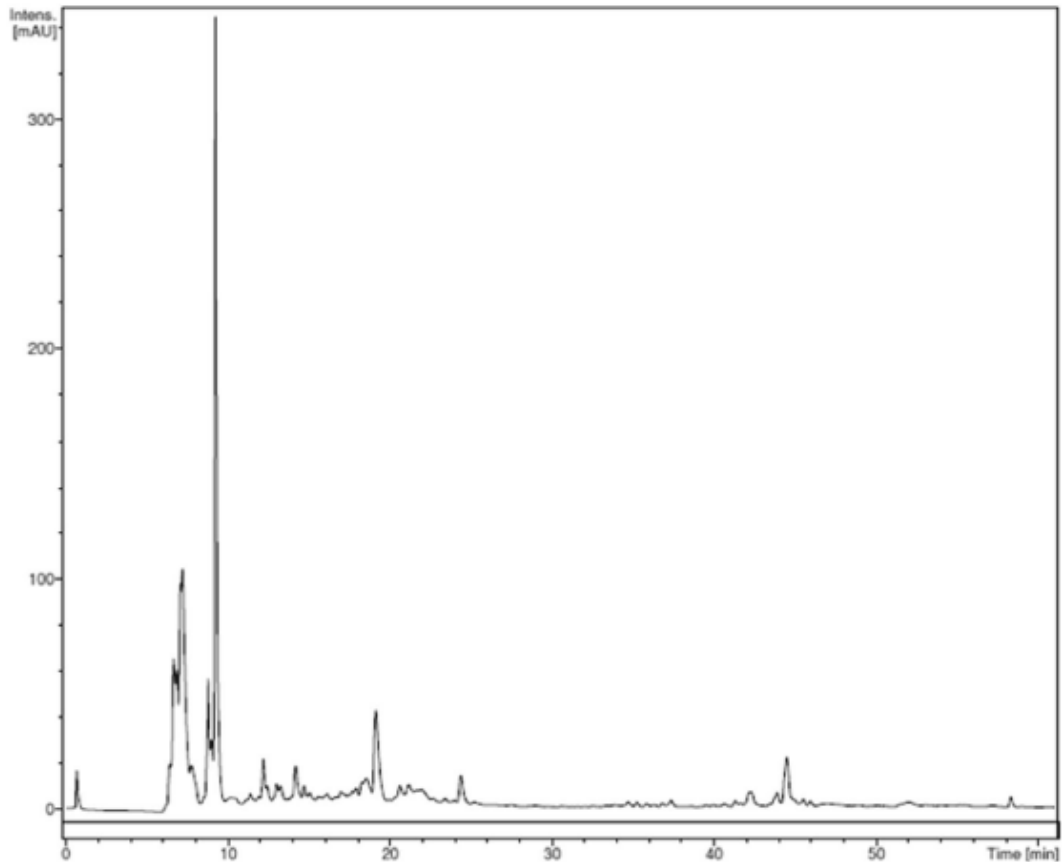
Figura 14 – Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD de extratos etanólicos de folhas *in vivo* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado utilizando duas metodologias de extração, na condição para detecção de flavonoides, com detecção em UV_{340nm}.



Legenda: A- Extração em etanol a 40% sob refluxo; B- Extração em etanol a 90 % sob ultrassom 15 minutos. No detalhe, o espectro de absorção UV dos sinais majoritários. Condição de corrida: soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial) e B (acetonitrila); gradiente: 95% de A; 5% de B (0 a 2 min); 80% de A; 20% de B (2 a 40 min).

Os extratos de calos derivados de segmentos de caulinares e foliares apresentaram diferentes sinais em todos os comprimentos de onda avaliados, que variaram de acordo com a condição de luz e o explante inicial. O maior número de sinais foi detectado nos calos derivados de segmentos intermodais cultivados em meio suplementado com PIC a 41,4 μ M sob LED azul (Figura 15).

Figura 15 – Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD de extratos etanólicos de calos obtidos a partir de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com PIC a 41,4 μM sob LED azul de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

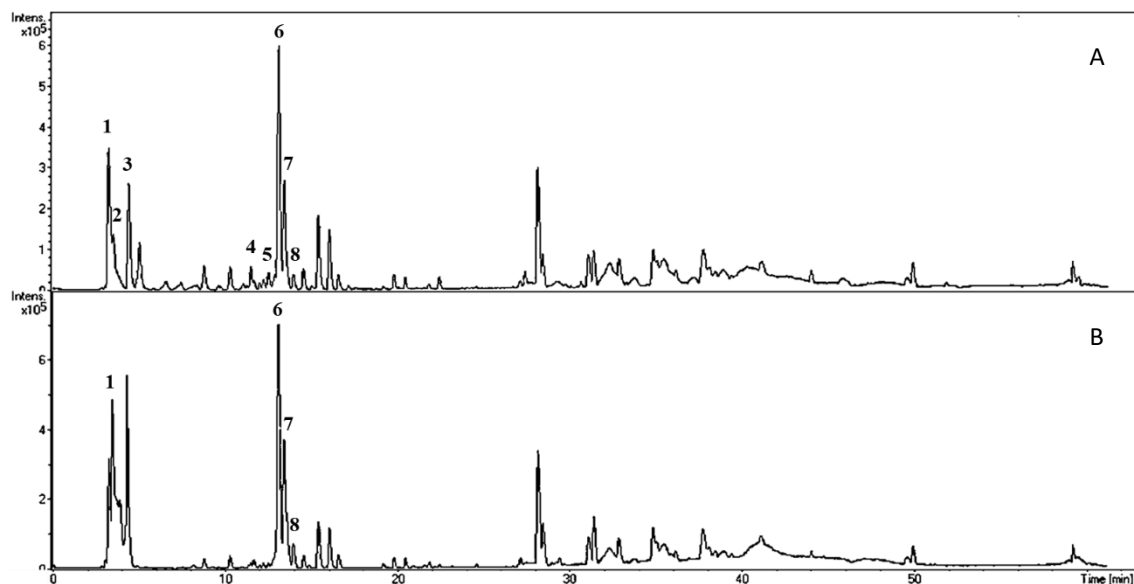


4.2.3 Análise por CLAE-UV-IES-EM

Na análise por CLAE-UV-IES-EM os extratos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (Figura 16). As massas exatas dos íons pseudomoleculares [M-H] foram comparadas com os dados da literatura, e oito substâncias foram identificadas (Tabela 4). A sacarose e o ácido digalacturônico (sinais 1 e 2), comumente encontrados em extratos de plantas e em meios de cultura, foram identificados no início da corrida cromatográfica.

Em relação aos flavonoides, duas substâncias principais foram registradas nos extratos foliares: a substância 6 em tR 13,1 min (vicenina-2; [MH] - = 593,1951; C₂₇H₂₉O₁₅) e a substância 7 em tR 13,4 min (schaftosídeo; [MH] - = 563,1824; C₂₆H₂₇O₁₄). Outros derivados de apigenina-*C*-glicosil foram detectados em pequenas quantidades. Apigenina-6-*C*-glicosídeo ou isovitexina (tR = 13,9 min, M-H- = 431,1289; C₂₁H₁₉O₁₀) foi detectada em ambos os extratos de folhas. Por outro lado, apigenina-6-*C*-glicosídeo-7-*O*-glicosídeo (tR = 11,5 min; [MH] - = 593,1958; C₂₇H₂₉O₁₅) e apigenina-8-*C*-glicosídeo-7-*O*-glicosídeo (tR = 12,8 min; [MH] - = 593,1943; C₂₇H₂₉O₁₅) foram detectados apenas em folhas de plantas *in vitro*.

Figura 16 – Análise cromatográfica por CLAE-UV-IES-EM (modo negativo) dos extratos etanólicos de folhas de plantas *in vitro* e *in vivo* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Legenda: A- extrato de folhas *in vitro*; B- extratos de folha *in vivo*.

Tabela 4 – Substâncias detectadas por CLAE-UV-IES-EM em extratos de folhas de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

N.	tR (min)	[M-H] ⁻	Fórmula molecular	Substância sugerida	Referência	Extrato vegetal	
						<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
1	3.2	341.1044	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	sacarose	-	+	+
2	3.5	369.0655	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₃	Ácido digalacturônico	-	-	+
3	4.4	739.3424	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	Luteonina-7- <i>O</i> - dirhamnosideo 3'- <i>O</i> -glicosideo	Sakalem et al. 2012	-	+
4	11.5	593.1958	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Apigenina-6- <i>C</i> - glicosideo-7- <i>O</i> - glicosideo	Ozarowski et al. 2018	-	+
5	12.8	593.1943	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Apigenina-8- <i>C</i> - glicosideo-7- <i>O</i> - glicosideo	Cvetkovikj et al. 2013	-	+
6	13.1	593.1951	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Vicenina-2 (apigenina-6,8- <i>C</i> - diglicosideo)	Sakalem et al. 2012; Araujo et al 2017	+	+
7	13.4	563.1824	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	Schaftosideo (apigenina-6- <i>C</i> - glicosideo-8- <i>C</i> - ribosideo)	Sakalem et al. 2012; Frag et al. 2016; Araujo et al. 2017	+	+
8	13.9	431.1289	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Isovitexina (apigenina-6- <i>C</i> - glicosideo)	Zucolotto et al., 2011; Frag et al. 2016	+	+

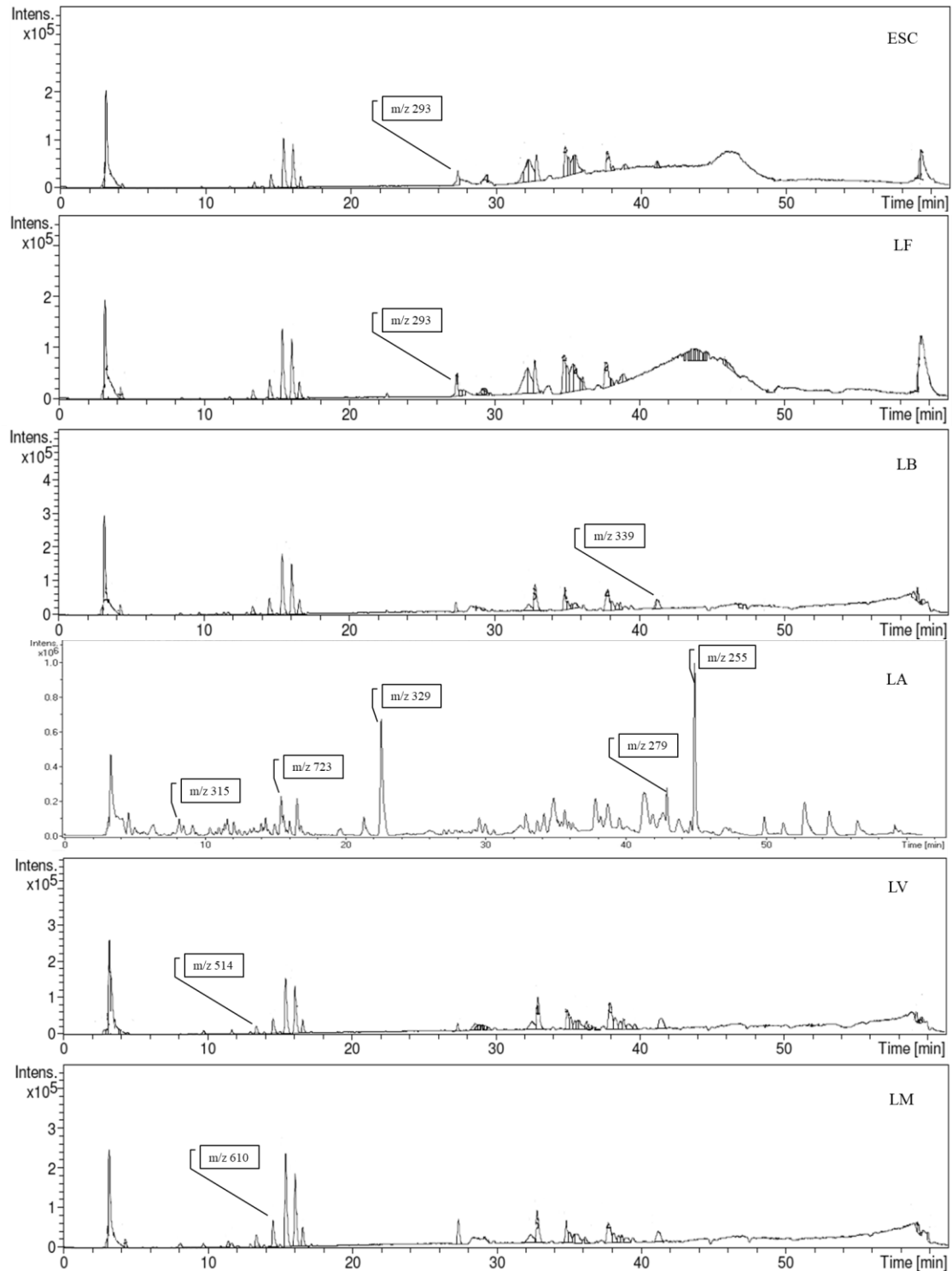
Substâncias 3-6 apresentaram UV λ_{\max} em 270 e 350 nm

Os extratos de calos obtidos a partir de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com a maior concentração de PIC sob as diferentes condições de iluminação foram escolhidos para realização da análise mais específica de identificação de substâncias de acordo com os resultados anteriores.

A análise do perfil fitoquímico dessas amostras (Figura 17), sugeriu a presença de 14 substâncias, identificadas em comparações com o banco de dados Massbank (<http://www.massbank.jp>) e com a literatura, enfatizando aquelas já encontradas no gênero *Passiflora*. O maior número de substâncias foi detectado em extratos de calos cultivados sob LED azul, incluindo oito sinais exclusivos (Tabela 5). Por outro lado, três substâncias (4, 5 e 9) foram encontradas em todas as amostras, com exceção dos extratos de calos cultivados sob LED azul. Além disso, a substância 10 foi encontrada apenas em extratos de calos mantidos sob LED, mas não sob luz fluorescente e no escuro (Tabela 5).

Os principais sinais encontrados apenas na amostra de calos obtidos sob o LED azul mostraram os íons pseudomoleculares M- [H] = 295 (tR = 34,2 min), 279 (tR = 42,9 min), 255 (tR = 44,9 min), compatíveis com os ácidos 9-hidroxi-10,12-octadecadienóico, linoleico e palmítico, respectivamente (Tabela 5).

Figura 17 – Cromatogramas de íons totais por CLAE-UV-IES-EM de extratos etanólicos de calos derivados de segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 μM e mantidos sob diferentes qualidades de luz de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Legenda: ESC – Escuro; FL - Lâmpada fluorescente branca; LA - LED azul; LV - LED vermelho; LB - LED branco; LM - combinação de LEDs azuis e vermelhos.

Tabela 5 – Substâncias encontradas em extratos de calos derivados de segmentos internodais de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado em meio MSM suplementado com PIC a 41,4 µM sob diferentes qualidades de luz, detectadas por CLAE-UV-IES-EM.

No.	Tempo de retenção (min)	[M-H] ESI (-)	Substância sugerida	Referência	Condição de iluminação					
					ESC	LF	LB	LA	LV	LM
1	8.2	315.0893	Dihidroxibenzoil-hexosídeo (C13H15O9)	Ozarowski et al. 2018	-	-	-	+	-	+
2	9.1	447.1402	Isoorientina (C21H19O11)	Otify et al. 2015; Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-
3	12.1	461.1928	Tirosol- <i>O</i> -di-hexosídeo (C20H29O12)	Otify et al. 2015	-	-	-	+	-	-
4	13.4	514.3626	Não identificado	-	+	+	+	-	+	+
5	14.5	610.4210	Não identificado	-	+	+	+	-	+	+
6	15.4	723.5050	Derivado C-glicosil	Simirgiotis et al. 2013	+	+	+	+	+	+
7	21.3	327.2359	Trihidroxi-octadecadienóico (C18H31O5)	Otify et al. 2015; Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-
8	22.6	329.2524	Trihidroxy-octadecadienóico (C18H33O5)	Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-
9	27.4	293.1763	Hydroxy-octadecatrienóico (C18H29O3)	Farag et al. 2016	+	+	+	-	+	+
10	32.9	265.1622	Não identificado	-	-	-	+	+	+	+
11	34.2	295.2443	Ácido hidroxioctadecadienóico (C18H32O3)	Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-
12	34.9	311.2216	Ácido nonadecanoico, éster metílico (C20H40O2)	Farag et al. 2016	+	+	+	+	+	+
13	42.9	279.2489	Ácido linoleico (C18H32O2)	Otify et al. 2015; Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-
14	44.9	255.2476	Ácido palmítico (C16H32O2)	Otify et al. 2015; Farag et al. 2016	-	-	-	+	-	-

Legenda: ESC – escuro; LF – luz fluorescente; LA – LED azul; LV – LED vermelho; LB – LED branco; LM – LED misto (combinação de LED azul e vermelho). Presença (+) e ausência (-) de substâncias.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante

Os ensaios para determinação do potencial antioxidante foram realizados utilizando extratos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* e de calos derivados de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com PIC a 41,4 μM sob diferentes qualidades de luz.

A avaliação da capacidade de captura do radical DPPH de extratos de diferentes materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* revelou baixa atividade antioxidante em todas as amostras analisadas, com valores de CE_{50} variando entre 41 e 166 g/L (Tabela 6). Os extratos de calos derivados de segmentos nodais incubados sob luz fluorescente branca apresentaram a maior capacidade de captura do radical DPPH, com CE_{50} de $41 \pm 2,1$ g/L (Tabela 6).

Por outro lado, extratos de todos os materiais analisados apresentaram boa capacidade quelante de íon ferroso, expressando valores de CE_{50} que variaram entre 1,9 e 6,52 g/L (Tabela 6). A maior atividade quelante foi observada nos extratos de folhas de plantas *in vivo* ($\text{CE}_{50} = 1,9 \pm 0,1$), enquanto a menor capacidade quelante foi encontrada em extratos de calos derivados de segmentos internodais mantidos sob LED vermelho ($\text{CE}_{50} = 6,5$ g/L) (Tabela 6).

Tabela 6 – Potencial antioxidante determinado pelos ensaios de captura do radical DPPH e capacidade quelante de íons de ferro de extratos etanólicos de materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Material vegetal		CE ₅₀ (g/L)	
		DPPH	Capacidade quelante de íons de ferro
Quercetina		0.04±0.005	-
EDTA		-	0.001±0.004
Folhas de plantas <i>in vivo</i>		64±6.1 ^c	1.9±0.1 ^a
Folhas de plantas <i>in vitro</i>		64.4±1.8 ^c	2.5±0.07 ^a
Calos derivados de segmentos foliares	ESC	53±2.0 ^b	4.50±0.6 ^c
	LF	47±1.9 ^b	4.94±0.06 ^c
	LA	105±8.7 ^e	2.42±0.2 ^a
	LV	113±7.2 ^f	5.59±1.3 ^{cd}
	LB	108±1.12 ^e	2.48±0.005 ^a
	LM	166±9.9 ^g	2.75±0.09 ^a
Calos derivados de segmentos internodais	ESC	113±3.1 ^f	3.25±0.6 ^b
	LF	75±2.1 ^d	2.45±0.005 ^a
	LA	73±9.4 ^d	5.85±0.05 ^d
	LV	78±1.9 ^d	6.52±0.02 ^d
	LB	88±2.5 ^e	3.28±0.6 ^b
	LM	91±2.4 ^e	6.04±0.05 ^d
Calos derivados de segmentos nodais	ESC	111±0.8 ^f	3.27±0.01 ^b
	LF	41±2.1 ^a	6.20±0.005 ^d
	LA	44±4.4 ^a	2.54±0.005 ^a
	LV	43±0.5 ^a	3.70±0.005 ^b
	LB	68±2.5 ^d	3.88±0.005 ^b
	LM	49±2.3 ^b	2.65±0.005 ^a

Legenda: ESC – Escuro; LF- Luz fluorescente branca; LA- LED azul; LV- LED vermelho; LB- LED branco; LM- LED Misto (combinação de LEDs vermelho e azul).

4.4 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Os ensaios para determinação da atividade de enzimas antioxidantes foram realizados com extratos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* e de calos derivados de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com PIC a 41,4 µM sob diferentes qualidades de luz.

Não houve diferença estatística na atividade das enzimas SOD e CAT entre as amostras de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* (Figura 18 A-B). Por outro lado, a condição *in vitro*

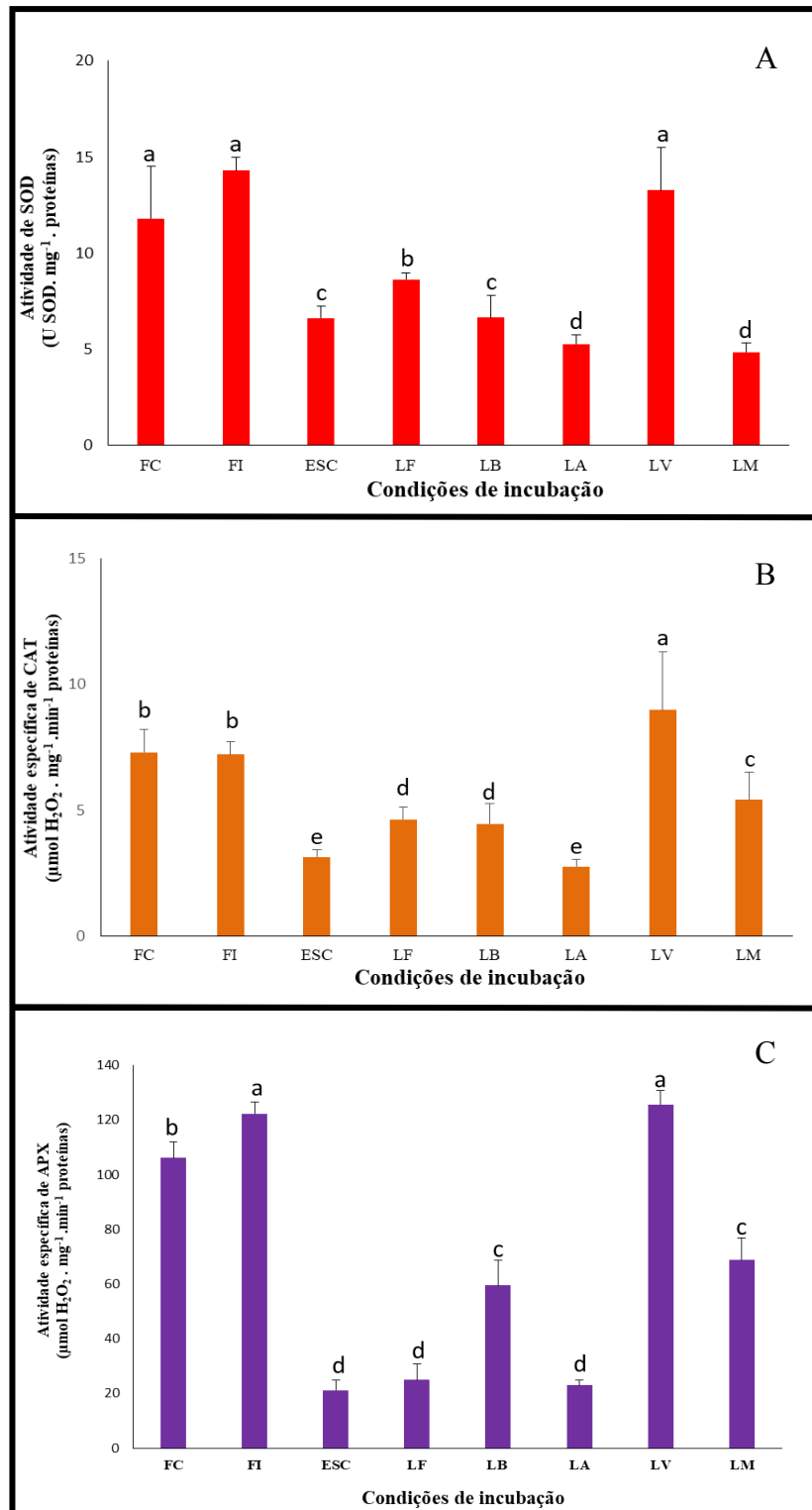
estimulou uma maior atividade da enzima APX em comparação com as folhas de plantas de campo (Figura 18 C).

Calos derivados de segmentos internodais mantidos sob LED vermelho apresentaram um aumento nas atividades das três enzimas estudadas (SOD, CAT e APX). Em calos mantidos sob LED misto, foi também observada alta atividade específica da enzima APX.

Não foi observada diferença significativa na atividade da SOD entre os calos incubados na ausência de luz ou sob LED branco (6,61 e 6,64 U SOD mg⁻¹ proteína, respectivamente). Além disso, atividade da SOD nos calos incubados sob LED misto mostrou-se inferior em relação à observada naqueles incubados sob as demais fontes de luz (4,83 U SOD mg⁻¹ proteína) (Figura 18 A).

A menor atividade da CAT foi observada nos calos mantidos no escuro e sob LED azul (3,13 e 2,75 μmol H₂O₂mg⁻¹min⁻¹ proteína, respectivamente) (Figura 18 B). Um resultado semelhante foi observado em relação à atividade da APX encontrada em calos incubados no escuro, sob luz fluorescente branca e sob LED azul (Figura 18 C).

Figura 18 – Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em calos derivados de segmentos internodais de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado incubados sob diferentes qualidades de luz.



Legenda: FC – Folhas de plantas *in vivo*; FI – folhas de plantas *in vitro*; ESC – Escuro; LF- Luz fluorescente branca; LV- LED vermelho; LA- LED azul; LM- LED Misto (vermelho + azul); LB- LED branco.

5 DISCUSSÃO

A resposta morfogênica pode ser influenciada por diferentes fatores, como tipo de explante, tipo e concentração dos reguladores de crescimento, meio de cultura e condições de incubação. Nesse contexto, o presente trabalho, teve como objetivo estudar a influência de alguns desses fatores na calogênese e na produção de substâncias bioativas em *P. setacea* cv. BRS Pérola do cerrado.

Apesar de muitos trabalhos com espécies de *Passiflora* utilizarem reguladores de crescimento como CIN, 2,4-D e BAP, isolados ou em combinação, para a indução de calos (ANTOGNONI et al., 2007; MACHADO et al., 2010; PAIM PINTO et al., 2011; SOZO, 2014; WOLFART, 2015; PERDOMO, 2016), o uso de PIC isoladamente (GARCIA et al., 2011; PACHECO et al., 2012) ou em combinação com CIN (CARVALHO et al., 2014) também já foi associado a elevadas taxas de calogênese. No geral, esses autores descrevem que os calos obtidos com PIC apresentam consistência friável e coloração esbranquiçada ou amarelada, similar ao observado com *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Segmentos caulinares e foliares utilizados neste trabalho apresentaram calogênese independente da concentração do fitorregulador e da condição de iluminação. No entanto, o tipo de explante foi a variável que mais influenciou a indução de calogênese, enquanto a condição de iluminação contribuiu mais fortemente para o acúmulo de biomassa.

A luz tem um efeito importante na morfogênese *in vitro*, uma vez que a densidade do fluxo de fótons e o comprimento de onda, assimilados através de fotorreceptores específicos, são capazes de influenciar o desenvolvimento celular e a biossíntese de metabólitos secundários (NHUT et al., 2015). Por essa razão, a influência da luz na resposta *in vitro*, inclusive na produção de calos, tem sido estudada em diversas espécies. Nesse estudo, o LED vermelho estimulou o crescimento e proliferação de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado em comparação com aqueles produzidos sob as demais condições de iluminação.

Resultados similares foram observados em *Cymbidium* em que a taxa de calogênese foi maior em resposta ao LED vermelho, embora a combinação de LEDs vermelho e azul tenha sido mais efetiva para a proliferação dos calos (HUAN; TANAKA, 2004). O LED vermelho também foi eficiente para a indução de calogênese em *Rhodiola imbricata* (KAPOOR et al., 2018), *Ocimum basilicum* (NADEEM et al., 2019) e *Gossypium hirsutum* (YU et al., 2019), enquanto a utilização de LED misto (vermelho + azul) foi considerada mais eficiente para a

multiplicação de calos de *Panax vietnamiensis* (NHUT et al., 2015) e *Oncidium* (CHUNG et al., 2010).

Neste trabalho, extratos de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, além de folhas de plantas mantidas *in vitro* e em condições naturais foram avaliados em relação aos seus perfis fitoquímicos e ao potencial antioxidante.

Com o objetivo de determinar o melhor procedimento para o estudo de flavonoides, foram avaliados dois métodos de extração, utilizando como material inicial folhas de plantas cultivadas *in vivo*. Os extratos preparados com etanol 90% utilizando ultrassom por 15 minutos apresentaram maior número de sinais em comparação aos extratos preparados com etanol 40% sob refluxo. Esses resultados estão provavelmente relacionados aos processos de hidratação e fragmentação induzidos pelo ultrassom, que são críticos para evitar a decomposição do soluto (TOMA et al., 2001). Além disso, esses sinais apresentam espectro de Uv característico de carotenoides e a presença deles nesses extratos pode estar associado aos maiores níveis de etanol utilizado no processo de extração, além da propagação de ondas ultrassônicas, que desorganizam a parede celular e causar vazamento do conteúdo celular (GUNATHILAKE et al., 2017; CASTAÑEDA-VALBUENA et al., 2021).

Portanto, considerando a eficiência da extração e o menor período de maceração necessário (15 minutos), o método de extração assistida por ultrassom foi escolhido para as análises fitoquímicas.

A análise qualitativa de extratos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro* realizada neste trabalho por CLAE-UV-IES-EM revelou perfis cromatográficos semelhantes, com a exceção de dois flavonoides, derivados de apigenina, detectados apenas em extratos de folhas de plantas micropropagadas. A modulação da produção de substâncias bioativas em sistemas *in vitro* também já foi observada em *Poliomintha glabrescens* (GARCÍA-PÉREZ et al., 2011), *Salvia dolomitica* (BASSOLINO et al. 2015), *Agave salmiana* (PUENTE-GARZA et al., 2017) e *Kaempferia parviflora* (PARK et al., 2021).

Dois flavonoides majoritários, vicenina-2 e schaftosideo, foram detectados nos extratos foliares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. Vicenina-2 já havia sido detectada em extratos de pericarpo de *P. edulis* (SENA et al., 2009; ZUCOLOTTO et al., 2009) e em folhas e polpas de frutos de *P. tripartita* (ZUCOLOTTO et al., 2011; SIMIRGIOTIS et al., 2013), enquanto o schaftosideo foi descrito como o principal constituinte de extratos de folhas de *P. incarnata* (ABOURASHED et al., 2002) e *P. mucronata* (DA SILVA et al., 2018). Os dois flavonoides estão associados a atividades sedativas, ansiolíticas e analgésicas (SAKALEM et al., 2012). Além disso, vicenina-2 foi relacionada a atividades antiplaquetária e anticoagulante

(LEE; BAE 2015), enquanto o schaftosideo foi recentemente relatado como eficaz contra o coronavírus SARS-CoV-2 (YALÇIN et al., 2021).

Flavonoides do tipo C-glicosídeos, o principal grupo encontrado no gênero *Passiflora* (OZAROWSKI; THIEM 2013; DHAWAN et al. 2004), também foram detectados nas análises cromatográficas dos extratos de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. Entre esses, isoorientina e tirosol-*O*-di-hexosídeo já foram descritos em diferentes espécies do gênero, incluindo *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. incarnata* e *P. capsularis*, tendo sido associados a atividades antioxidantes, antidepressivas, antimicrobianas e antivirais (OTIFY et al., 2015; FARAG et al., 2016; ALVES et al., 2020; TREMMEL et al., 2021). Entre as amostras de calos analisadas, foi observado um maior número de substâncias naquelas mantidas sob LED azul, sugerindo que a presença desses flavonoides pode estar associada a um maior estímulo da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), importante na via dos fenilpropanóides (HEO et al., 2012; HUCHÉ-THÉLIER et al., 2016), por essa condição de iluminação.

A análise fitoquímica de calos cultivados sob LED azul também revelou a presença dos ácidos graxos hidroxioctadecadienóico, linoleico e palmítico. Níveis significativos dos ácidos oleico e palmítico e um alto teor de ácido linoleico foram encontrados em sementes (LOPES et al., 2010) e partes aéreas de espécies de *Passiflora* (OTIFY et al., 2015; FARAG et al., 2016). A presença de ácidos graxos em calos de *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado é relatada pela primeira vez neste trabalho. Considerando o papel dos ácidos graxos no metabolismo vegetal (SAHAKYAN et al., 2010) e seu potencial hipoglicêmico (HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007), antibacteriano e antifúngico (SATI et al., 2017), sua produção em sistemas de culturas de calos e de células em suspensão é de grande interesse, uma vez que permitem a produção em larga escala dessas substâncias bioativas.

Outro aspecto estudado neste trabalho foi a avaliação do potencial antioxidante dos diferentes materiais obtidos *in vivo* e produzidos *in vitro* de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, realizada por meio dos ensaios de redução do radical DPPH e da atividade quelante dos íons de ferro. A capacidade antioxidante de extratos de diferentes materiais de espécies do gênero *Passiflora* tem sido bem documentada (SILVA et al. 2013; ALI et al. 2010; LUGATO et al., 2014) e já foi associada ao teor de substâncias fenólicas em *P. edulis* e *P. alata* (GOSMAN et al., 2011). Por outro lado, a atividade antioxidante de raízes adventícias de *P. pohlii* foi relacionada com a presença de saponinas (SIMÃO et al., 2016).

Neste trabalho, os extratos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado apresentaram baixa atividade antioxidante quando avaliados pelo ensaio do DPPH, variando o valor de CE₅₀ entre 64 e 166 g/L. Embora o potencial antioxidante de *P. setacea* não tenha sido observado pelo

ensaio do DPPH, estudos com outras espécies do gênero apresentaram resultados bem expressivos. Lugato et al. (2014) avaliaram a atividade de eliminação de radicais nos extratos de *Passiflora alata* e o maior potencial antioxidante foi observado nos extratos de folhas de plantas *in vivo* ($CE_{50} = 3,65 \text{ g / L}$). Por outro lado, extratos de raízes primárias de plantas *in vivo* de *P. pohlii* apresentaram um valor de CE_{50} menor ($0,18 \text{ g/L}$) (SIMÃO et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados em extratos de folhas *in vivo* de *P. flavicarpa* ($CE_{50} = 0,04 \text{ g/L}$) (SAPTARINI et al., 2013).

Ao contrário dos resultados obtidos por meio ensaio de captura do radical DPPH, os extratos avaliados neste trabalho apresentaram alta capacidade de quelar íons de ferro, com valores de CE_{50} consideravelmente mais baixos ($1,9$ e $6,5 \text{ g/L}$). Resultados semelhantes foram observados em extratos de folhas e frutos de *P. subpeltata* (SARAVANAN et al., 2014; SHANMUGAM et al., 2018), e de folhas de *P. leschenaultia* (SHANMUGAM et al., 2019), assim como em extratos de raiz e rizoma de *Nardostachys chinensis* e *Valeriana officinalis* (WANG et al., 2010a), extratos de raiz de *Periploca sepium* (WANG et al., 2010b) e extratos de *Brassica oleracea* L. (KÖKSAL; GÜLÇİN, 2008). Esses resultados evidenciam a importância da avaliação do potencial antioxidante de uma determinada amostra vegetal por meio de diferentes ensaios, já que as substâncias presentes nos extratos podem apresentar mecanismos de ação distintos, podendo doar átomos de hidrogênio ou elétrons a um radical livre (REISCHE et al., 2002) ou formar complexos com íons metálicos, especialmente ferro e cobre (MAISUTHISAKUL et al., 2008).

As atividades das enzimas SOD, CAT e APX também foram avaliadas, uma vez que refletem as respostas ao estresse oxidativo, desempenhando um papel importante nos complexos mecanismos de eliminação de ERO (REISCHE et al., 2002).

Em relação aos extratos foliares, apesar de não terem sido observadas diferenças nas atividades de SOD e CAT em folhas de plantas mantidas *in vivo* ou *in vitro*, foi evidenciado um aumento significativo na atividade da APX em folhas de plantas micropropagadas. Esses resultados podem refletir as condições estressantes impostas pelo ambiente *in vitro*, que levaram ao aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e, portanto, da atividade da enzima APX visando à sua degradação. Além disso, considerando que a APX é a única enzima responsável por manter baixos os níveis de peróxido de hidrogênio nos cloroplastos, é possível que sua maior atividade em relação à CAT, esteja associada a danos específicos ao aparato fotossintético induzidos pelas condições *in vitro* (APEL; HIRT 2004; ŠKODOVÁ-SVERÁKOVÁ et al., 2020).

Entre os calos derivados de segmentos internodais, foi observado um aumento nas atividades de SOD, CAT e APX somente naqueles mantidos sob LED vermelho, sugerindo que houve uma maior produção de ERO nestes materiais, possivelmente em resposta a um maior estresse oxidativo. Como a manutenção das culturas sob essa qualidade de luz não foi prejudicial para a indução e multiplicação dos calos, é possível que tenha havido um equilíbrio entre a produção e eliminação de ERO. De acordo com Gupta e Sahoo (2015), sistemas de iluminação com o uso de LEDs podem induzir diferentes níveis de estresse fotooxidativo e, conseqüentemente, alterações nas defesas antioxidantes celulares. Vários estudos também descreveram a influência de diferentes tipos de LED no sistema antioxidante enzimático. Por exemplo, em *Camptotheca acuminata*, o LED azul aumentou a atividade de SOD e CAT (YU et al., 2017), enquanto em *Rehmannia glutinosa*, os LED vermelho e azul provocaram maiores atividades de APX, SOD e CAT, quando comparados às culturas mantidas sob lâmpadas fluorescentes brancas (MANIVANNAN et al., 2015). Em *Curculigo orchioides*, houve um aumento na atividade de SOD quando as culturas foram incubadas em LED vermelho e um aumento de CAT e APX em resposta ao LED azul (GUPTA; SAHOO, 2015).

O conjunto de dados obtidos neste trabalho demonstra a influência da condição de iluminação na morfogênese e na produção de substâncias bioativas em *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. Adicionalmente, a ação dos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático pode servir de base tanto para o uso farmacológico desta cultivar, como para constituir um modelo de estudo de estresse oxidativo *in vitro*.

CONCLUSÕES

- ✓ A eficiência da calogênese e o acúmulo de biomassa foram influenciados principalmente pela utilização do LED vermelho em comparação com as demais condições de iluminação testadas;
- ✓ As análises cromatográficas evidenciaram a presença de flavonoides nos extratos de folhas. Entretanto, plantas *in vitro* apresentaram três tipos que não foram encontrados no material obtido em condições naturais (Luteonina-7-O-dirhamnosideo 3'-O-glicosídeo, Apigenina-6-C-glicosídeo-7-O-glicosídeo e Apigenina-8-C-glicosídeo-7-O-glicosídeo), indicando a possibilidade de produção biotecnológica de flavonoides;
- ✓ A qualidade de luz promoveu um efeito modulatório na produção de metabólitos secundários em culturas de calos. A manutenção dos calos sob o LED azul induziu a biossíntese de ácidos graxos e de flavonoides com potencial de uso nas indústrias farmacêutica e cosmética.
- ✓ Os extratos dos diferentes materiais analisados apresentaram potencial antioxidante por habilidade quelante de Fe^{+2} e baixa atividade antioxidante por captura do radical DPPH, evidenciando a importância de utilizar ensaios distintos para avaliar a capacidade antioxidante por diferentes mecanismos de ação e complementares para acessar o potencial antioxidante de substâncias bioativas;
- ✓ As folhas de plantas micropropagadas apresentaram um aumento significativo na atividade de APX em relação as folhas de plantas *in vivo*, evidenciando as condições estressantes impostas pelo ambiente *in vitro*. A incubação de calos sob LED vermelho aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX, provavelmente como resposta ao elevado estresse fotooxidativo causado por este comprimento de onda.

PERSPECTIVAS

- Determinar as variações nos conteúdos de proteínas, nos calos provenientes dos diferentes tipos de LED testados;
- Desenvolver culturas de células em suspensão de calos obtidos;
- Avaliar atividades biológicas (antibacteriana e anti-inflamatória) de extratos dos materiais obtidos em condições naturais e *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. High-Speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n.2, p. 81-91, 2002.
- AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 154, p. 51-56, 2016.
- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M.E.; SILVA, J.A.T. Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, p. 343-351, 2014.
- ALBINO, B.E.S. **Embriogênese somática e calogênese em explantes radiculares de *Passiflora morifolia* masters (passifloraceae), caracterização morfoanatômica e fitoquímica, análise da atividade antioxidante e expressão do gene SERK**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias (Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.
- 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.
- ALVARENGA, I.C.A.; PACHECO, F.V.; SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 299-308, 2015.
- ALVES, J.; MARQUES, J.; DEMARQUE, D.; COSTA, L.; AMARAL, J.; LOPES, N.; SILVA-JÚNIOR, A.; SOARES, L.; GAVIOLI, E.; FERREIRA, L.; ZUCOLOTTI, S. Involvement of isoorientin in the antidepressant bioactivity of a flavonoid-rich extract from *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 1-11, 2020.
- AMUGUNE, N.O.; GOPALAN, H.N.B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, n. 1, p. 99-104, 1993.
- ANAND, S.P., JAYAKUMAR, E., JEYACHANDRAN, R., NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, n. 22, p. 87-91, 2012.
- ANDRADE, H.B.; BRAGA, A.F.; BERTOLUCCI, S.K.V.; DE HSIE, B.S.; SILVA, S.T., PINTO, J.E.B.P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. **Acta Horticulture**, v. 1155, p. 277-284, 2017.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Documento **Embrapa Cerrados**, Planaltina, ISSN 1517-5111, p. 16, 2002.
- ANTHONY, P., OTONI, W., POWER, J.B., LOWE, K.C.; DAVEY, M.R. Protoplasts isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. **Methods in Molecular Biology**, n. 111, p. 169-181, 1999.
- 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.

- ANTONIAZZI, C. A., FARIA, R. B., CARVALHO, P. P., MIKOVSKI, A. I., CARVALHO, I. F., MATOS, E. M., REIS, A. C., VICCINI, L. F., PAIM PINTO, D. L., ROCHA, D. I., OTONI, W. C.; SILVA, M. L. *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 408-415, 2018.
- APPEZATO-DA-GLORIA, B., VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical Studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, n. 34, p. 2007-2013, 1999.
- ARAUJO, M.H.; SILVA, I.C.V.; OLIVEIRA, P.F.; BARRETO, A.R.R.; KONNO, T.U.P.; ESTEVES, F.A.; BARTH, T.; AGUIAR, F.A.; LOPES, P.L.; DERMENJIAN, R.K.; GUIMARÃES, D.O.; LEAL, I.C.R.; LASUNSKAIA, E.B.; MUZITANO, M.F. Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian resting. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 702-710, 2017.
- ARENA, C.; TSONEV, T.; DONEVA, D.; DE MICCO, V.; MICHELOZZI, M.; BRUNETTIE, C.; CENTRITTO, M.; FINESCHI, S.; VELIKOVA, V.; LORETO, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 122-132, 2016.
- ARUNG, E. T.; KASUMA, I. W.; CHRISTY E.O.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Evaluation of medicinal plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis. **The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer**, v. 63, p. 473-480, 2009.
- ASADUJJAMAN, M.D.; MISHUK, A.U.; HOSSAIN, M.D.A.; KARMAKAR, U.K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of Integrative Medicine**, v.12, n.2, 2014.
- ASAKUMA, H.; CHIJIWA, H.; SHIRAIISHI, M. Effective scion propagation using light-emitting diode irradiation for nursey stock production in *Japanese persimmon*. **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 232-238, 2018.
- ASANDE, L. K.; OMBORI, O.; NYABOGA, E. N.; ODUOR, R. O. Efficient shoot organogenesis using leaf disc and nodal explants of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) and genetic fidelity assessment using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) Markers. **International Journal of Agronomy**, ID3205710, 2020.
- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, B.; ASLAN, E.; YUKSEL, M.U. *Passiflora incarnate* Linneaus as an anxiolytic before spinal anesthesia. **Journal of Anesthesia**, v. 26, n.1, p. 39-44, 2012.
- AVANCI, N.C.; LUCHE, D.D.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S. Jasmonates are phytohormones with multiple funtions, including plant defense and reproduction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 9, p. 484-505, 2010.
- AYDIN, M.; POUR, A.H.; HALILOĞLU, K.; TOSUN, M. Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat. **Turkish Journal of Biology**, n. 40, p. 1178-1184, 2016.
- AYDIN, Y.; TALAS-OGRAS, T.; ZELIHA IPEKÇI-ALTAS, Z.; GÖZÜKIRMIZI, N. Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis. **Biologia**, v. 61, p. 289–293, 2006.

- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.
- AZPEITIA, A.; CHAN, J.L.; SAENZ, L.; OROPEZA, C. Effect of 22(S), 23(S) homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, p. 591–596, 2003.
- BANDARA, K. R. V.; PADUMADASA, C.; PEIRIS, D. C. Potent antibacterial, antioxidant and toxic activities of extracts from *Passiflora suberosa* L. leaves. **PeerJ**, v. 6, p. e4804, 2018.
- BARBALHO, S. M.; DAMASCENO, D.C.; SPADA, A.P.M.; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A. C.; GUIGER, E. L.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA, M.; MENDES, C.G. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rat offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.12, p. 1490-1495, 2011.
- BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; VILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n3, p.453-460, 2014.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASSOLINO, L.; GIACOMELLI, E.; GIOVANELLI, S.; PISTELLI, L.; CASSETTI, A.; DAMONTE, G.; RUFFONI, B. Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n.1, p. 83-95, 2015.
- BATISTA, D.S.; CASTRO, K.M.; SILVA, A.R.; TEIXEIRA, M.L.; SALES, T.A.; SOARES, L.I.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenacea). **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, n. 52, p. 276-282, 2016.
- BATISTA, D.S.; FELIPE, S.H.S.; SILVA, T.D.; CASTRO, K.M.; MAMEDES-RODRIGUES, T.C.; MIRANDA, N.A.; RÍOS-RÍOS, A.M.; FARIA, D.V.; FORTINI, E.A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBA, A.D.; OTONI, W.C. Light quality in plant tissue culture: does it matter?. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, n.54, p.195-215, 2018.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GONGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v.79, p. 87-90, 2004.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R. da S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Fábio G. Faleiro; Nilton T. V. Junqueira; Marcelo F. Braga. (Org.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. 1 ed. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, p. 559 -586, 2005.
- BEZERRA, R.M.F; ALOUFA, M.A.I; FREIRE, F.A.M; SANTOS, D.D. Efeito de 6-benzilamino purina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.5, p.771-778, 2014.

- BHATIA, S. Application of Plant Biotechnology in Modern Applications of Plant **Biotechnology in Pharmaceutical** chapter 5, 2015.
- BIASI, L.A., FALCO, M.C., RODRIGUEZ, A.P.M., MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. **Scientia Agricola**, v.57, p. 661-665, 2000.
- BILLORE, V.; JAIN, M.; SUPRASANNA, P. Monochromic radiation through light-emitting diode (LED) positively augments *in vitro* shoot regeneration in Orchid (*Dendrobium sonia*). **Canadian Journal Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 50–58, 2017.
- 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.
- BORGES, J.D.; TONON, D.S.; SILVA, D.J. Produção e comercialização do maracujá-azedo em tangará da serra – MT, Brasil: desafios, fragilidades e oportunidades. **Revista Ibero-Americana de Ciências ambientais**, v.10, n.2, 2019.
- BRAGA, C.S; RODRIGUES, D.V.; BISPO, R.B.; GÖTTER, V.; MARTINS, K.C.; SOUZA, S.A.M. Caracterização e diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com base em características físicas e químicas dos frutos. **Revista Ciências Agroambientais**, v.15, n.2, 2017.
- BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.; DIGNART, S.L.; BIAGIOTTI, G.; PORTO, J.M.P. Quality of light on the *in vitro* culture of *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: morphophysiological characteristics. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.
- BRAGA, M. F.; SANTOS, E.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, A.A.T.C.; FALEIRO, F.G.; REZENDE, L.N.; JUNQUEIRA, K.P. Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de *Passiflora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2. p.284-288, 2006.
- 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.
- BRIGGS, W.R.; CHRISTIE, J.M. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. **Trends in Plants Science**, v. 7, p. 204-210, 2002.
- BUCKSETH, T., SINGH, R.K., SHARMA, A., SHARMA, S., MOUDGIL, V. & SARASWATI, A. Influence of node number and orientation of Explants on *in vitro* growth and development of Potato. **The Japan Mendel Society Cytologia**, v. 83, n.1, p. 19–22, 2018.
- BURBULIS, N.; BLINSTRUBIENĖ, A.; PETRUŠKEVIČIUS, A. *In vitro* propagation of *Passiflora edulis* through internodal segments as affected by medium composition. **Žemdirbystė= Agriculture. Akademija (Kėdainių r.)**, t. 108, n. 4, 2021.
- BUSILACCHI, H.; SEVERIN, C.; GATTUSO, M.; AGUIRRE, A.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S. Field Culture of Micropropagated *Passiflora caerulea* L. Histological and Chemical Studies. **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v.7, n.5, p. 257-263, 2008.
- CASTAÑEDA-VALBUENA, D.; AYORA-TALAVERA, T.; LUJÁN-HIDALGO, C.; ÁLVAREZ- GUTIÉRREZ, P.; MARTÍNEZ-GALERO, N.; MEZA-GORDILLO, R. Ultrasound extraction conditions effect on antioxidant capacity of mango by product extracts. **Food and Bioproducts Processing**, v.127, pp. 212-224, 2021.

- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol Letters**, v. 32, n. 9, pp. 1199-1205, 2010.
- CARVALHO, L.M.; COSTA, J.A.M.; CARNELOSSI, M.A.G. Qualidade em plantas medicinais. Documentos 162, **EMBRAPA** Tabuleiros Costeiros, Aracaju- SE, 2010.
- CARVALHO, M.A.F.; PAIVA, R.; HERRERA, R.C.; ALVES, E.; CASTRO, E.M.D.; PAIVA, P.D.D.O.; VARGAS, D.P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**, v.62, n.4. p.340-346, 2015.
- _____; STEIN, V.C.; HERRERA, R.C.; PORTO, J.M.P.; VARGAS, D.P.; ALVES, E. Induction and morpho-ultrastructural analysis of organogenic calli of a wild passionfruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 851–859, 2014.
- CARVALHO, P. P.; ANTONIAZZI, C. A.; FARIA, R. B.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D.I.; SILVA, M. L. *In vitro* organogenesis from root explants of *Passiflora miniata* Mast., an Amazonian species with ornamental potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (online), v. 62, p. e19170803, 2019.
- _____; SILVA, N.T.; MIKOSVKI, A.I.; CARVALHO, I.F.; CARVALHO, M.L.S. Regeneração *in vitro* de *Passiflora miniata* Mast. **Ornamental Horticulture** (Campinas), v. 23, n. 1, p. 88-95, 2017.
- CARVALHO, V.; NETO, A.A.C. Espécies reativas de oxigênio em plantas. In VI Botânica no Inverno 2016/Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da **Universidade de São Paulo**, Departamento de Botânica, p. 223, cap.18, 2016.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal Molecular Sciences**, v15, p. 14122-14152, 2014.
- 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. **Revista Brasileira de Farmognosia**, v.19, n. 4, p. 860-864, 2009.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. Bioquímica ilustrada, 4º ed, **Porto Alegre: Artmed**, p. 533, 2008.
- CHANG, H.S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, J.; PAEK, Y. Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 39, n. 2, p. 129-134, 2003.
- CHEN, C. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian ‘V3’. **Science Horticulture**, v. 191, p. 25–30, 2015.
- CHEN, C. C.; LEE, M. R.; WU, C. R.; KE, H. J.; XIE, H. M.; TSAY, H. S.; CHANG, H. C. LED lights affecting morphogenesis and isosteroidal alkaloid contents in *Fritillaria cirrhosa* D. Don—an important **Chinese medicinal herb**. **Plants**, v.9, n. 10, 1351, 2020.
- _____; AGRAWAL, D.C.; LEE, M-R.; LEE, R-J.; KUO, C-L.; WU, C-R.; TSAY, H-S.; CHANG, H-C. Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC-MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb.: A medicinal herb. **Botanical Studies**, v.57, n. 9, 2016.

- _____; HUANG, M-Y.; LIN, K-H.; WONG, S-L.; HUANG, W-D.; YANG, C-M. Effects of light quality on the growth, development and metabolism of rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Research Journal of Biotechnology**, v. 9 n. 4, p. 15-24, 2014.
- CHEN, L.; YANG, Y.; JIANG, Y.; ZHAO, J.; ZANG, H.; WANG, X.; HU, Y.; XUE, X. RNA-Seq analysis reveals differential responses of Potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets cultured *in vitro* to red, blue, green, and white light-emitting diodes (LEDs). **Journal of Plant Growth Regulation**, v.38, n. 1, p. 1-16, 2019.
- CHEW, Y. L.; GOH, J.K.; LIM, Y.Y. 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.
- CHONE, R.M.S.; ROCHA, D.I.; MONTE-BELLO, C.C.; PINHEIRO, H.P.; DORNELAS, M.C.; HADDAD, C.R.B.; ALMEIDA, J.A.S. (2018). Brassinosteroid increases the cytokinin efficiency to induce direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Coffea arabica* L.(Rubiaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 135(1), 63-71.
- CHUNG, J.P.; HUANG, C.Y.; DAI, T.E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Scientia Horticulturae**, v.124, n.4, p.511-516, 2010.
- CID, L. P. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cultivo *in vitro* de plantas. 1. ed. **Brasília**, cap. 1, p. 15-43, 2010.
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ZUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWLOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.132, p. 433-447, 2018.
- COELHO, E.M.; AZÊVEDO, L.C.; UMSZA-GUEZ, M.A. Fruto do maracujá: importância econômica e industrial, produção, subprodutos e prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 9, n. 3, p.347-361, 2016.
- CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.M.; HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I.C.F.R. The past decade find ingrelated with nutricional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (*passion fruit*). **Trend in Food Science & Technology**, v. 58, p. 79-95, 2016.
- COSTA, A.M.; LIMA, H.C.; CARDOSO, E.R.; SILVA, J.R.; PADUA, J.G.; FALEIRO, F.G. PEREIRA, R.C.A.; CAMPOS, G.A. Produção de mudas de maracujazeiro silvestre (*Passiflora setacea*). Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 6p. (Comunicado Técnico, 176), 2015.
- COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. Methods of the antioxidant defense: A Literature Review. **Journal of Health Sciences**, v.15, n. 3, p. 231-7, 2013.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. © 2000, **American Society of Plant Physiologists**. Chapter 24, 2000.
- CUNHA, M. A. P. (Ed.). Maracujá: produção e qualidade na pascicultura. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, cap. 1, p.15-35, 2004.
- DA SILVA, I.C.V.; KALUĐEROVIĆ, G.N.; DE OLIVEIRA, P.F.; GUIMARÃES, D.O.; QUARESMA, C.H.; PORZEL, A.; MUZITANO, M.F.; WESSJOHANN, L.A.; LEAL, I.C.R. Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an

enriched flavonoid extract from *Passiflora mucronata*. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.18, n. 10; p. 1405-1416, 2018.

DA SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; PASSOS, A. B.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ROSSI, A. A. B.; KRAUSE, W.; OTONI, W. C. Novel and efficient transformation of wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) using sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.57, n. 3, p. 380-386, 2021.

DE CARVALHO, R. V.; FALEIRO, F. G.; DA SILVA OLIVEIRA, J.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M.; PÁDUA, J. G. Armazenamento de sementes de *Passiflora alata*, *Passiflora cincinnata* e *Passiflora setacea* em embalagens aluminizadas à temperatura ambiente. **Magistra**, v. 29, n. 2, pp. 154-160, 2018.

DE FARIA, R.B.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.A.B.; MATOS, E.M.; ROCHA, D.I.; PINTO, D.L.P.; OTONI, W.C.; SILVA, M.L. 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, p. 166-174, 2018.

DE HSIE, B.S.; BUENO, A.I.S.; BERTOLUCCI, S.K.V.; DE CARVALHO, A.A.; DA CUNHA, S.H.B.; MARTINS, E.R.; PINTO, J.E.B.P. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **Journal of Photochemistry Photobiology B**, v.198, 111577, 2019.

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.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DEO, P.C.; TYAGI, A.P.; TAYLOR, M.; HARDING, R.; BECKER, D. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific **Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 28, n. 1, p. 27-40, 2010.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products – A biosynthetic approach. Third edition. John Wiley and Sons. **West Sussex**. UK, 2009.

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

_____; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative anxiolytic activity profile of various Preparations of *Passiflora incarnata* Linnaeus: A Comment on Medicinal Plants Standardization. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 3, p. 283–291, 2002.

DIAS, L.L.C.; RIBEIRO, D. M.; CATARINA, C. S.; BARROS, R. S.; FLOH, E. I. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant of Growth Regulation** (Print), v. 62, p. 9-19, 2010.

_____; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D.M.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, v. 99, p. 199-208, 2009.

- 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.
- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 2, p. 211-217, 1994.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1991.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygens species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, cap. 9, p.178-203, 2011.
- EDESI, J.; PIRTTILÄ, A.M.; HÄGGMAN, H. Modified light spectral conditions prior to cryopreservation alter growth characteristics and cryopreservation success of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 409-421, 2017.
- EL-DAWAYATI, M.M.; GHAZZAWY, H.S.; MUNIR, M. Somatic embryogenesis enhancement of date palm cultivar Sewi using different types of polyamines and glutamine amino acid concentration under *in-vitro* solid and liquid media conditions. **Internacional Journal of Biosciences**, v.12, n.1, p. 149-159, 2018.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. BRS Pérola do Cerrado, Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento industrial, ornamental e funcional. Folder. 2013. **Embrapa Cerrados**. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoperola/foldertecnico.pdf>. Acesso em 21 de fevereiro 2019.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Lançamento da cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2015. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/lancamentoperola>. Acesso em: 19 de janeiro de 2019.
- 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**, v. 1, 677, 2005.
- _____; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.41, n. 2, e-155, 2019.
- _____; JESUS, O.N.; COSTA, A.M. Avanços e perspectivas do melhoramento genético de *Passifloras* no Brasil. In MORERA, M. P., COSTA, A. M., FALEIRO, F. G., CARLOSAMA, A. R.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. **ProImpress**, Brasília, cap. 5, pp. 85-95, 2018.
- _____; SANTOS, F.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. Registros e proteção de cultivares de Maracujá. In MORERA, M. P., COSTA, A. M., FALEIRO, F. G., CARLOSAMA, A. R.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. **ProImpress**, Brasília, cap. 4, pp. 71-81, 2018.

- FARAG, M.A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C.G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L.A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 3125-3143, 2016.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997.
- FARIA, R.B.; DE CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.A.B.; MATOS, E.M.; ROCHA, D.I.; PAIM PINTO, D.L.; OTONI, W.C.; SILVA, M.L. 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, p. 166-174, 2018.
- FERNANDES, C.F.; JÚNIOR, J.R.V.; SILVA, D.S.G.; ALVES, R.C. Estresse oxidativo e o mecanismo de defesa de plantas contra patógenos. Porto Velho, RO: **Embrapa Rondônia**, 11 p. – (Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0103-9865, p. 157, 2013.
- FERREIRA, D.A.T.; SATTLER, M.C.; CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. Embryogenic potential of immature zygotic embryos of *Passiflora*: a new advance for *in vitro* propagation without plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 629-638, 2015.
- FERREIRA, G. **Estudo da embebição e efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloráceas**. Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista, 146p, 1998.
- FERREIRA, L.T.; SILVA, M.M.A.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, tissue and organ culture**, v. 128, p. 211-221, 2017.
- FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; GUZZO, F.; LEVI, M. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnology Letters**, v.30, p. 2031-3036, 2008.
- FRAGA, H.P.F.; VIEIRA, L.N.; PUTTKAMMER, C.C.; OLIVEIRA, E.M.; GUERRA, M.P. Time-lapse cell tracking reveals morphohistological features in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. **Trees** 29, p. 1613-1623, 2015.
- FREIRE, V.; SILVA, G.; YARIWAKE, J. Targeted-Analysis of β -Carboline Alkaloids in Passionfruit (Maracujá) by SBSE(PDMS)-LC/Flu and UHPLC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 775-781, 2017.
- FREITAG, Â. S.; NERY, F. U., ROSSI, F. R.; GONÇALVES, A. N. Estudo comparativo entre dois meios de cultura para *Corymbia citriodora in vitro*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 2, p. 347-354, 2012.
- FREITAS, L.B. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 41-47, 2011.
- FRYE, A.; HAUSTEIN, C. Extraction, Identification, and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of *Passiflora*. **American Journal of Undergraduate Research**, v.6, n.3, 2007.
- 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 Farmagnosia**, n.18, v. 4, p. 627-641, 2008.

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, p. 47-54, 2011b.

_____; VIANNA, M. G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.? slow growth storage and cryopreservation. **Cryo-Letters**, v. 32, p. 377-388, 2011a.

GAZOLA, A. C.; COSTA, G.M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F.A.; REGINATTO, F.H.; LIMA, T.C.M.; SCHENKEL, E.P. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 158-163, 2015.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G-J. Plant propagation by tissue culture rev.1: The background. **Dordrecht: Springer**, 501 p. 2008.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxido dismutases: I. Ocorrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GÓRECKA, K.; KISZCZAK, W.; KRZYŻANOWSKA, D.; KOWALSKA, U.; KAPUŚCIŃSKA, A. Effect of polyamines on *in-vitro* anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 38, p. 593-600, 2014.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L.N.; RATES, S.M.K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.

GUIMARÃES, T.G.; DIANESE, A.C.; OLIVEIRA, C.M.; MADALENA, J.O.M.; FALEIRO, F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; LIMA, H.C.; CAMPOS, G.A. Recomendações Técnicas para o Cultivo de *Passiflora setaceae* BRS Pérola do Cerrado. Comunicado técnico 174, ISSN 1517-1469, **Embrapa Cerrados**, Planaltina, DF Maio, 2013.

GUNATHILAKE, K.D.P.; RANAWEERA, K.K.D.S.; RUPASINGHE, H.P.V. Optimization of phenolics and carotenoids extraction from leaves of *Passiflora edulis* using response surface methods. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, v. 1, n.1, pp 1-12, 2017.

GUPTA, R. K.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A. K.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. inspreptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n.3, p. 801-806, 2012.

GUPTA, S. D.; KUMAR, A.; AGARWAL, A. Impact of light-emitting diodes (LEDs) on the growth and morphogenesis of encapsulated shoot buds of *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal herb. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 4, p. 1-12, 2019.

_____; SAHOO, T.K. Light emitting diode (LED)- induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. **Acta Physiologiae Plantarum**, 37:233, 2015.

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, v.6, n.1, p.108-113, 2004.

- HAQUE, S.M., NAHAR, S.J. & SHIMASAKI, K. Effect of Light Quality, Sucrose and Trehalose on *in vitro* organogenesis of *Cymbidium devonianum* (Lindl.). **Notulae Scientia Biologicae**, v.9, n. 1, p.89-93, 2017.
- HASHIM, M.; AHMAD, B.; DROUET, S.; HANO, C.; ABBASI, B. H.; ANJUM, S. Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants *in vitro* cultures. **Plants**, v. 10, n.8, 1521, 2021.
- HAVIR, E.; MCHALE, N. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HEGAZY, A.E.; ABOSHAMA, H.M. An efficient novel pathway discovered in date palm micropropagation. **Acta Horticulturae**, n. 882, 167-176, 2010.
- HEO, J-W.; KANG, D-H.; BANG, H-S.; HONG, S-G.; CHUN, C-H.; KANG, K-K. Early growth, pigmentation, protein content, and phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuces grown under different lighting conditions. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, 30:6–12, 2012.
- HERNÁNDEZ-GALICIA, E.; CALZADA, F.; ROMAN-RAMOS, R.; ALARCÓN-AGUILAR, F.J. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: Isolation and hypoglycemic activity. **Planta Med**, v. 73, p. 236-240, 2007.
- HUAN, L.V.T.; TANAKA, M. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. **Environment Control in Biology**, v.42, p.57-64, 2004.
- HUCHÉ-THÉLIER, L.; CRESPEL, L.; LE GOURRIEREC, J.; MOREL, P.; SAKR, S.; LEDUC, N. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v.121, p. 22–38, 2016.
- HUI, X.; YAN-NAN, F.; TIAN-LAI, L.; RUI, W. Effects of different LED light wavelengths on the resistance of tomato against *Botrytis cinerea* and the corresponding physiological mechanisms. **Journal of Integrative Agriculture**, 15(0): 60345-7, 2016.
- HUNG, C.D.; HONG, C-H.; KIM, S-K.; LEE, K-H.; PARK, J-Y.; NAM, M-W.; CHOI, D-H.; LEE, H-I. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.38, n.6, p.1-9, 2016.
- IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2019. In Embrapa Mandioca e Fruticultura, disponível em http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf. Acesso em 04 de janeiro de 2022.
- ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Science Horticulture**, n. 99, p. 395-400, 2004.
- JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P.T.B.; COSTA, S.S.; GONÇALVES, C.Q.B.; BRANDÃO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **ACTA Amazônica**, n.40, v. 2, p. 275-280, 2010.
- JEONG, B.R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v.236, p. 222-228, 2018.
- JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91–110, 2005.

- JUNG, W. S.; CHUNG, I. M.; HWANG, M. H.; KIM, S. H.; YU, C. Y.; GHIMIRE, B. K. Application of Light-Emitting Diodes for improving the nutritional quality and bioactive compound levels of some crops and medicinal plants. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1477, 2021.
- JUNQUEIRA, N. T. V. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.V.; BRAGA, M. F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: **Embrapa Cerrados**, p.80-108, 2005.
- KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n.3, p. 337-339, 1990.
- KAPOOR, S.; RAGHUVANSHI, R.; BHARDWAJ, P.; SOOD, H., SAXENA, S.; CHAURASIA, O.P. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. **Journal of photochemistry & Photobiology**, v. 183, p. 258-265, 2018.
- KARATAS, M.; AASIM, M.; DAZKIRILI, M. Efficacy of Light Emitting diodes (LEDs) Lighting System for *in vitro* Shoot Regeneration of Medicinal Water hyssop (*Bacopa monnieri* L. PENNEL). **Romanian Biotechnological Letters**, v.23, n. 1, 2017.
- KASHYAP, S.; KAPOOR, N.; KALE, R.D. *Coscinium fenestratum*: callus and suspension cell culture of the endangered medicinal plant using vermicompost extract and coelomic fluid as plant tissue culture media. **American Journal of Plant Sciences**, n.7, p. 899-906, 2016.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 281-284, 1995.
- KHAS, E.M.; ABBASIFAR, A.; VALIZADEHKAJI, B. Optimization of *in vitro* propagation of purple passion fruit (*Passiflora edulis*), an important medicinal and ornamental plant. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v.7, n.3, 305-314, 2020.
- KHATER, M.A.; SHALABY, M.A.F.; Wafa, H.A. Physio - genetic gain in increasing alkaloids production of *Datura stramonium* L. via cell suspension culture. **Middle East Journal of Agriculture**, v. 07, p.154-16, 2018.
- KIM, D.S.; KIM, S.Y.; JEONG, I.Y.; KIM, J.B.; LEE, G.; KANG, S.Y.; KIM, W. Improvement of ginsenoside production by *Panax ginseng* adventitious roots induced by γ -irradiation. **Biologia Plantarum**, vol. 53, n.3, p. 408-414, 2009.
- KIM, Y-H.; KHAN, A.L.; WAQAS, M.; LEE, I-J. Silicon regulates antioxidant activities of Crop Plants under abiotic-induced oxidative stress: A Review. **Frontiers in Plant Science**, 2017.
- KOCH, A.K; SILVA, J.B.F; CARDOSO, A.L.R; MEZZONATO-PIRES, A.C; TEIXEIRA, L.O.A.; ENGELS M.E.; ARAÚJO-SILVA, L. E. *Passiflora* of the Brazilian Amazon. **Guia de Campo**, 1341, 2021. Disponível em: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/>.
- KOHL, A. P. N.; DUARTE, A. R. Superação de dormência nas sementes de *Passiflora setacea* cv. BRS pérola do cerrado com diferentes tipos de tratamentos. **Humanidades e Tecnologia** (finom), v. 16, n. 1, pp. 494-506, 2019.
- KUBICA, P.; SZOPA, A.; PROKOPIUK, B.; KOMSTA, Ł.; PAWŁOWSKA, B.; EKIERT, H. The influence of light quality on the production of bioactive metabolites—verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids and the content of photosynthetic pigments in biomass of

Verbena officinalis L. cultured *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, 111768, 2020.

KUKULA-KOCH, W.A.; WIDELSKI, J. Alkaloids. **Pharmacognosy, Fundamentals, Applications and Strategies**, cap. 9, p. 163-198, 2017.

KWON, A-R.; OH, M-M.; PAEK, K-Y.; PARK, S-Y. The effect of light quality on growth and endopolyploidy occurrence of *in vitro*-grown Phalaenopsis ‘Spring Dancer’. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 59, p. 179–188, 2018.

LANDI, M.; ZIVCAK, M.; SYTAR, O.; BRESTIC, M.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1861(2), 148131, 2020.

LAZZARINI, L.E.S.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CARVALHO, A.A.; SANTIAGO, A.C.; PACHECO, F.V.; YUCESAN, B.; PINTO, J.E.B.P. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 33-43, 2019.

_____; PACHECO, F.V.; SANTOS, J.; SILVA, S.T.; CARVALHO, A.A.; PINTO, J.E.B.P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, p. 367–379, 2018.

LEAL, A.E.B.P.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.G.; OLIVEIRA, A.P.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T. Atividade ansiolítica e sedativa de espécies do gênero Passiflora – um mapeamento científico e tecnológico. **Cadernos de Prospecção-Portal de periódicos da UFBA**, v.9, n. 3, p. 299-312, 2016.

LEE, W.; BAE, J.S. Antithrombotic and antiplatelet activities of vicenin-2. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 26, n.6, p. 628-34, 2015.

LEITE, C.T.; FERREIRA, D.A.T.; VIEIRA, A.T.; PRAÇA-FONTES, M.M.; FERREIRA, A., CARVALHO, C.R.; CLARINDO, W.R. *In vitro* responses in *Passiflora* species with different chromosome numbers, ploidy levels and nuclear 2C values: revisiting and providing new insights. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 549-560, 2019.

LIMA, A.A.; NORONHA, A.C.S.; BORGES, A.L.; CARDOSO, C.E.L.; RITZINGER, C.H.S.; BARBOSA, C.J.; COSTA, D.C.; FILHO, H.P.S.; FANCELLI, M.; CUNHA, M.A.P.; SANCHES, N.F. A cultura do Maracujá. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – 3ªEd. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 124p., 2006.

LIU, M.; XU, Z.; GUO, S; TANG, C.; LIU, X.; JAO, X. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, v. 174, n.1, p. 112-118, 2014.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 2, p.239-247, 2007.

LOPES, M.W.; TIYO, R.; ARANTES, V.P. *Passiflora incarnata* use in the treatment of anxiety. **Revista UNINGÁ Review**, v.29, n.2, p.81-86, 2017.

- LUGATO, D.; SIMÃO, M.; 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, p. 339-346, 2014.
- 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 Technology**, v.53, p. 901-910, 2010.
- MAISUTHISAKUL, P.; PASUK, S.; RITTHIRUANGDEJ, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, n.3, p.229-240, 2008.
- MAMEDE, A.M.G.N.; SOARES, A.G.; OLIVEIRA, E.J.; FARAH, A. Volatile Composition of Sweet Passion Fruit (*Passiflora alata* Curtis). **Journal of Chemistry**, Article ID 3497216, 2017.
- MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C.H.; JEONG, B.R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v.56, n. 1, p. 105-113, 2015.
- MAROTA, W.M.; OTONI, W. C.; CARNELOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A. A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis in *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, Hungary, v. 7, n.1, p. 47-54, 2001.
- MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELÁZQUEZ, J.H.; MORALES-RAMOS, V.; BELLO-BELLO, J.J. Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreaeanum* Lind. **Propagation Ornamental Plants**, v.16, n. 1, p. 3-8, 2016.
- MEDEIROS, S. A. F.; YAMANISHI, O.K.; PEIXOTO, J. R.; PIRES, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RIBEIRO, J. G. B. L. Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no distrito federal. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 492-499, 2009.
- MEISEL, L.; URBINA, D.; PINTO, M. Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas (online). In: Squeo, F. and L. Cardemil (eds.). Fisiología vegetal. Ediciones **Universidad de La Serena**, La Serena, Chile, 2011.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 83-91, 2011.
- _____; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I. R. da S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M.F. (Org.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, v. 1, p. 55-78, 2005.
- MELO, N. F. Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. I seminário coda de nutrição vegetal, **EMBRAPA Semi-árido/Petrolina- PE**, 2002.
- MENG, Y. Y.; SONG, S. J.; LANDREIN, S. *In vitro* organogenesis and plant regeneration of *Passiflora xishuangbannaensis*, a species with extremely small populations. **Global Ecology and Conservation**, v. 31, e01836, 2021.

- MERHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Passiflora pohlii* nodal segments and assessment of genetic stability of regenerated plants. **Cryoletters**, v. 35, p. 204-215, 2014.
- MIKOVSKI, A. I.; DA SILVA, N. T.; SILVA, L. A. S.; MACHADO, M.; DE SOUZA BARBOSA, L.C.; REIS, A. C.; DA SILVA, M. L. From endosperm to triploid plants: a stepwise characterization of the de novo shoot organogenesis and morpho-agronomic aspects of an ornamental passion fruit (*Passiflora foetida* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.1-15, 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica - **Brasília: Ministério da Saúde**, 2016.
- MIRANDA, N.A.; TITON, M.; PEREIRA, I.M.; FERNANDES, J.S.C.; GONÇALVES, J.F.; ROCHA, F.M. Culture medium, growth regulators and ways of sealing test tubes on *in vitro* multiplication of candeia (*Eremanthus incanus* Less.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.44, n.112, p.1009-1018, 2016.
- MODIN, C.A.; CERVI, A.C.; MOREIRA, G.R.P. Sinopse das espécies de Passiflora L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.9, s.1, p.3-27, 2011.
- MOLLO, L.; MARTINS, M.C.M.; OLIVEIRA, V.F.; NIEVOLA, C.C.L.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.D.C. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v. 107, n. 1, p.141-149, 2011.
- 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 & Developmental Biology - Plant**, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.
- MONTERO, D.A.V.; MELETTI, L.M.M.; MARQUES, M.O.M. Fenologia do florescimento e características do perfume das flores de *Passiflora quadrangularis* L.(maracujá-melão). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.19, n.2, p.99-106, 2013.
- MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.
- MOREIRA, F. A. **Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)**. Dissertação de Mestrado. Insitituto de Biociências, São Paulo. Universidade de São Paulo, 2015.
- 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.
- MUNEER, S., KIM, E.J., PARK, J.S.; LEE, J.H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 4657-4670, 2014.
- 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.; LEE, E-J.; PAEK, K-Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 1-16, 2014.
- NADEEM, M.; ABBASI, B.H.; YOUNAS, M.; AHMAD, W.; ZAHIR, A.; HANO, C. LED-enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. **Journal of Photochemistry and Photobiology: B**, v.190, p.172–178, 2019.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v.22, p. 867-880, 1981.
- NAKAYAMA, F. **Cultivo in vitro de tejidos de *Passiflora caerulea***. Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad Nacional de La Plata, v. 42, p. 63-74, 1966.
- NAMDEO, A. G. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. **Pharmacognosy Reviews**, v 1, Issue 1, 2007.
- NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnate* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 26, p.1-6. 2007.
- NAWROT-CHORABIK, K. Somatic Embryogenesis in Forest Plants. In K. Sato (Ed.), Embryogenesis (p. 423-444). **London: UK, InTech**, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-woody-plants>.
- NETO, S.P.S.; ANDRADE, S.R.M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. Curso de biotecnologia aplicada à agropecuária, **Embrapa Cerrados**, 5º edição, 2013.
- NGUYEN, D.T.; KITAYAMA, M.; LU, N.; TAKAGAKI, M. Improving secondary metabolite accumulation, mineral content, and growth of coriander (*Coriandrum sativum* L.) by regulating light quality in a plant factory. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 95, p. 356–363, 2020.
- NGUYEN, T.K.L.; OH, M. Physiological and biochemical responses of green and red perilla to LED-based light. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, p. 240–252, 2021
- NHUT, D.T.; HONG, L.T.A.; WATANABE, H.; GOI, M.; TANAKA, M. Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. **Acta Horticulture**, v. 575, p.117-124, 2002.
- _____; HUYNH, N. P.; TAI, N. T.; NAM, N. B.; LUAN, V. Q.; HIEN, V. T.; TUNG, H. T.; VINH, B. T.; LUAN, T. C. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet

development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.29, n.2, p.299-308, 2015.

_____; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light emitting diode. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.43-52, 2003.

NIEVOLA, C.C.; CARVALHO, C. P.; CARVALHO V.; RODRIGUES, E. Rapid responses of plants to temperature changes, **Temperature**, v.4, n.4, p. 371-405, 2017.

NORIEGA, P.; MAFUD, D.F.; DE SOUZA, B.; SOARES-SCOTT, M.; RIVELLI, D.P.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p.1119-29, 2012.

NÚÑEZ, M.; SIQUEIRA, W.J.; HERNANDEZ, M.; ZULLO, M.; ROBAINA, C.; COLL, F. Effect of spirostane analogues of brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*). **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 97–99, 2004.

OKLESTKOVA, J.; RÁROVÁ, L.; KVASNICA, M.; STRNAD, M. Brassinosteroids: synthesis and biological activities. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.1053-1072, 2015.

ORSINI, F., PELIZZONI, F., VEROTTA, L. Quadranguloside, a cycloartane triterpene glycoside from *Passiflora quadrangulares*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 191-193, 1986.

_____; RICCA, G.; VEROTTA, L. Triterpene glycosides related to quadranguloside from *Passiflora quadrangularis*, **Phytochemistry**, v. 26, p. 1101-1105, 1987.

OTIFY, A.; GEORGE, C.; ELSAYED, A.; FARAG, M.A. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. **Food and Function**, v. 6, p. 3807-3817, 2015.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; CECON, P. R.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Regeneração de plantas de maracujazeiro (*Passiflora coccinea* Aubl.) a partir de protoplastos derivados de mesofilo. **Revista Ceres**, Viçosa -UFV, v. 42, n.243, p. 461-468, 1995.

OZAROWSKI, M.; PIASECKA, A.; PASZEL-JAWORSKA, A.; SIQUEIRA CHAVES, D.; ROMANIUK, A.; RYBCZYNSKA, M.; GRYSZCZYŃSKA, A.; SAWIKOWSKA, A.; KACHLICKI, P.; MIKOLAJCZAK, P.; 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. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 28, p.179-191, 2018.

_____; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 23, p. 937-947, 2013.

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.

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

PAIM PINTO, D.L.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, 107, 521–530, 2011.

_____; SILVA, M.L.; BARROS, B.A.; VICCINI, L.F.; CAMPOS, J.M.S.; OTONI, W.C. Ploidy stability of somatic embryogenesis derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 103, p. 71-79, 2010.

PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. Cultura de tecidos. **Lavras: UFLA/FAEPE**, 2001.

PALMA, C. F. F.; CASTRO-ALVES, V.; MORALES, L. O.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C. O.; STRID, Å. Spectral composition of light affects sensitivity to UV-B and photoinhibition in cucumber. **Frontiers in plant science**, v. 11, artigo 610011, 2021.

PARK, H-Y; KIM, K-S; AK, G.; ZENGİN, G; CZIÁKY, Z.; JEKŐ, J.; ADAIKALAM, K.; SONG, K.; KIM, D-H.; SIVANESAN, I. Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities. **Plants**, v. 10, n. 4, 698, 2021.

PARK, S-Y.; LEE, J.G.; CHO, H.S.; SEONG, E.S.; KIM, H.Y.; YU, C.Y.; KIM, J.K. Metabolite profiling approach for assessing the effects of colored light-emitting diode lighting on the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). **Plant Omics**, v. 6, n. 3, p. 224-230, 2013.

PASHKOVSKIY, P. P.; SOSHINKOVA, T. N.; KOROLKOVA, D. V.; KARTASHOV, A. V.; ZLOBIN, I. E.; LYUBIMOV, V. Y.; KRESLAVSKI, V. D.; KUZNETSOV, V. V. The effect of light quality on the pro-/antioxidant balance, activity of photosystem II, and expression of light-dependent genes in *Eutrema salsugineum* callus cells. **Photosynthesis Research**, v. 136, p. 199-214, 2018.

Passiflora in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 15 Jan. 2019

PATEL, S.S; MISHRA, H.S.K; SINGHAI, A.K. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **Research in Phytochemistry and Pharmacology**, v. 1, p. 1-16, 2011.

PATIL, A.S.; PAIKRAO, H.M. Bioassay guided phytometabolites extraction for screening of potent antimicrobials in *Passiflora foetida* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p.137, 2012.

PAWŁOWSKA, B.; ŻUPNIK, M.; SZEWCZYK-TARANIEK, B.; CIOĆ, M. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, p. 115–123, 2018.

PEÑALOSA, O.J.P.; ESCALANTE; G.O.C. Evaluation of induction of somatic embryogenesis from cotyledonary leaves of Banana Passion fruit (*Passiflora mollissima*) LH Bailey. **Respuestas**, v. 24, n. 3, p. 31-38, 2019.

PERDOMO, I.C. **Produção de fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante de extrato de calos de *Passiflora setacea* *Passiflora tenuifila* (passifloraceae) cultivados *in vitro***. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, 2016.

PEREIRA, C.A.M.; RODRIGUES, T. R.; YARIWAKE, JH. Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society** (Impresso), v. 28, p. 1472-1483, 2014.

_____; VILEGAS, J.H.Y. Chemical and pharmacological constituents of *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims and *Passiflora incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

_____; YARIWAKE, J.H.; LANCAS, F.M.; WAUTERS, JN.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v.15, n. 4, p. 241-8, 2004.

PEREIRA, C.A.; YARIWAKE, J.H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical analysis: PCA**, v.16, n. 5, p. 295-301, 2005.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PINHAL, H.F.; ANASTÁCIO, M.R.; CARNEIRO, P.A.P; SILVA, V.J.; MORAIS, T.P.; QUEIROZ, M.J. Luz Applications of tissue culture techniques in Brazilian Cerrado fruit trees. **Ciência Rural**, Santa Maria, online 2011.

PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p. 47-49, 2008.

PIRES, M. M.; GOMES, A.D.A.S.; MIDDLEJ, M.M.B.C.; SÃO JOSÉ, A.R.; ROSADO, P.L.; PASSOS, H.D.B. Caracterização do mercado de maracujá. In: PIRES, M. M.; SÃO JOSÉ, A.R.; CONCEIÇÃO, A. O. (Eds.) Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade, p. 21–67, 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.

POUDEL, P.R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, E R. Effect of red and blue light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 2, p. 147-153, 2008.

PRUDENTE, D.O.; PAIVA, R.; CARPENTIER, S.; SWENNEN, R.; NERY, F.C.; SILVA, L.C.; PANIS, B. Characterization of the formation of somatic embryos from mature zygotic embryos of *Passiflora ligularis* Juss. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v. 131, p. 97-105, 2017.

PUENTE-GARZA, C.A.; GARCÍA-LARA, S.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 225-230, 2017.

PULLMAN, G.S.; ZHANG, Y.; PHAN, B.H. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. **Plant Cellular Reports**, n. 22, p. 96 -104, 2003.

PURICELLI, L.; DELLAICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloproteins MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 302–304, 2003.

- QIAN, H.; LIU, T.; DENG, M.; MIAO, H.; CAI, C.; SHEN, W.; WANG, Q. Effects of light quality on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale sprouts. **Food Chemistry**, v.196, p. 1232-1238, 2016.
- QURESHI, S.; RAI, M. K.; AGRAWAL, S.C. *In vitro* evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species *Chindawara* against 3-keratinophilic fungi. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 39, p. 56-60, 1997.
- RACCHI, M. L. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. **Antioxidants**, 2, p. 340-369, 2013.
- RAGAVENDRAN, C.; KAMALANATHAN, D.; REENA, G.; NATARAJAN, D. *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. **Asian Journal Plant Science & Research**, v. 2, p. 707-711, 2012.
- RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N.S.; GUPTA, A.K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cellular and Tissue Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M.A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; LUNA-SÁNCHEZ, I.J. Light quality affects growth and development of in vitro plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. **South African Journal of Botany**, v.109, p. 288-293, 2017.
- RANGEL JUNIOR, I.M.; VASCONCELLOS, M.A.S.; ROSA, R.C.C.; CRUVINEL, F.F. Floral biology and physicochemical characterization of wild passion fruit *Passiflora setacea* D.C. BRS Pérola do Cerrado cultivated in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 6, 2018.
- 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.
- _____; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 32-36, 2001.
- RÊGO, M.M.; RÊGO, E.R.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C.; PEDROZA, C.M. Variation of gynogenic ability in passionfruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. **Plant Breed.**, v.130, p. 86-91, 2011.
- REIS, L. B.; COSTA, R.R.; OTONI, W. C. Influence of the gelling agents on the *in vitro* morphogenesis in juvenile explants of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* degener). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 80-88, 2005.
- _____; PAIVA NETO, V. B.; TOLEDO PICOLI, E. A.; COSTA, M. G. C.; RÊGO, M. M.; CARVALHO, C. R.; FINGER, F. L.; OTONI, W. C. Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Wallingford, v. 39, n.6, p. 618-622, 2003.
- _____; SILVA, M.L.; LIMA, A.B.P.; OLIVEIRA, M.L.P.; PINTO, D.L.P.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis* f. *flavicarpa*. **Acta Horticulture**, v. 738, p. 425-431, 2007.
- REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R.; AKOH, C. C.; MIN, D. B. Antioxidants. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, n. Ed. 2, p.489-516, 2002.

REN, J.; GUO, S.; XU, C.; YANG, C.; AI, W.; TANG, Y.; QIN, L. Effects of different carbon dioxide and LED lighting levels on the antioxidative capabilities of *Gynura bicolor* DC. **Advances in Space Research**, v. 53, n. 2, p. 353-361, 2014.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoi*. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p.152-155, 2006.

REZENDE, F.M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F.A.; CARVALHO, W.R.S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In. VI Botânica no Inverno 2016 / Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, cap 10, p. 93-104, 2016.

RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, V.A. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2388-2393, 2009.

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.

RICARDO, R.R.; MARGARITA, P.D. Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá isolation and cultivate of protoplast in passionfruit. **Acta Biológica Colombiana**, v. 9, p. 35–46, 2004.

RINALDI, M. M.; COSTA, A. M.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Post-harvest conservation of *Passiflora setacea* DC. fruits submitted to different sanitizers and storage temperatures. **Brazilian Journal of Food Technology**, 20, 2017.

ROCHA, D. I.; PAIM PINTO, D.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, p. 595-609, 2016b.

_____; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F. A. O.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (Print), v. 111, p. 69-78, 2012a.

_____; MONTE-BELLO, C.C.; AIZZA, L.C.B.; DORNELAS, M.C. A passion fruit putative ortholog of the somatic embryogenesis Receptor Kinase1 gene is expressed throughout the *in vitro de novo* shoot organogenesis developmental program. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, p. 1–11, 2016a.

_____; MONTE-BELLO, C.C.; DORNELAS, M.C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.120, p. 1087–1098, 2015.

_____; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; DA SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, 747-758, 2012b.

ROCHA, P.S.G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; MOSELE, S. H. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, p. 247-252, 2017.

_____; OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. Diodos emissores de luz e concentrações (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, n. 79, p. 14-19, 2013.

_____; OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; SANTOS, U.L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.

ROCKENBACH, A.P.; RIZZARDI, M.A.; NUNES, A.L.; BIANCHI, M.A.; CAVERZAN, A.; SCHNEIDER, T. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.17, n.1, p. 59-70, 2018.

ROSA, Y.; DORNELAS, M. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 91-99, 2012.

_____; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, p. 64-71, 2016.

_____. Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, p. 69-77, 2014.

_____. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cell & Development Biology-Plant**, v.52, p.64-71, 2016.

SAHAKYAN, N.Z.H.; PETROSYAN, M.T.; POPOV, Y.G.; VOLODIN, V.V.; MATISTOV, N.V.; GRUZDEV, I.V.; SHIRSHOVA, T.I. Content of neutral lipids and fatty acids in callus cultures and leaves of intact plants of *Ajuga genevensis* and *Ajuga Chia*. **Biotechnol Biotechnologic** Eq 24 (sup1), p. 87-90, 2010.

SAKALEM, M.E.; NEGRI, G.; TOBACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.

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.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 301-307, 2009.

SAPTARINI, N.M.; WARDATI, Y.; JULIAWATI, R. Antioxidant activity of extract and fraction of yellow passion fruit (*Passiflora Flavicarpa*) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, Issue 2, 2013

SARAVANAN, S.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves- A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 272-280, 2014.

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

SATI, A.; SATI, S.C.; SATI, N.; SATI, O.P. Chemical composition and antimicrobial activity of fatty acid methyl ester of *Quercus leucotrichophora* fruits. **Natural Product Research**, v. 31, p.713-717, 2017.

SCHUELTER, A.R.; LUZ, C.L.; SCHERER, A.M.; SOUZA, C.S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* DUNAL). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183-190, 2015.

SCORZA, R.; JANICK, J. *In vitro* flowering of *Passiflora suberosa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Dordrecht, v. 105, p. 892-897, 1980.

SEVERIN, C.; BUENO, M.; SANTIN, F.; GIUBILEO, M.G. Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.13, n.1, p.73-79, 2011.

SHANMUGAM, S.; GOMES, I.A.; DENADAI, M.; LIMA, B.S.; ARAÚJO, A.A.S.; NARAIN, N.; NETA, M.T.A.L.; SERAFINI, M.R.; QUITANS-JÚNIOR, L.J.; THANGARAJ, P. UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. **Food Research International**, 108, p. 611-620, 2018.

_____; MURUGAIYAN, I.; LIMA, B.S.; SERAFINI, M.R.; ARAUJO, 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 Chemistry**, v.12, p. 760-771, 2019.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKDI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 2012. Disponível em <https://hindawi.com/journals/jb/2012/217037/>.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of chemistry**, v. 10, p. S1409-S1421, 2017.

SILVA, M.L.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669- 682, 2010.

_____; PAIM PINTO, D.L.; CAMPOS, J.M.S.; CARVALHO, I.F.; ROCHA, D.I.; BATISTA, D.S.; OTONI, W.C. Repetitive somatic embryogenesis from wild passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 146, p. 635-641, 2021.

_____; PAIM PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. 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.

_____; PAIM PINTO, D.L.; GUERRA, M.P.; LANII, E.R.G.; CARVALHO, I.F.; ROSSI, A.A.B.; OTONI, W.C. Synthetic seeds of a wild passionfruit species with ornamental potential. **Ornamental Horticulture**, 21:331- 338, 2015.

- SILVA, M.M.A.; OLIVEIRA, A.L.B.; OLIVEIRA-FILHO, R.A.; CAMARA, T.; WILLADINO, L.; GOUVEIA-NETO, A. The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 157- 161, 2016.
- SILVA, N. T.; SILVA, L. A. S.; REIS, A. C.; MACHADO, M.; MATOS, E. M.; VICCINI, L. F.; OTONI, W.C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Endosperm culture: a facile and efficient biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, p. 613-624, 2020.
- SILVA, R.P.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO-FILHO, F.A.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1331-1337, 2008.
- SILVA, S.T., BERTOLUCCI, S.K.V., CUNHA, S.H.B., LAZZARINI, L.E.S., TAVARES, M.C.; PINTO, J.E.B.P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, p. 501-510, 2017.
- SILVA, T.C.R.; CARVALHO, C.R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, Ed. 2, p. 158-165, 2013.
- 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.; BARBOSA, T.J.S.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; MANSUR, E.; IGNACIO, A.C.P.R.; 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**, p. 1-10, 2018.
- _____; FONSECA, E.; GARCIA, R. O.; 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, p. 419-430, 2016.
- 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.
- SINGH, A.; DWIVEDI, P. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 750-757, 2018.
- SIVAKUMAR, S.; SIVA, G.; SATHISH, S.; KUMAR, G. P.; VIGNESWARAN, M.; VINOTH, S.; JAYABALAN, N. Influence of exogenous polyamines and plant growth regulators on high frequency *in vitro* mass propagation of *Gloriosa superba* L. and its colchicine content. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 18, 101030, 2019.
- ŠKODOVÁ-SVERÁKOVÁ, I.; ZÁHONOVÁ, K.; BUČKOVÁ, B.; FÜSSY, Z.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Catalase and Ascorbate Peroxidase in Euglenozoan Protists. **Pathogens**, v. 9, n. 4, 317, 2020.
- SOARES, W.S.; BRUCKNER, C.H.; CRUZ, A.C.F.; ROCHA, D. I.; MATOS, E.M.; KOEHLER, A.D.; OTONI, W. C. Shining light on anther culture, a poorly understood regeneration route in passion fruit (*Passiflora gibertii* NE Brown): histological, hormonal, and phytochemical aspects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 1-11, 2021.

- SORGATO, J.C.; ROSA, Y.B.C.J.; SOARES, J.S.; LEMES, S.R. & SOUSA, G.G. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v.45, n.2, 2015.
- SOUZA, F.G.L.S.; SAMPAIO, V.S.; NEVES, I.C.S.; SILVA, M.A.P.; LOIOLA, M.I.B. *Passiflora* L. (Passifloraceae S.S.) in the chapada do Araripe. **Guia de Campo**, 1393, 2021. Disponível em: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/>.
- SOUZA, J.C.; RESCAROLLI, C.L.S.; NUNEZ, C.V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.
- SOUZA, N.B.M.; PEREIRA, J.A.; MALHEIRO, R.; LOPES-DA-SILVA, M.F. Composição de frutos de maracujá-roxo, *Passiflora edulis* Sims, ao longo da maturação. **Actas Portuguesas de Horticultura**, n. 28, p. 197-204, 2016.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2º Ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p. 640, 2008.
- SOZO, J. S. **Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados *in vitro* de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia).104 folhas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Florianópolis, 2014.
- _____; CRUZ, D.C.; PAVEI, A.F.; PEREIRA, I.M.C.; WOLFART, M.; RAMLOV, F.; MONTAGNER, D.F.; MARASCHIN, M.; VIANA, A.M. *In vitro* culture and phytochemical analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). In: Jain S. (eds) Protocols for *In vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, Second Edition. **Methods in Molecular Biology**, vol 1391. Humana Press, New York, NY, 2016.
- SUDASINGHE, H. P.; PEIRIS, D. C. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. **PeerJ**, v. 6, p. e4389, 2018.
- SUTHAR, R.K.; HABIBI, N.; PUROHIT, S.D. Influence of agar concentration and liquid medium on *in vitro* propagation of *Boswellia serrata* Roxb. **Indian Journal Biotechnological**, v.10, n. 2, p. 224-7, 2011.
- SZOPA, A.; EKIERT, H.; SZEWCZYK, A.; FUGAS, E. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *Divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 329–336, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. **Porto Alegre-RS**: Editora Arned, 2017.
- TERHAAG, K. **Efeitos de tipos de explantes e auxinas no crescimento e produção de metabólitos secundários em culturas celulares de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado (Passifloraceae)**. TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, 2020.
- TOKARZ, K.; MAKOWSKI, W.; BANASIUK, R.; KROLICKA, A.; PIWOWARCZYK, B. Response of *Dionaea muscipula* J. Ellis to light stress in *in vitro*: physiological study. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, n. 1, p. 65-77, 2018.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKYK, L.; MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n.2, p. 137-142, 2001.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta eficiência em Fase Reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

TREMMELE, M.; KIERMAIER, J.; HEILMANN, J. *In vitro* metabolism of six C-glycosidic flavonoids from *Passiflora incarnata* L. **International Journal of Molecular Sciences**, 22:6566, 2021.

VAHDATI, K.; HASSANKHAH, A. Developing a photomixotrophic system for micropropagation of persian walnut. **Acta Horticulture**, v. 1050, p. 181–187, 2014.

VIANNA, M. G.; GARCIA, R.O.; MANSUR, E.; Engelmann, E.; PACHECO, G. Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 139, v.2, p. 369-379, 2019.

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; SILVA, L. C.; DE CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, p. 738-745, 2014.

_____; SILVA, P.O; FERNANDES, A.M.; ROCHA, D.I.; OTONI, W.C. Protocol for somatic embryogenesis in *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae). In: Jain MS, Gupta P (eds) Stepwise protocols for somatic embryogenesis of woody plants, 2nd ed. **Springer**, Cham, p. 253–265, 2018.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Embrapa Clima Temperado, Documentos 316, **EMBRAPA**, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. **Springer**. 2^a Ed, 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.; LIU, H.; ZHAO, J.; GAO, H.; ZHOU, L.; ZHILONG, L.; CHEN, Y.; SUI, P. Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. **Molecules**, v.15, p. 5807-5817, 2010b.

_____; QIAN, J.; YAO, L.; LU, Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, 2:5, 2015.

_____; ZHAO, J.; LIU, H.; ZHOU, L.; LIU, Z.; WANG, J.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two Valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. **Molecules**, v.15, p. 6411-6422, 2010a.

WATTANATHORN, J.; SATTROOPINAT, N.; TONG-UM, T.; MUCHMAPURA, S.; WANNANOND, P.; SIRISA-ARD, P. Neuroprotective effect against cerebral ischemia of *Passiflora foetida*. **American Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 600-604, 2012.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v.2, n. 3, p. 251-286, 2015.

WOLFART, M. R. **Calos de passifloras silvestres: indução, caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural**. Dissertação em Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**, v.108, p. 1-33, 2014.

YALÇIN, S.; YALÇINKAYA, S.; ERCAN, F.N In silico detection of inhibitor potential of *Passiflora* compounds against SARS-Cov-2(Covid-19) main protease by using molecular docking and dynamic analyses. **Journal of Molecular Structure**, 1240:130556, 2021.

YANG, L.Y.; WANG, L.T.; MA, J.H.; MA, E.D.; LI, J.Y.; GONG, M. Effects of light quality on growth and development, photosynthetic characteristics and content of carbohydrates in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants. **Photosynthetica**, n. 55, v. 3, p. 467-477, 2017.

YANG, M.H.; KUO, C.H.; HSIEH, W.C.; KU, K.L. Investigation of microbial elicitation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n. 17, p. 9537-9541, 2010.

YANG, S.; XU, K.; WANG, Y.; BU, B.; HUANG, W.; SUN, F.; LIU, S.; XI, Y. Analysis of biochemical and physiological changes in wheat tissue culture using different germplasms and explant types. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.37, n. 6, p.120, 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, 2000 b.

_____. New Cycloartane Triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1377-1380, 2000 a.

YOUNAS, M.; DROUET, S.; NADEEM, M.; GIGLIOLI-GUIVARC'H, N.; HANO, C.; ABBASIA, B.H. Differential accumulation of silymarin induced by exposure of *Silybum marianum* L. callus cultures to several spectres of monochromatic lights. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 184, p. 61-70, 2018.

YU, W.; LIU, Y.; SONG, L.; JACOBS, D.F.; DU, X.; YING, Y.; SHAO, Q.; WU, J. Effect of differential light quality on morphology, photosynthesis, and antioxidant enzyme activity in *Camptotheca acuminata* Seedlings. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 36, p. 148–160, 2017.

YU, Y.; QIN, W.; LI, Y.; ZHANG, C.; WANG, Y.; YANG, Z.; GE, X.; LI, F. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. **Plant Growth Regulation**, v.87, p.187-199, 2019.

ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoids dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 191p., 2010.

_____; PEREIRA, C.A.M.; ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H. Passion fruit: a functional food?. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

_____ ; YARIWAKE, J.H.; WAUTERS, J-N.; TITS, M.; ANGENOT, L. Analysis of Passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Quimica Nova**, v. 35, n. 3, p. 541-545, 2012.

ZHANG, T.; SHI, Y.; PIAO, F.; SUN, Z. Effects of different LED sources on the growth and nitrogen metabolism of lettuce. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 134, p. 231–240, 2018.

ZHAO, B.; AGBLEVOR, F.A.; RITESH, K.C.; JELESKO, J.G. Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy roots cultures of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.113, n.1, p.121-129, 2012.

ZHENG, L.; LABEKE, M-C.V. Effects of different irradiation levels of light quality on Chrysanthemum. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 124-131, 2018.

ZHU, H.; LI, X.; ZHAI, W.; LIU, Y.; GAO, Q.; LIU, J.; REN, L.; CHEN, H.; ZHU, Y. Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple pak-choi (*Brassica campestris* sp. *Chinensis* Makino). **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, e0179305, 2017.

ZUCOLOTTO, S.; REGINATTO, F.; RAMOS, F.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. Analysis of C-glycosyl flavonoids from south American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232-239, 2011.


_____ ; 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. **Phytochemistry Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232-9, 2012.

_____ ; GOULART, S.; MONTANHER, A.; REGINATTO, F.; SCHENKEL, E.; FRÖDE, T. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009.

ANEXO A- Artigo intitulado “Light quality and explant type modulate growth, antioxidant properties and bioactive compounds production of calluses of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado” publicado na revista *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC) no dia 30 de outubro de 2021.



Light quality and explant type modulate growth, antioxidant properties and bioactive compounds production of calluses of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado

Raphaela Santos-Tierno¹ · Renata Garcia¹ · Eduardo Fonseca¹ · Fábio Faleiro² · Davyson Moreira³ · Georgia Pacheco¹ · Elisabeth Mansur⁴ 

Received: 18 December 2019 / Accepted: 20 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Passiflora species have high industrial and medicinal relevance, due to presence of specific metabolites and their recognized pharmacological activities. In vitro systems allow the modulation of secondary metabolites production according to culture conditions. In this work, we report the effect of different light emitting diodes (LED) on induction, metabolite production, and antioxidant properties of calluses derived from stem and leaf segments of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado. Friable calluses were induced on MSM medium supplemented with picloram, under different light qualities (white fluorescent lamps or different types of LEDs) or in the dark. Light quality contributed more significantly for biomass accumulation than the other variables. Callus formation was observed in response to all treatments, although the highest biomass accumulation was induced by red LED. Chromatographic analyses indicated that blue LED induced the highest production of bioactive substances. All samples displayed low antioxidant potential by the DPPH assay, but showed a high capacity to chelate iron. The activity of antioxidant enzymes was also evaluated. The incubation under red LED caused an increase on the activity of superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase in calluses derived from internodal segments induced under red LED. This is the first study evaluating the effect of lighting conditions in in vitro systems of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado, thus opening new possibilities of study and utilization.

Key message

Callus induction was affected by light quality, whereas bioactive compounds were modulated by the dedifferentiation process since flavonoids were detected in leaf tissues and fatty acids in calluses extracts.

Keywords Antioxidant enzymes · DPPH · Iron chelation · Light-emitting diodes · Phytochemistry

Communicated by Amita Bhattacharya.

✉ Elisabeth Mansur
elisabeth.mansur@gmail.com

- ¹ Núcleo de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ² Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brazil
- ³ Diretoria de Pesquisa, Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ⁴ Núcleo de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier nº 524, PHLC sala 505 – Maracanã, CEP: 20550-013 Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

Passion fruits, as the species of genus *Passiflora* are known, are found in tropical and subtropical regions (He et al. 2020). They have high industrial and medicinal relevance (Dhawan et al. 2004), and also great utility in the ornamental plant market due to the diversity of size and colors of their flowers (Mikovski et al. 2019). Around 60 species can be used as food (Mattos et al. 2015), although only a few of them are commercialized, such as *Passiflora edulis* Sims (purple passion fruit), *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (yellow passion fruit) and *P. alata* Curtis (sweet passion fruit) (Mamede et al. 2017). In addition, the pharmacological properties of passion fruits have been widely studied over the years, and

some species, such as *P. incarnata* L., *P. alata* and *P. edulis* are listed in pharmacopoeias in several countries (Gosmann et al. 2011), including Brazil (Brazilian Pharmacopoeia 2019).

Several studies with *Passiflora* species have been conducted to investigate different biological activities, such as anxiolytic, anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant (Zas and John 2017; Leal et al. 2020; Rotta et al. 2019; Ramaiya et al. 2021). These activities are associated with the presence of different constituents, including flavonoids (Corrêa et al. 2016), saponins (Wang et al. 2013), esters, aldehydes, ketones and alcohols (Zeraik et al. 2010), in addition to phenolic acids, coumarins, phytosterols, cyanogenic heterosides and alkaloids in different parts of the plants (Patel et al. 2011; Smruthi et al. 2021).

Passiflora setacea D.C. is a wild species native to the Brazilian Cerrado, known as *maracujá-do-sono* (sleep passion fruit) or *maracujá-do-cerrado* (savannah passion fruit) (Rangel Junior et al. 2018). This species is resistant to *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora*, and to the *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (Braga et al. 2006). It is also used in folk medicine for the treatment of insomnia (Carvalho et al. 2018). The cultivar BRS Pérola do Cerrado, launched in 2013 by Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), is the first registered (RNC N° 21714) and protected cultivar of a wild *Passiflora* species (SNPC Certificate N° 20120197) (Viana et al. 2016). It is an alternative for passion fruit market destined to food industry for the production of juices, ice creams, and consumption in natura, and also has ornamental potential. The fruit pulp has a good functional quality, resulting from the high amount of mineral salts, phenolic compounds and proanthocyanidins, which are associated with antioxidant activity (Carvalho et al. 2018).

In recent years, plant tissue culture techniques have been used for large-scale production of bioactive compounds both from unorganized (calluses and cell suspensions) and organized cultures (adventitious roots and shoots) (Chandran et al. 2020). Several biotechnological studies with *Passiflora* species reporting in vitro production of bioactive substances have been published (Faleiro et al. 2019). Phenolic compounds were detected in friable calluses of *P. quadrangularis* (Antognoni et al. 2007), *P. alata* (Lugato et al. 2014), *P. setacea* and *P. tenuifila* (Sozo et al. 2016), while flavonoids were found in calluses of *P. caerulea* and *P. incarnata* (Ozarowski and Thiem 2013). More recently, Simão et al. (2016) reported a high antioxidant activity in adventitious root cultures of *P. pohlii* that produced different saponins, as well as antibacterial activity in extracts of leaves and roots from in vitro-grown plants of *P. alata* and *P. foetida*, which was associated with the presence of flavonoids and saponins (Simão et al. 2018).

Because tissue culture is performed under controlled conditions, it is also an important tool to create models for evaluating morphological, physiological and biochemical responses to physical and chemical factors that modulate plant cells responses. Among the physical parameters, lighting conditions, including photoperiod, intensity and wavelength, may strongly influence both morphogenic and biosynthetic capacities (Nadeem et al. 2019). Although fluorescent lamps are commonly adopted in the protocols, the use of light-emitting diode (LED) has significantly increased in recent years, and several studies aiming at the evaluation of specific wavelengths on in vitro morphogenesis, secondary metabolite production, antioxidant potential and oxidative stress were reported (Batista et al. 2018).

Oxidative stress is the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which may exceed the antioxidant capacity of the cells. ROS overproduction can cause lipid peroxidation, protein oxidation, and even cell death. To protect against oxidative stress, plant cells exhibit both non-enzymatic, including flavonoids and carotenoids, as well as enzymatic defenses, such as glutathione reductase (GR), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) (Cotinguiba et al. 2013). As oxidative stress is a secondary effect of several biotic and abiotic factors, its evaluation in in vitro cultures is important for understanding biochemical processes and establishing suitable conditions for the production of a target secondary metabolite (Zhao et al. 2005).

In this work, we report the influence of light quality on induction, metabolite production and antioxidant properties of calluses derived from leaf and stem segments of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado.

Materials and methods

In vitro germination and callus induction

Seeds of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado (Embrapa Cerrados, Brazil) were surface sterilized as previously described (Garcia et al. 2011). Disinfected seeds were inoculated on MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing half-strength salts and vitamins, 1.5% (w/v) sucrose (Merck®), agar-gelled (0.7%) (Sigma-Aldrich®), followed by incubation in a growth chamber at 25 °C ± 2 °C under a 16 h photoperiod with a light intensity of 46 μmol m⁻² s⁻¹ provided by cool-white fluorescent lamps (Philips F40 CW) for 15 days. Shoot tips excised from the seedlings were inoculated on half-strength MS medium with modifications (MSM—Monteiro et al. 2000), and the derived plants were used as sources of explants for in vitro multiplication and induction of callogenesis.

For callus induction, nodal (0.5 cm), internodal (1.0 cm) and leaf (1.0 cm²) segments were aseptically excised from micropropagated plants and inoculated on MSM medium supplemented with 3% (w/v) sucrose and different concentrations of picloram (PIC—4.14, 20.7, 41.4 μM), and solidified with 0.7% (w/v) agar. Stem explants were inoculated horizontally, whereas leaf explants were cultured with the abaxial surface in contact with the media. The pH of all media was adjusted to 5.8, and PIC was added before autoclaving for 15 min at 121 °C. Three explants were cultured per glass flask (11.5 cm \times 5.5 cm, 250 mL) sealed with polypropylene caps, containing 30 mL of medium. Twelve explants were used per treatment, and the experiments were repeated twice.

Cultures were maintained at 28 °C \pm 2 °C under cool white fluorescent lamps (control), in the absence of light or under different types of LED (Tecnal®, Brazil): white (WL, 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 4000k), blue (BL, 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 450 nm), red (RL, 47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 660nm) or a combination of 30% blue and 70% red (B-RL, 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 450 and 660 nm). Callus formation and biomass accumulation were evaluated after 60 days of culture.

Phytochemical analysis

Extract preparation

Calluses derived from stem and leaf segments were lyophilized for five days, then powdered and weighed. Extracts were prepared from 1 g of dry plant material in 50 mL of ethanol (90% v/v) using ultrasound-assisted extraction according to Garcia et al. (2016), with modifications. The material was transferred to an ultrasonic bath (USC-1400, UNIQUE®) with 120 W power and 40 kHz frequency for 15 min. The extracts were then filtered and evaporated in rotary evaporator (Marconi- M120) at 40 °C.

Qualitative HPLC-UV analysis

The qualitative chromatographic analyses were carried out by High-Performance Liquid Chromatography coupled to a UV detector (HPLC-UV) in a Shimadzu Liquid Chromatograph System, equipped with LC-20AD pump, DGU-20AS degasser, CTO-20AS oven, CBM20A controller and SPD-20 A detector. The analyses were performed on a Thermo-Scientific® Hypersil Gold RP18 column (250 mm \times 4.6 mm i.d. \times 5 Å particle size), at a flow rate of 1.0 mL/min and oven temperature at 25 °C. All samples were solubilized in methanol at a final concentration of 1.0 mg/mL and the injected volume was 10 μL . Solvent system consisted of ultrapure aqueous acetic acid solution, pH 3.0 (solvent A) and acetonitrile (solvent B), with the

following gradient elution: 95% of A and 5% of B (0–2 min); 5–100% of B (2–55 min); 95% of A and 5% of B (55–61 min). The UV absorption was monitored at 254 nm. All solvents were HPLC grade (Tedia®, Brazil).

HPLC-UV-ESI-MS/TOF analysis

Based on the HPLC-UV results, selected samples were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography coupled to UV detector and Time-of-Flight Mass Spectrometer Detector (MicroTOF II Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, MA, USA) equipped with electrospray ionization (200 °C–9 $\mu\text{L}/\text{min}$ –4 psi) (HPLC-UV-ESI-MS/TOF). Samples were analyzed using the same column and conditions described for HPLC-UV. The analyses were made in the negative ion mode of scan range from mass/charge (m/z) from 50 to 1000. The gas used during desolvation was nitrogen at a flow rate of 400 L/h, subjected to the temperature of 250 °C, ionization energy applied was 10 eV and the UV absorption was monitored at 254 nm. Compounds identification was carried out comparing the exact experimental mass of the pseudomolecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ with those of the MassBank (High Quality Mass Bank Database, available at <https://massbank.eu/MassBank/>), as well as elution order and considering the compounds previously identified in *Passiflora* genus.

Determination of antioxidant activity

The capacity of the extracts to scavenge the DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was determined according to Sánchez-Moreno et al. (1998). Briefly, 25 μL of extracts diluted in 100% methanol (1–30 mg/mL) were added to a 60 mM DPPH MeOH solution (975 μL). The samples were incubated for 1 h in the dark, at room temperature, and the decrease in absorbance was spectrophotometrically quantified at 515 nm (Shimadzu UV-B382). Measurements were performed in triplicate.

In addition, the ability of extracts to chelate ferrous ion (Fe^{2+}) was determined according to Chew et al. (2009), with slight modifications. Extracts (250 μL , 0.25–5 mg/mL) were incubated with 0.1 mM FeSO_4 (250 μL) for 5 min, before the addition of 0.25 mM ferrozine solution (250 μL). The samples were incubated for 10 min, in the dark, and their absorbances were spectrophotometrically measured at 562 nm (UV-Vis BioMate 3 S, Thermo Scientific). The extract concentration required for chelating 50% of the Fe^{2+} (EC_{50}) was calculated by non-linear regression from a graph of % chelation ability versus sample concentration (mg/mL).

Evaluation of antioxidant enzymes activity

Protein extracts were prepared according to Azevedo et al. (1998), with modifications. Briefly, fresh calluses (300 mg) maintained for 60 days in culture were ground in liquid nitrogen (LN) and polyvinylpolypyrrolidone (Sigma-Aldrich®, USA) (PVPP, 20%). The powder was then homogenized in extraction buffer (2.0 mL) containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.2), 1 mM EDTA (Vetec®, Brazil), and 3.0 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich®, USA), before centrifugation at 10,000 rpm for 30 min at 4 °C. Supernatants were collected and the activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT and APX were determined according to Vianna et al. (2019).

Statistical analysis

Tissue culture experiments were repeated at least twice, using twelve explants per treatment. Antioxidant assays were carried out in triplicates, in two independent experiments. Statistical evaluation of experimental data was performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer comparisons test (0.05% significance level), using GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), or MStat-C statistical package.

Results

Induction of callogenesis

Stem and leaf segments cultured on MSM medium supplemented with PIC gave rise to yellowish-green, friable calluses (Fig. 1), with high induction rates regardless of the lighting condition (81.6 to 100%). Callus formation occurred from the wound surfaces, with subsequent proliferation all over the explants after 60 days of culture. Stem explants showed higher callogenesis rates when compared to leaf segments. The highest callus formation frequencies were observed from internodal explants in response to all PIC concentrations, except when incubated in the dark or under blue LED (Table 1).

Fluorescent light induced higher biomass accumulation (0.85 ± 0.002 g DW) only in calluses derived from nodal segments, when compared to the different types of LED. In calluses derived from leaf segments, higher biomass accumulation occurred in response to red LED (0.93 ± 0.03 g DW). On the other hand, in calluses derived from internodal segments was observed higher biomass under white LED (0.73 ± 0.04 g DW).

According to the relative contribution analysis (Table 2), although the explant type significantly influenced callus

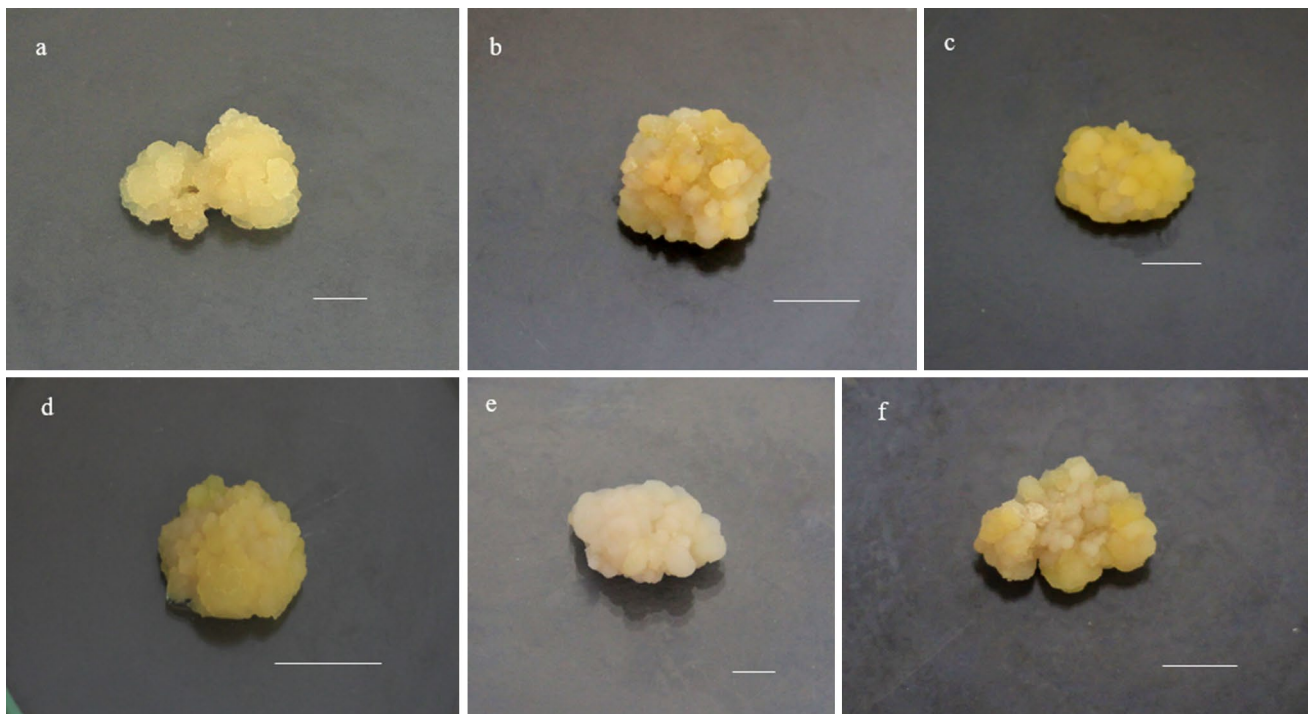


Fig. 1 Callus formation from internodal segments of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado cultured for 30 days on MSM medium supplemented with 41.4 μ M PIC at 28 ± 2 °C, under different light

qualities. Dark (a), fluorescent lamp (b), blue LED (c), white LED (d), red LED (e), B-RL—combination of blue and red LEDs (f). Bar = 1 cm

Table 1 Callus formation from stem and leaf segments of *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultured for 60 days on MSM media supplemented with PIC, under different light qualities

Light conditions	PIC (μM)	Nodal segments		Internodal segments		Leaf segments	
		Callogenesis (%)	Dry weight (g)	Callogenesis (%)	Dry weight (g)	Callogenesis (%)	Dry weight (g)
Dark	4.14	100 \pm 0.0 ^a	0.43 \pm 0.02 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.36 \pm 0.03 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.62 \pm 0.04 ^b
	20.7	91.2 \pm 0.6 ^b	0.38 \pm 0.03 ^{cd}	91.5 \pm 0.5 ^b	0.45 \pm 0.01 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.22 \pm 0.03 ^e
	41.4	93.2 \pm 1.8 ^b	0.31 \pm 0.07 ^d	92.7 \pm 1.0 ^b	0.50 \pm 0.05 ^b	93 \pm 1.7 ^b	0.42 \pm 0.03 ^c
FL	4.14	94.4 \pm 3.2 ^b	0.85 \pm 0.02 ^a	100 \pm 0.0 ^a	0.27 \pm 0.02 ^{cd}	81.6 \pm 0.7 ^c	0.15 \pm 0.02 ^f
	20.7	94.4 \pm 3.2 ^b	0.25 \pm 0.02 ^e	100 \pm 0.0 ^a	0.61 \pm 0.02 ^a	100 \pm 0.0 ^a	0.35 \pm 0.03 ^d
	41.4	94.4 \pm 3.2 ^b	0.17 \pm 0.02 ^e	100 \pm 0.0 ^a	0.36 \pm 0.06 ^c	84.4 \pm 2.5 ^c	0.25 \pm 0.01 ^e
BL	4.14	92.2 \pm 1.2 ^b	0.65 \pm 0.04 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.62 \pm 0.02 ^a	81.6 \pm 0.9 ^c	0.67 \pm 0.06 ^b
	20.7	100 \pm 0.0 ^a	0.57 \pm 0.03 ^b	92 \pm 1.1 ^b	0.52 \pm 0.1 ^b	92.1 \pm 1.2 ^b	0.47 \pm 0.04 ^{bc}
	41.4	100 \pm 0.0 ^a	0.41 \pm 0.02 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.39 \pm 0.07 ^c	92.1 \pm 1.2 ^b	0.44 \pm 0.03 ^c
RL	4.14	92.2 \pm 1.2 ^b	0.36 \pm 0.04 ^d	100 \pm 0.0 ^a	0.67 \pm 0.02 ^a	100 \pm 0.0 ^a	0.93 \pm 0.03 ^a
	20.7	100 \pm 0.0 ^a	0.68 \pm 0.01 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.58 \pm 0.04 ^b	92.2 \pm 1.2 ^b	0.47 \pm 0.03 ^c
	41.4	100 \pm 0.0 ^a	0.56 \pm 0.05 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.71 \pm 0.03 ^a	100 \pm 0.0 ^a	0.35 \pm 0.03 ^d
WL	4.14	100 \pm 0.0 ^a	0.29 \pm 0.02 ^e	100 \pm 0.0 ^a	0.54 \pm 0.02 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.41 \pm 0.02 ^c
	20.7	100 \pm 0.0 ^a	0.66 \pm 0.02 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.73 \pm 0.04 ^a	100 \pm 0.0 ^a	0.49 \pm 0.03 ^b
	41.4	92.2 \pm 1.2 ^b	0.47 \pm 0.02 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.64 \pm 0.05 ^a	84.4 \pm 2.5 ^c	0.56 \pm 0.03 ^{bc}
B-RL	4.14	92.2 \pm 1.2 ^b	0.38 \pm 0.05 ^{cd}	100 \pm 0.0 ^a	0.36 \pm 0.03 ^c	81.6 \pm 0.9 ^c	0.58 \pm 0.07 ^b
	20.7	100 \pm 0.0 ^a	0.62 \pm 0.01 ^b	100 \pm 0.0 ^a	0.13 \pm 0.005 ^d	81.6 \pm 0.9 ^c	0.89 \pm 0.02 ^a
	41.4	92.2 \pm 1.2 ^b	0.28 \pm 0.04 ^e	100 \pm 0.0 ^a	0.39 \pm 0.06 ^c	100 \pm 0.0 ^a	0.51 \pm 0.03 ^{bc}

In columns, data followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)

FL fluorescent white lamps, BL blue LED, RL red LED, WL white, B-RL blue+red LED

Table 2 Relative contribution of type of explant, light conditions and growth regulator concentration and their interactions to variation in the callus formation of *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

Source of variation	Callogenesis (%)	Dry weight (g)
Type of explant	53.7	1.67
Light conditions	8.55	29.05
Growth regulator	1.89	25.13
Type of explant \times light conditions	9.27	8.37
Type of explant \times growth regulator	5.43	15.08
Light conditions \times growth regulator	12.09	10.61
Type of explant \times light conditions \times growth regulator	8.55	9.49

formation rates (53.7%), biomass accumulation was more affected by light conditions (29.05%) or by the PIC concentration (25.13%).

Phytochemical analysis

Calluses derived from internodal segments cultured on MSM medium supplemented with 41.4 μM PIC under all light qualities were selected for phytochemical analysis

due to the high callogenesis rates. Preliminary HPLC analysis of extracts revealed similar chromatographic profiles, except for the material cultured under blue LED (Fig. 2), which showed the highest number of peaks.

Compounds identification in calluses extracts by HPLC-UV-ESI-MS/TOF analyses revealed the presence of fourteen substances, mainly flavonoids and fatty acids, which were compared to the Massbank database and to the literature on genus *Passiflora* (Table 3; Fig. 3). The highest number of compounds were detected in extracts of calluses cultured under blue LED, including eight exclusive peaks. On the other hand, three compounds (4, 5 and 9), which were detected in all samples, were not found in extracts of calluses cultured under blue LED. Moreover, compound 10 were only found in calluses maintained under LED (Table 2). The major constituents were registered in extracts of calluses maintained under blue LED: compound 1 at Rt 8.2 min (dihydroxybenzoyl-hexoside; M-[H] = 315; C₁₃H₁₅O₉), compound 2 at Rt 9.1 min (luteolin-6-C-glucoside; M-[H] = 447; C₂₁H₁₉O₁₁), compound 3 at Rt 12.1 min (tyrosol-O-di-hexoside; M[H] = 461; C₂₀H₂₉O₁₂), compound 11 at Rt 34.2 min (hydroxy-octadecadienoic acid; M-[H] = 295; C₁₈H₃₁O₃), compound 13 at Rt 42.9 min (linoleic acid; M-[H] = 279; C₁₈H₃₂O₂), and compound 14 at Rt 44.9 min (palmitic acid; M-[H] = 255; C₁₆H₃₂O₂).

Fig. 2 Chromatographic profile of extracts of calluses induced from internodal segments in response to 41.4 μM PIC, under blue LED by HPLC-UV

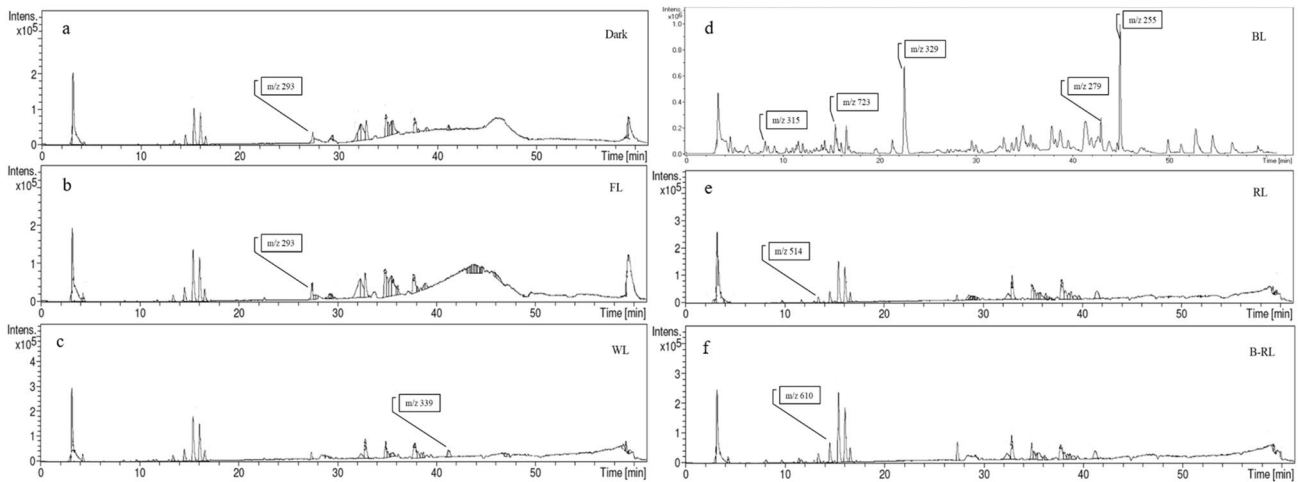
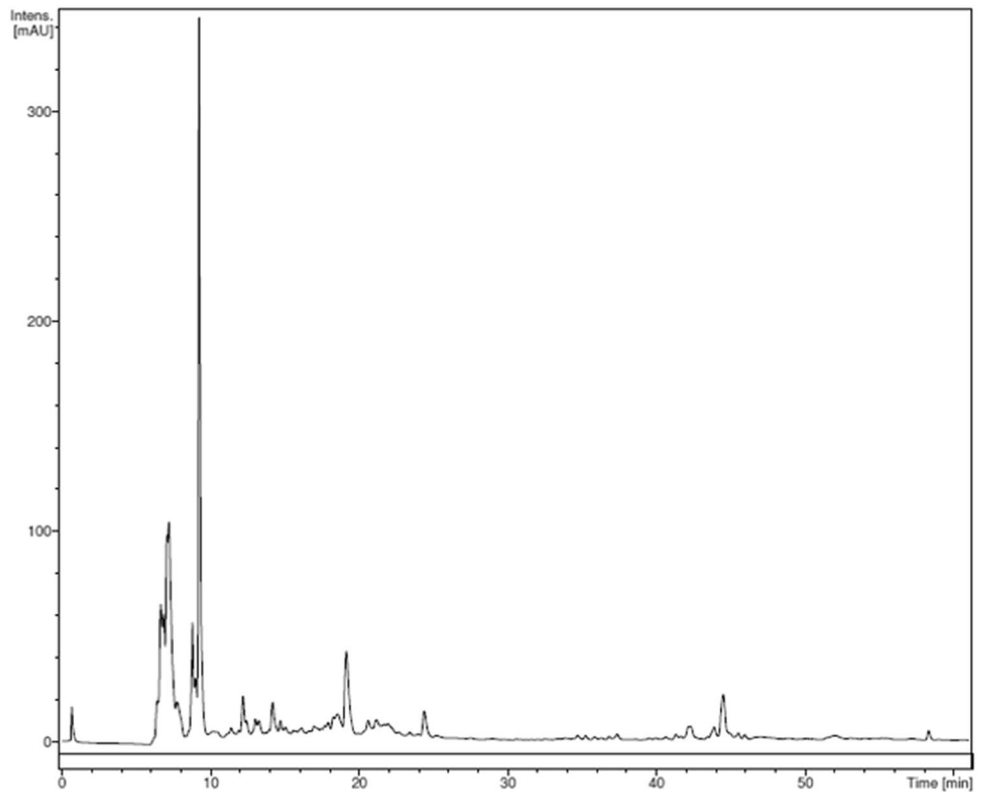


Fig. 3 HPLC-UV-ESI-MS/TOF total ion chromatogram of ethanolic extracts of calluses derived from internodal segments cultured on MSM medium supplemented with 41.4 μM and maintained under dif-

ferent light qualities of *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. Dark (a), fluorescent lamp (b), white LED (c), blue LED (d), red LED (e), B-RL—combination of blue and red LEDs (f)

DPPH and iron chelating assays

Extracts from calluses derived from internodal segments and cultured on medium supplemented with PIC 41.4 μM under different light qualities showed a low antioxidant capacity by the DPPH radical scavenging assay. Calluses maintained under fluorescent white lamps, as well as under

blue or red LED displayed lower EC_{50} values, although with no statistical differences. On the contrary, the iron chelating assay indicated a higher antioxidant potential, expressed by significantly lower EC_{50} values of all samples, and those induced under fluorescent white lamps showed the highest chelating capacity, with EC_{50} 2.4 g/L (Table 4).

Table 3 Compounds found in extract of calluses derived from internodal segments of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado cultured on media supplemented with 41.4 μM PIC under different light qualities, obtained by HPLC-UV-ESI-MS/TOF

No.	Retention time (min)	[M-H], ESI (-)	Suggested compound	References	Light conditions							
					Dark	FL	WL	BL	RL	R-BL		
1	8.2	315.0893	Dihydroxybenzoyl-hexoside (C ₁₃ H ₁₅ O ₉)	Ozarowski et al. (2018)	-	-	-	+	-	-	+	
2	9.1	447.1402	Luteolin-6-C-glucoside (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁)	Otify et al. (2015), Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	
3	12.1	461.1928	Tyrosol-O-di-hexoside (C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂)	Otify et al. (2015)	-	-	-	+	-	-	-	
4	13.4	514.3626	Not identified	-	+	+	+	-	+	+	+	
5	14.5	610.4210	Not identified	-	+	+	+	-	+	+	+	
6	15.4	723.5050	C-glycosyl derivative	Simirgiotis et al. (2013)	+	+	+	+	+	+	+	
7	21.3	327.2359	Trihydroxy-octadecadienoic (C ₁₈ H ₃₁ O ₅)	Otify et al. (2015), Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	
8	22.6	329.2524	Trihydroxy-octadecadienoic (C ₁₈ H ₃₃ O ₅)	Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	
9	27.4	293.1763	Hydroxy-octadecatrienoic (C ₁₈ H ₂₉ O ₃)	Farag et al. (2016)	+	+	+	-	+	+	+	
10	32.9	265.1622	Not identified	-	-	-	+	+	+	+	+	
11	34.2	295.2443	Hydroxy-octadecadienoic acid (C ₁₈ H ₃₁ O ₃)	Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	
12	34.9	311.2216	Nonadecanoic acid, methyl ester (C ₂₀ H ₄₀ O ₂)	Farag et al. (2016)	+	+	+	+	+	+	+	
13	42.9	279.2489	Linoleic acid (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	Otify et al. (2015), Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	
14	44.9	255.2476	Palmitic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	Otify et al. (2015), Farag et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	-	

FL fluorescent lamp, BL blue LED, RL red LED, WL white LED, B-RL combination of blue and red LEDs

Presence (+) and absence (-) of substances

Table 4 Antioxidant potential of calluses derived from internodal segments of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado under different light conditions as determined by the DPPH and iron chelation assays

Light conditions	EC ₅₀ (g/L)	
	DPPH assay*	Iron chelating assay*
Dark	113 ± 3.1 ^c	3.2 ± 0.6 ^b
FL	75 ± 2.1 ^a	2.4 ± 0.005 ^a
BL	73 ± 9.4 ^a	5.8 ± 0.05 ^c
RL	78 ± 1.9 ^a	6.5 ± 0.02 ^c
WL	88 ± 2.5 ^b	3.3 ± 0.6 ^b
B-RL	91 ± 2.4 ^b	6.0 ± 0.05 ^c

FL fluorescent lamp, BL blue LED, RL red LED, WL white LED, B-RL combination of blue and red LEDs

*Data expressed as means ± standard errors. Different lowercase letters within each column indicate data statistically different ($p \leq 0.05$)

Determination of antioxidant enzymatic activity

Incubation under different light qualities significantly influenced the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and APX in calluses derived from internodal segments. The highest activities of the three enzymes were observed in calluses maintained under red LED, whereas incubation under blue LED resulted in the lowest values. Interestingly, APX specific activity was almost ten times higher in calluses incubated under different lighting conditions when compared to CAT activity (Fig. 4).

Discussion

Light has an important effect on in vitro morphogenesis, since photon flux density and wavelength assimilated through specific photoreceptors are capable of influencing cell development and secondary metabolite synthesis (Nhut et al. 2015). The influence of light on the in vitro response of plant tissues has been studied in several species (Huan and Tanaka 2004; Kapoor et al. 2018; Nadeem et al. 2019). In the present work, the lighting condition contributed more strongly to the accumulation of biomass, while the type of explant was the variable that most influenced the rate of callus induction.

Chromatographic analysis of extracts from calluses formed under blue LED showed the presence of C-glycosides flavonoids, the main group found in the genus *Passiflora* (Ozarowski and Thiem 2013; Dhawan et al. 2004). One possible explanation for this result is that blue light is capable of stimulating the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL), which is important in the phenylpropanoid pathway (Heo et al. 2012; Huché-Théliér et al. 2016). On the other hand, an increase in flavonoid production was observed in

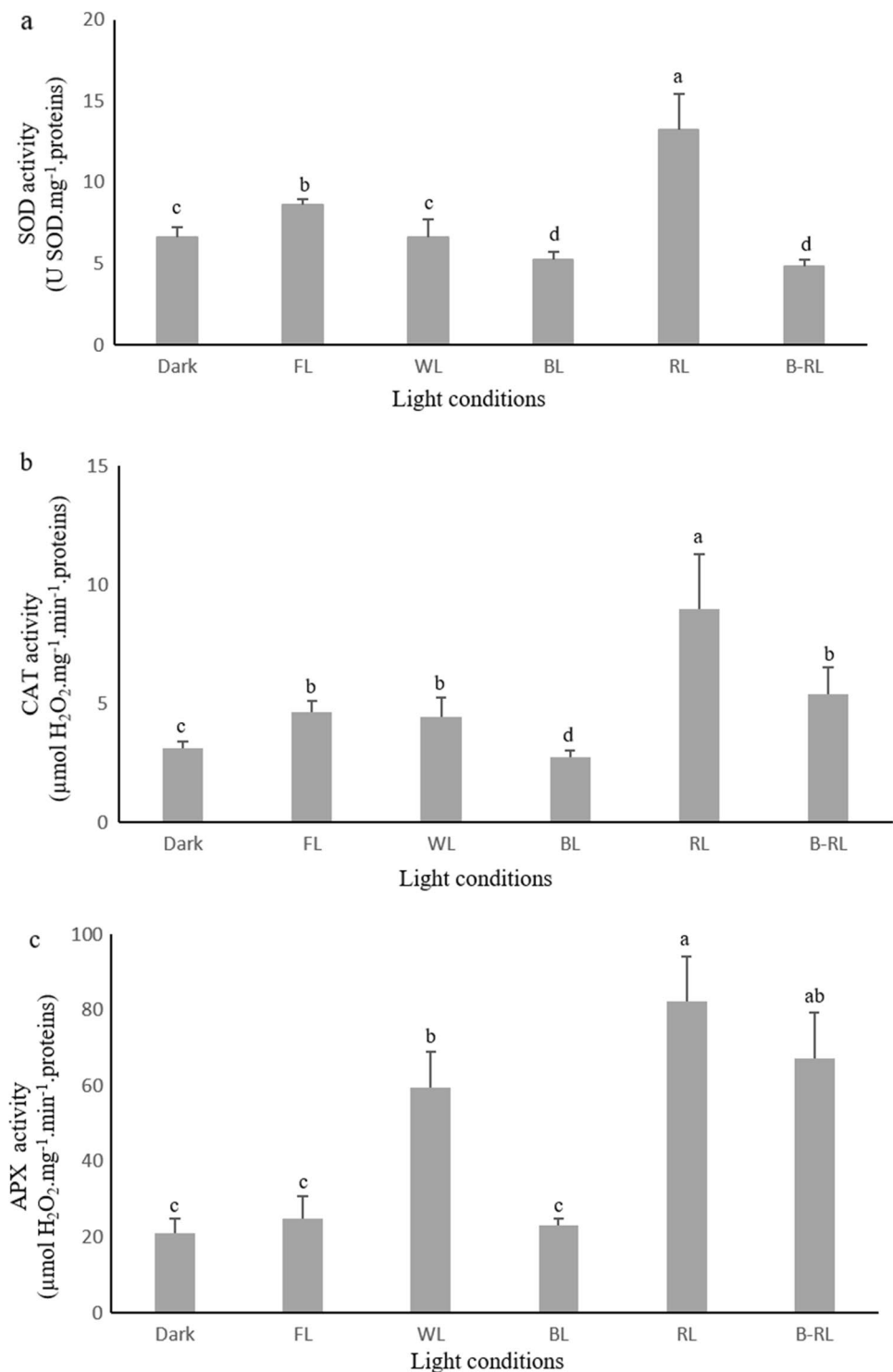
cultures under the red LED of *Ocimum basilicum* (Nadeem et al. 2019) and *Rehmannia glutinosa* (Manivannan et al. 2015). These data indicate that light-mediated synthesis of bioactive substances also depends on the species, in addition to the intensity and source of illumination used (Fazal et al. 2016). The flavonoids found in this work, isoorientin and tyrosol-O-di-hexoside have already been described in different species of *Passiflora*, including *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. incarnata* and *P. capsularis*, and associated with antioxidant, antidepressant, antimicrobial and antiviral activities (Otify et al. 2015; Farag et al. 2016; Alves et al. 2020; Tremmel et al. 2021).

The phytochemical analysis of calluses cultured under blue LED also revealed the presence of the fatty acids hydroxy-octadecadienoic, linoleic and palmitic acids. Significant levels of oleic and palmitic acids, and a high content of linoleic acid were found in seeds (Lopes et al. 2010) and aerial parts of *Passiflora* species (Otify et al. 2015; Farag et al. 2016). The presence of fatty acids in calluses is reported for the first time in the present work. Considering the role of fatty acids in plant metabolism (Sahakyan et al. 2010) and their medicinal potential as hypoglycemic (Hernández-Galicia et al. 2007), antibacterial and antifungal properties (Sati et al. 2017), their production in calluses and cells suspension systems are of great interest, since these systems allow high cellular proliferation rates and, thus, large-scale production of bioactive compounds.

Another aspect evaluated in this study was the antioxidant capacity of callus extracts, using two distinct methodologies, DPPH radical scavenging and iron chelating assays, considering that different approaches are recommended in order to estimate the actual antioxidant potential of a given material (Shahidi and Zhong 2015). Although all samples displayed low antioxidant potential by the DPPH assay, a higher antioxidant activity was observed in the iron chelating assay, with EC₅₀ values ranging between 2.4 and 6.5 g/L. Similar results were observed in leaves and fruit pulp of *Passiflora subpeltata* (Saravanan et al. 2014; Shanmugam et al. 2018), and leaves of *P. leschenaultia* (Shanmugam et al. 2019), suggesting that the antioxidant compounds present in calluses extracts are able to complex metal ions, especially copper and iron, instead of donating hydrogen atoms or electrons to a free radical (Reische et al. 2002).

In addition, the activity of antioxidant enzymes was evaluated, since they reflect the responses to oxidative stress, playing an important role in the complex mechanisms of ROS elimination (Reische et al. 2002). LED lighting systems induce different levels of photooxidative stress, changes in the antioxidant defense system (Gupta and Sahoo 2015). In this work, we observed an increase in the activities of SOD, CAT and APX in calluses derived from internodal segments maintained under red LED, suggesting that there was a higher production of

Fig. 4 Antioxidant enzymes activities in calluses derived from internodal segments of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado induced on MSM medium supplemented with $41.4\mu\text{M}$ PIC and maintained under different light conditions. **a** SOD activity, **b** CAT activity, **c** APX activity. Bars represent means and standard errors. Different letters within columns indicate statistically differences (Tukey test, $p \leq 0.05$). *FL* fluorescent lamp, *BL* blue LED, *RL* red LED, *WL* white LED, *B-RL* combination of blue and red LEDs



ROS in these materials. Calluses produced under red LED showed higher activity of antioxidant enzymes, possibly as a response to a greater oxidative stress. However, the maintenance of the cultures under red LED was not harmful for the induction and multiplication of calluses, indicating a balance between the production and elimination of ROS. Several reports have also described the influence of

different types of LED on the enzymatic antioxidant system. For example, in *Camptotheca acuminata* blue LED increased the activity of both SOD and CAT (Yu et al. 2017), whereas in *Rehmannia glutinosa*, red and blue LED lead to greater activities of APX, SOD and CAT, when compared to cultures maintained under fluorescent white lamps (Manivannan et al. 2015).

In conclusion, our study demonstrates the influence of different types of explants and light qualities on induction, biomass accumulation and bioactive compounds production in calluses of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado. Callus incubation under red LED significantly increased the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and APX, probably as a response to the elevated photooxidative stress caused by this wavelength. Moreover, callus extracts showed great capacity to chelate iron ions. On the other hand, maintenance under blue LED induced the production of fatty acids and flavonoids. These compounds have potential use in the pharmaceutical and cosmetics industries, especially due to their previously described antibacterial, antioxidant and antifungal activity. Taken together, our results open possibilities of study and utilization of *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado, a new alternative to the passion fruit market.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Raphaela Santos-Tierno, Renata Garcia, Eduardo Fonseca, Fábio Faleiro and Davyson Moreira. Supervision: Georgia Pacheco and Elisabeth Mansur. The first draft of the manuscript was written by Raphaela Santos-Tierno and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) [Grant Number E-26/010.001840/2019], and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant Number 310238/2018-8]. This study was also funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [Finance-Code 001].

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alves J, Marques J, Demarque D, Costa L, Amaral J, Lopes N, Silva-Júnior A, Soares L, Gavioli E, Ferreira L, Zucolotto S (2020) Involvement of isorientin in the antidepressant bioactivity of a flavonoid-rich extract from *Passiflora edulis* f. flavicarpa Leaves. *Rev Bras Farmacogn* 30:1–11. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00003-x>
- Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F, Biondi S (2007) Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia* 78:345–352
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* 104:280–292
- Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KM, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arenciba AD, Otoni WC (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In vitro Cell Dev Biol – Plant* 54:195–215
- Braga MF, Santos EC, Junqueira NTV, Sousa AATC, Faleiro FG, Rezende LN, Junqueira KP (2006) Cutting rooting of three wild *Passiflora* species. *Rev Bras Frutic* 28:284–288
- Brazilian Pharmacopoeia (2019) Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 6th edn. Ministério da Saúde, Brasília
- Carvalho MVO, Oliveira LL, Costa AM (2018) Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. *Food Chem* 266:350–358
- Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K (2020) Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 26:e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>
- Chew YL, Goh JK, Lim YY (2009) Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem* 116:13–18
- Corrêa RCG, Peralta RM, Haminiuk CWI, Maciel GMM, Bracht A, Ferreira ICFR (2016) The past decade find ingrelated with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). *Trend in Food Science Technology* 58:79–95
- Cotinguiba GG, Silva JRN, Azevedo RRS, Rocha TJM, Santos AF (2013) Methods of the antioxidant defense: A Literature Review. *J Health Sci* 15(3):231–237
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004) *Passiflora*: a review update. *J Ethno pharmacol* 94:1–23
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Jungmans TG, Jesus ON, Miranda D, Otoni WC (2019) Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Rev Bras Frutic* 41(2):e–e155
- Farag MA, Otify A, Porzel A, Michel CG, Elsayed A, Wessjohann LA (2016) Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. *Anal Bioanal Chem* 408:3125–3143
- Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali SS, Akbar F, Kanwal F (2016) Correlation of different spectral lights with biomass accumulation and production of antioxidant secondary metabolites in callus cultures of medicinally important *Prunella vulgaris* L. *J Photochem Photobiol B Biol* 159:1–7
- Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E (2011) 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 Tiss Organ Cult* 106:47–54
- Garcia LC, Garcia R, Mansur E, Sutili F, Souza R, Mansur E, Leal I (2016) Optimized extraction of resveratrol from *Arachis repens* Handro by ultrasound and microwave: a correlation study with the antioxidant properties and phenol contents. *Sci World J*. <https://doi.org/10.1155/2016/5890897>
- Gosmann G, Provensi G, Comunello LN, Rates SMK (2011) Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Biosciences* 9(1):88–99
- Gupta SD, Sahoo TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Acta Physiol Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1990-9>
- He X, Luan F, Yang Y, Wang Z, Zhao Z, Fang J, Wang M, Zuo M, Li Y (2020) *Passiflora edulis*: An insight into current researches

- on phytochemistry and pharmacology. *Front Pharmacol* 11:617. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>
- Heo J-W, Kang D-H, Bang H-S, Hong S-G, Chun C-H, Kang K-K (2012) Early growth, pigmentation, protein content, and phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuces grown under different lighting conditions. *Korean J Hortic Sci Technol* 30:6–12
- Hernández-Galicia E, Calzada F, Roman-Ramos R, Alarcón-Aguilar FJ (2007) Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: Isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med* 73:236–240
- Huan LVT, Tanaka M (2004) Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. *Environ Control Biol* 42:57–64
- Huché-Théliet L, Crespel L, Le Gourrierec J, Morel P, Sakr S, Leduc N (2016) Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—perspectives for applications in horticulture. *Environ Exp Bot* 121:22–38
- Kapoor S, Raghuvanshi R, Bhardwaj P, Sood H, Saxena S, Chaurasia OP (2018) Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricate* Edgew. *J Photochem Photobiol B* 183:258–265
- Leal AEBP, Oliveira AP, Santos RF, Soares JMD, Lavor EM, Pontes MC, Lima JT, Santos ADC, Tomaz JC, Oliveira GG, Neto FC, Lopes NP, Rolim LA, Almeida JRGS (2020) Determination of phenolic compounds, *in vitro* antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. *Nat Prod Res* 34(7):995–1001
- Lopes RM, Sevilha AC, Faleiro F, Silva DB, Vieira RF, Agostini-Costa TS (2010) A comparative study of fatty acids profile of *Passiflora* seed from Brazilian savanna. *Rev Bras Frutic* 32:498–506. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000065>
- Lugato D, Simão M, Garcia R, Mansur E, Pacheco G (2014) Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118:339–346
- Mamede AMGN, Soares AG, Oliveira EJ, Farah A (2017) Volatile composition of sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis). *J Chem*. <https://doi.org/10.1155/2017/3497216>
- Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hortic Environ Biotech* 56(1):105–113
- Mattos PRC, Gomes AS, Pereira SF (2015) Volatile compounds in passion fruit seed oil (*Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado and *Passiflora alata* BRS Doce Mel). *Chem Eng Trans* 44:103–108
- Mikovski AI, Silva NT, Souza CS, Machado MD, Otoni WC, Carvalho IF, Rocha DI, Silva ML (2019) Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. *Ornam Hortic* 25:189–199. <https://doi.org/10.14295/oh.v25i2.2036>
- Monteiro ABC, Higashi EN, Gonçalves NA, Rodriguez APM (2000) 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 Cell Dev-Plant* 36:527–531
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nadeem M, Abbasi BH, Younas M, Ahmad W, Zahir A, Hano C (2019) LED enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. *J Photochem Photobiol B* 190:172–178
- Nhut DT, Nguyen H, Ngo T, Nguyen N, Vu L, Vu H, Tung H, Bui VTV, Tran L (2015) Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 29:299–308. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.1000210>
- Otify A, George C, Elsayed A, Farag MA (2015) Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. *Food Function* 6:3807–3817
- Ozarowski M, Thiem B (2013) Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Rev Bras Farmacogn* 23:937–947
- Ozarowski M, Piasecka A, Paszel-Jaworska A, Siqueira Chaves D, Romaniuk A, Rybczynska M, Gryszczynska A, Sawikowska A, Kachlicki P, Mikolajczak P, Seremak-Mrozikiewicz A, Klejewski A, Thiem B (2018) 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. *Braz J Pharmacogn* 28:179–191
- Patel SS, Mishra HSK, Singhai AK (2011) Recent updates on the genus *Passiflora*: a review. *Res Phytochem Pharmacol* 1:1–16
- Ramaiya SD, Lee HH, Xiao YJ, Shahbani NS, Zakaria MH, Bujang JS (2021) Organic cultivation practices enhanced antioxidant activities and secondary metabolites in giant granadilla (*Passiflora quadrangularis* L.). *PLoS ONE* 16(7):e0255059
- Rangel Junior IM, Vasconcellos MAS, Rosa RCC, Cruvinel FF (2018) Floral biology and physicochemical characterization of wild passion fruit *Passiflora setacea* D.C. BRS Pérola do Cerrado cultivated in the state of Rio de Janeiro. *Rev Bras Frut* 40(6):e041
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR (2002) Antioxidants. In: Akoh CC, Min DB (eds) *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp 507–534
- Rotta EM, Rodrigues CA, Jardim ICSF, Maldaner L, Visentainer JV (2019) Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (*Passiflora* spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *LWT Food Sci. Technol. Int.* 100:397–403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.052>
- Sahakyan NZH, Petrosyan MT, Popov YG, Volodin VV, Matistov NV, Gruzdev IV, Shirshova TI (2010) Content of Neutral Lipids and Fatty Acids in Callus Cultures and Leaves of Intact Plants of *Ajuga genevensis* and *Ajuga Chia*. *Biotechnol Biotechnol Eq.* 24(sup1):87–90
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FA (1998) Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 76:270–276
- Saravanan S, Arunachalam K, Parimelazhagan T (2014) Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. *Ind Crops Prod* 54:272–280
- Sati A, Sati SC, Sati N, Sati OP (2017) Chemical composition and antimicrobial activity of fatty acid methyl ester of *Quercus leucotrichophora* fruits. *Nat Prod Res*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1217202>
- Shahidi F, Zhong Y (2015) Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 18:757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Shanmugam S, Gomes IA, Denadai M, Lima BS, Araújo AAS, Narain N, Neta MTAL, Serafini MR, Quintans-Júnior LJ, Thangaraj P (2018) UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. *Food Res Int* 108:611–620
- Shanmugam S, Murugaiyan I, Lima BS, Serafini MR, Araújo AAS, Narain N, Quintans-Júnior LJ, Thangaraj P (2019) HPLC-DAD-MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. *Arabian J Chem* 12:760–771
- Simão MJ, Fonseca E, Garcia RO, Mansur E, Pacheco G (2016) 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 Tiss Organ Cult* 124:419–430
- Simão MJ, Barbosa TJS, Vianna MG, Garcia R, Mansur E, Ignacio ACPR, Pacheco G (2018) A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of *in vitro* derived materials of four *Passiflora* species. *Annals Acad Bras Cienc* 90(3):2805–2813
- Simirgiotis MJ, Schmeda-Hirschmann G, Bórquez J, Kennelly EJ (2013) The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules* 18(2):1672–1692. <https://doi.org/10.3390/molecules18021672>
- Smruthi R, Divya M, Archana K, Ravi M (2021) The active compounds of *Passiflora* spp and their potential medicinal uses from both *in vitro* and *in vivo* evidences. *J Adv Biomed Pharm Sci* 4:45–55
- Sozo JS, Cruz DC, Pavei AF, Pereira IMC, Wolfart M, Ramlöv F, Montagner DF, Maraschin M, Viana AM (2016) *In vitro* culture and phytochemical analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). In: Jain S (ed) *Protocols for in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants, vol 1391, 2nd edn. Humana Press, New York, pp 13–30
- Tremmel M, Kiermaier J, Heilmann J (2021) *Vitro* metabolism of six C-glycosidic flavonoids from *Passiflora incarnata* L. *Int J Mol Sci* 22:6566. <https://doi.org/10.3390/ijms22126566>
- Viana ML, Costa AM, Celestino SMC (2016) Informations for the composition of nutritional table of the Passion fruit pulp BRS Pérola do Cerrado. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Cerrados* 335:17–18
- Vianna MG, Garcia RO, Mansur E, Engelmann F, Pacheco G (2019) Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 139:369–379
- Wang C, Xu F, Shang J, Xiao H, Fan W, Dong F, Hu J, Zhou J (2013) Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. *J Ethnopharmacol* 148:812–817
- Yu W, Liu Y, Song L, Jacobs DF, Du X, Ying Y, Shao Q, Wu J (2017) Effect of differential light quality on morphology, photosynthesis, and antioxidant enzyme activity in *Camptotheca acuminata* seedlings. *J Plant Growth Regul* 36:148–160
- Zas P, John S (2017) Phytochemical investigation and antioxidant activities of *Passiflora edulis* (Passion fruit) leaves from Ukhrul district, Manipur, India. *World J Pharm Res* 6:793–801
- Zeraik ML, Pereira CAM, Zuin VG, Yariwake JH (2010) Maracujá: um alimento funcional? *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20:459–471
- Zhao J, Fujita K, Sakai K (2005) Oxidative stress in plant cell culture: a role in production of beta-thujaplicin by *Cupressus lusitanica* suspension culture. *Biotechnol Bioeng* 90(5):62131. <https://doi.org/10.1002/bit.20465>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ANEXO B - Artigo intitulado “Flavonoid content and antioxidant potential of leaf extracts of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado, a new wild passion fruit cultivar” publicado na revista *Journal of Medicinal Plant Research* no dia 28 de Fevereiro de 2022.

Full Length Research Paper

Flavonoid content and antioxidant potential of leaf extracts of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado, a new wild passion fruit cultivar

Raphaela Santos-Tierno¹, Renata Garcia¹, Eduardo Fonseca¹, Fábio Faleiro², Davyson Moreira³, Georgina Pacheco¹ and Elisabeth Mansur^{1*}

¹Núcleo de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

²Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil.

³Laboratório de Produtos Naturais, Diretoria de Pesquisa, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Received 7 October 2021; Accepted 30 December 2021

***Passiflora setacea* D.C. is a wild species native to the Brazilian Cerrado, with agronomic and medicinal potentials. The cultivar BRS Pérola do Cerrado is the first registered and protected cultivar of a wild *Passiflora* and has become an alternative to the passion fruit market due to its desirable characteristics for food, ornamental and pharmaceutical industries. Since plant tissue culture techniques are considered important tools for large-scale production of plants and bioactive compounds, the goal of this work was to evaluate the flavonoid content and the antioxidant potential of hydroethanolic leaf extracts from *in vivo* and micropropagated plants of this new cultivar. Phytochemical analysis was performed by HPLC-UV-ESI-MS/TOF. Antioxidant activity was evaluated by the DPPH and the iron-chelating assays. The activities of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase (CAT, SOD and APX) were also determined. Two di-C-glucosyl flavonoids derivatives from apigenin were registered as major constituents in both leaf extracts analyzed and were identified as vicenin-2 and schaftoside. Despite the low antioxidant potential observed by the DPPH assay, leaf extracts from both *in vivo* and micropropagated plants showed high chelating capacity. Although no differences in the activity of SOD and CAT were observed, the specific activity of APX was increased in leaf extracts of micropropagated plants. These results suggest that *in vitro* plants can be used as an alternative for flavonoid production from cultivar BRS Pérola do Cerrado.**

Key words: Flavonoid content, phytochemical analysis, antioxidant potential, leaf extracts, *Passiflora setacea*.

INTRODUCTION

The genus *Passiflora* comprises approximately 525 species, grouped into five subgenera that are found in tropical and subtropical regions. It is considered the most

economically important genus of the Passifloraceae family, since some species are consumed *in natura* or in the food industry. It also has a great ornamental potential

*Corresponding author. E-mail: elisabeth.mansur@gmail.com.

due to the diversity of colors and shapes of its flowers (Faleiro et al., 2019). Moreover, some species are well known in folk medicine worldwide because of their pharmacological activities as sedatives, anxiolytics, analgesics, and anti-inflammatories. Several compounds, such as flavonoids, alkaloids and saponins have been identified in their fruits, leaves, flowers, stems and roots (Smruthi et al., 2021).

Passiflora setacea D.C. is a wild species native to the Brazilian Cerrado, with edible fruits, resistant to *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora*, and to the *Passion fruit woodiness virus* (PWV) (Braga et al., 2006; Pereira et al., 2019). It is also used in folk medicine in the treatment of insomnia (Carvalho et al., 2018). The cultivar BRS Pérola do Cerrado, launched in 2013 by Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), is the first registered (RNC N° 21714) and protected cultivar of a wild *Passiflora* species (SNPC Certificate N° 20120197) (Viana et al., 2016). Its fruits are rich in mineral salts as well as phenolic compounds and proanthocyanidins, which are associated to antioxidant activity (Carvalho et al., 2018). Hence, it has become an alternative to the passion fruit market due to its desirable characteristics for food, ornamental and pharmaceutical industries (Faleiro et al., 2018).

Plant tissue culture techniques are considered important tools for large-scale production of bioactive compounds, since *in vitro* cultures allow high plant multiplication rates and the modulation of both morphogenic and biosynthetic capacities by modifying physical and chemical parameters (Chandran et al., 2020). Several authors have reported *in vitro* production of bioactive substances in *Passiflora* species, including flavonoids, in micropropagated plants of *Passiflora caerulea* L., *Passiflora incarnata* L. (Ozarowski and Thiem, 2013) and *Passiflora foetida* L. and *Passiflora suberosa* L. (Simão et al., 2018).

The stressful *in vitro* conditions may induce the accumulation of reactive oxygen species (ROS), leading to lipid peroxidation, protein oxidation and even cell death (Pashkovskiy et al., 2018). Although ROS formation is considered a normal physiological process and an important cell signaling element, their overproduction may exceed the antioxidant capacity of the cells, resulting in oxidative stress (Kim et al., 2017). In order to maintain basal levels of ROS and protect against oxidative stress, plant cells exhibit both non-enzymatic and enzymatic defenses (Yu et al., 2017).

Non-enzymatic antioxidant systems include flavonoids, which are commonly found in leaves and fruits of *Passiflora* spp. and have been used as chemical markers in the genus, due to their structural diversity and chemical stability (Gosmann et al., 2011). Most of them are classified as C-glucosyl flavonoids derived from apigenin and luteolin, and frequently found as isomers (Ozarowski et al., 2018). Some authors have already reported the presence of the flavonoids orientin, isorientin, vitexin,

vitexin-2''-O-rhamnoside and isovitexin, as well as acid ascorbic, polyamines, terpenes and carotenoids, in leaf and fruit pulp extracts from *P. setacea* and in its cultivar BRS Pérola do Cerrado (Santana et al., 2015; Bomtempo et al., 2016; Gomes et al., 2017; Wosch et al., 2017; Carvalho et al., 2018; Sanchez et al., 2020; da Rosa et al., 2021).

The objective of this work was to evaluate the flavonoid content and the antioxidant potential of hydroethanolic leaf extracts from *in vivo* and micropropagated plants of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions

Seeds of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado were gently provided by Embrapa Cerrados, Brazil. Seeds were transferred to pots containing Plantmax® substrate for germination, and *in vivo*-grown plants (Figure 1a) were maintained in a greenhouse for twelve months. Micropropagated plants (Figure 1b), derived from *in vitro* seed germination, were obtained as described by Santos-Tierno et al. (2021) and maintained by bimonthly subcultures of stem segments (3 cm) on solidified half-strength MSM medium (MSM ½) (Monteiro et al., 2000). Plants were incubated in a growth chamber at 25±2°C under a 16 h photoperiod, using a total irradiance of 46 µmol m⁻² s⁻¹ provided by cool-white fluorescent lamps (Philips F40 CW).

Extract preparation

Leaves from *in vivo* and micropropagated plants were lyophilized for five days, then powdered and weighed. In order to determine the best flavonoid extraction procedure, the extracts from *in vivo*-grown plants were initially prepared using two methodologies: i) 40% ethanol (Tedia®, Brazil) under reflux for 1 h (Birk et al., 2005), or ii) maceration in 90% ethanol with ultrasound-assisted extraction for 15 min. After that, extracts from leaves of *in vivo* and micropropagated plants were prepared following the selected extraction procedure, using 1:50 plant:solvent (w/v). The solvents were then evaporated in a rotary evaporator (Marconi – M120) at 40°C, before solubilization in methanol (Tedia®, Brazil). The yield of the extracts was calculated as follows:

$$[\text{extract (g)}/\text{dried sample (g)}] \times 100.$$

Qualitative HPLC-DAD-UV analysis High-Performance

High-Performance Liquid Chromatography coupled to a Diode-Array Detector (HPLC-DAD-UV) was carried out using the Shimadzu Liquid Chromatograph system according to Costa et al. (2011), with modifications. The analyses were performed using a Thermo-Scientific® Hypersil Gold RP18 column (250 mm × 4.6 mm i.d. × 5 Å particle size), at a flow rate of 1.0 mL/min and oven temperature at 25°C. Leaf extracts from *in vivo* plants were solubilized in methanol at a final concentration of 1.0 mg/mL and the injected volume was 10 µL. "The mobile phase consisted of solvents A (MilliQ® water acidified with 1% glacial acetic acid, pH adjusted to 3.0) and B (acetonitrile)," with the following gradient elution: 95% of A and 5% of B (0 - 2 min); 95 - 80% of A and 5 - 20% of B (2 - 30 min); 80% of A and 20% of B (30 - 40 min). All solvents were HPLC grade (Tedia®, Brazil). The UV absorption was



Figure 1. Plants of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado. a) *In vivo*-grown plant maintained at greenhouse conditions for 12 months; b) Micropropagated plants maintained *in vitro* for two months. Bar = 4.0 cm.

monitored at 340 nm.

HPLC-UV-ESI-MS/TOF analysis

Extracts of leaves from *in vivo* and micropropagated plants were also analyzed by High-Performance Liquid Chromatography coupled to UV detector and coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometer Detector (MicroTOF II Mass Spectrometer, Bruker Daltonics, MA, USA) equipped with electrospray ionization (200°C - 9 μ L/min - 4 psi) (HPLC-UV-ESI-MS/TOF). The analysis was performed using the same column and conditions described for HPLC-DAD-UV. Electrospray ion source (ESI)-MS spectra were acquired in both positive and negative ion modes and recorded in the range of m/z 50 to 1000, using nitrogen as the nebulizing gas (400 L/h), at 250°C. The ionization energy applied was 10 eV for both positive and negative modes. UV spectral data were recorded at 340 nm. Compounds identification was carried out by comparing the exact experimental mass of the pseudomolecular ion $[M-H]^-$ with those of the MassBank (High Quality Mass Bank Database, available at <https://massbank.eu/MassBank/>), as well as UV spectrum, elution order and considering flavonoids previously identified in *Passiflora* genus.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant potential of leaf extracts was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity assay (Sánchez-Moreno et al., 1998), and the iron chelating assay was carried out according to Chew et al. (2009).

The extract concentrations (g/L) required for quenching 50% of the initial DPPH radicals or quelating 50% of the Fe^{2+} (EC_{50}), were determined graphically. The same procedure was carried out with quercetin (0.01 to 0.15 g/L) and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (0.001 to 0.03 g/L) solutions that were used as standard.

Evaluation of antioxidant enzymes activity

Protein extracts were prepared from fresh leaves (300 mg), according to Azevedo et al. (1998). The activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were determined according to Vianna et al. (2019).

Statistical analysis

The assays for determining the antioxidant potential and activities of antioxidant enzymes were carried out in triplicates, in two independent experiments. Statistical evaluation of experimental data was performed by analysis of variance (ANOVA), followed by the post-test Tukey-Kramer for comparing all pairs of columns (0.05% significance level), using GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, in order to determine the best flavonoid extraction procedure for *P. setacea* cv BRS Pérola do

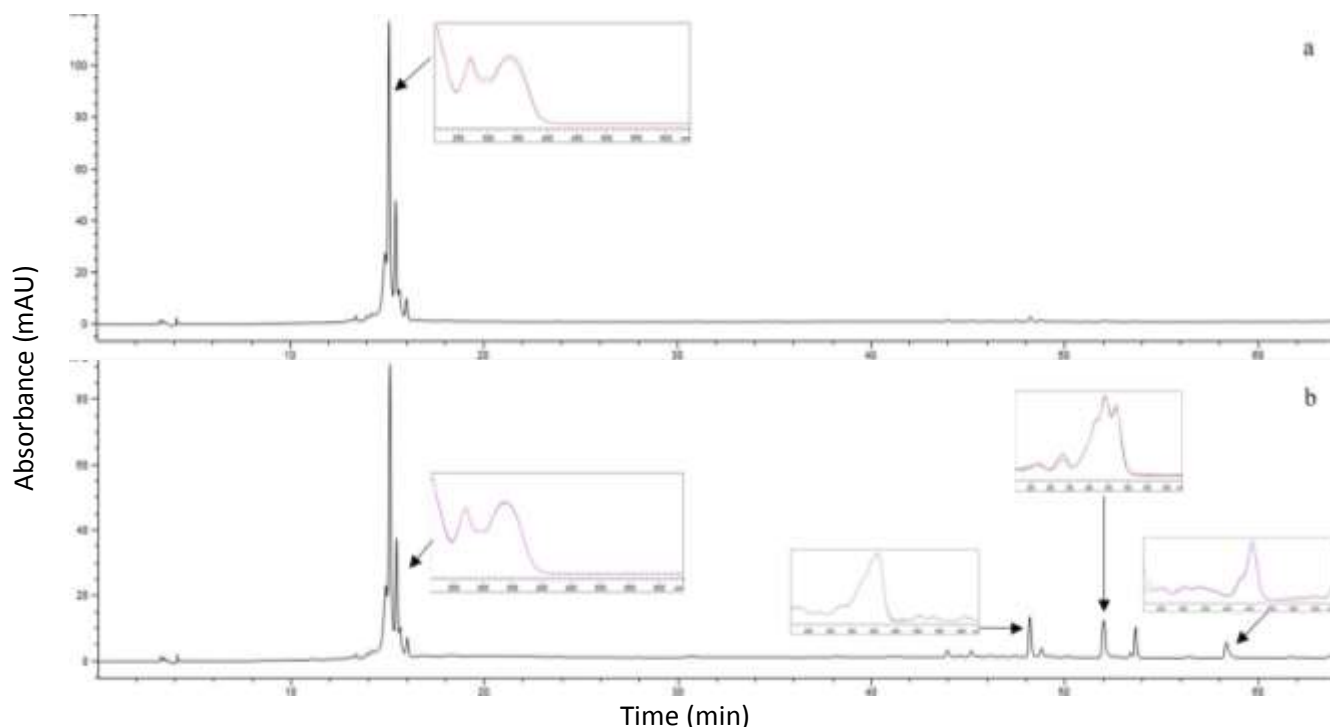


Figure 2. HPLC-DAD-UV analysis of leaf extracts from *in vivo*-grown plants of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado using two extraction methodologies. (a) Reflux for 1h (40% ethanol); (b) Ultrasound-assisted extraction for 15 min (90% ethanol). Detail shows the UV spectra of the peaks.

Cerrado, two methods were evaluated using leaves from *in vivo*-grown plants. Preliminary HPLC-DAD-UV analysis revealed more peaks when the extract was prepared with 90% ethanol using the ultrasound-assisted method in comparison to the extract prepared with 40% ethanol under reflux (Figure 2). Four compounds, with retention times ranging from 43 to 58 min and typical UV-vis spectra of carotenoids, were exclusively detected in the extracts prepared with the ultrasound-assisted method. This result could be associated with the higher levels of ethanol used by the extraction process, in addition to the propagation of ultrasonic waves, which disorganize the cell wall and cause leaking of cellular contents (Gunathilake et al., 2017; Castañeda-Valbuena et al., 2021).

Considering the extraction efficiency and the shorter maceration period required (15 min), the ultrasound-assisted method was selected for the subsequent analyses. The yields of the leaf extracts from both *in vivo* and micropropagated plants obtained by the ultrasound-assisted method were 14.80 and 13.38%, respectively.

Compounds identification in leaf extracts from both *in vivo* and micropropagated plants performed by HPLC-UV-ESI-MS/TOF analyses revealed similar chromatographic profiles. The exact masses of the pseudomolecular ions $[M-H]^-$ were compared with literature data as described in the experimental and afforded compounds 1 to 8 (Table 1 and Figure 3).

Sucrose and digalacturonic acid, commonly found in plant extracts and in the culture medium, were identified in the beginning of the chromatographic run. Two major constituents were registered in both leaf extracts: compound 6 at Rt 13.1 min (vicenin-2; $[M-H]^- = 593.1951$; $C_{27}H_{29}O_{15}$) and compound 7 at Rt 13.4 min (schaftoside; $[M-H]^- = 563.1824$; $C_{26}H_{27}O_{14}$). Other apigenin-C-glucosyl-derivatives were detected in minor amounts. Apigenin-6-C-glucoside or isovitexin (Rt = 13.9 min, $M-H^- = 431.1289$; $C_{21}H_{19}O_{10}$) was detected in both leaf extracts. On the other hand, apigenin-6-C-glucoside-7-O-glucoside (Rt = 11.5 min; $[M-H]^- = 593.1958$; $C_{27}H_{29}O_{15}$) and apigenin-8-C-glucoside-7-O-glucoside (Rt = 12.8 min; $[M-H]^- = 593.1943$; $C_{27}H_{29}O_{15}$) were only detected in leaves from micropropagated plants. The modulation of bioactive compounds production in *in vitro* systems was also observed for *Poliomintha glabrescens* (García-Pérez et al., 2011), *Salvia dolomitica* (Bassolino et al., 2015), *Agave salmiana* (Puente-Garza et al., 2017) and *Kaempferia parviflora* (Park et al., 2021).

The two major constituents from both leaf extracts studied here, vicenin-2 and schaftoside, have already been identified in *Passiflora* spp. (Araújo et al., 2017; Farag et al., 2016; Sakalem et al., 2012; Zucolotto et al., 2011). Vicenin-2 has been detected in extracts from pericarp of *Passiflora edulis* (Sena et al., 2009; Zucolotto et al., 2009) and extracts from leaves and fruit pulp of *Passiflora tripartite* (Zucolotto et al., 2011; Simirgiotis et

Table 1. Compounds detected by HPLC-UV-ESI-MS/TOF analysis in leaf extracts of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado

S/N	Rt (min)	[M-H] ⁻	Molecular Formula	Suggested Compound	Reference	Plant Extract		Relative area (%) extract leaf	
						<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> plants	Micropropagated plants
1	3.2	341.1044	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	Sucrose	-	+	+	36.2	67.9
2	3.5	369.0655	C ₁₂ H ₁₇ O ₁₃	Digalacturonicacid	-	-	+	-	32.3
3	4.4	739.3424	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	Luteonin-7-O-dirhamnoside 3'-O-glucoside	Sakalem et al. (2012)	-	+	-	47.3
4	11.5	593.1958	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Apigenin-6-C-glucoside-7-O-glucoside	Ozarowski et al. (2018)	-	+	-	7.8
5	12.8	593.1943	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Apigenin-8-C-glucoside-7-O-glucoside	Cvetkovikj et al. (2013)	-	+	-	5.3
6	13.1	593.1951	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Vicenin-2 (apigenin-6,8-C-diglucoside)	Sakalem et al. (2012); Araujo et al. (2017)	+	+	100	100
7	13.4	563.1824	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	Schaftoside (apigenin-6-C-glucoside-8-C-riboside)	Sakalem et al. (2012); Farag et al. (2016); Araujo et al. (2017)	+	+	59.8	45.4
8	13.9	431.1289	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	Isovitexin (apigenin-6-C-glucoside)	Zucolotto et al. (2011); Farag et al. (2016)	+	+	8.8	5.7

Compounds 3-6 showed UV λ_{max} at 270 and 350 nm.

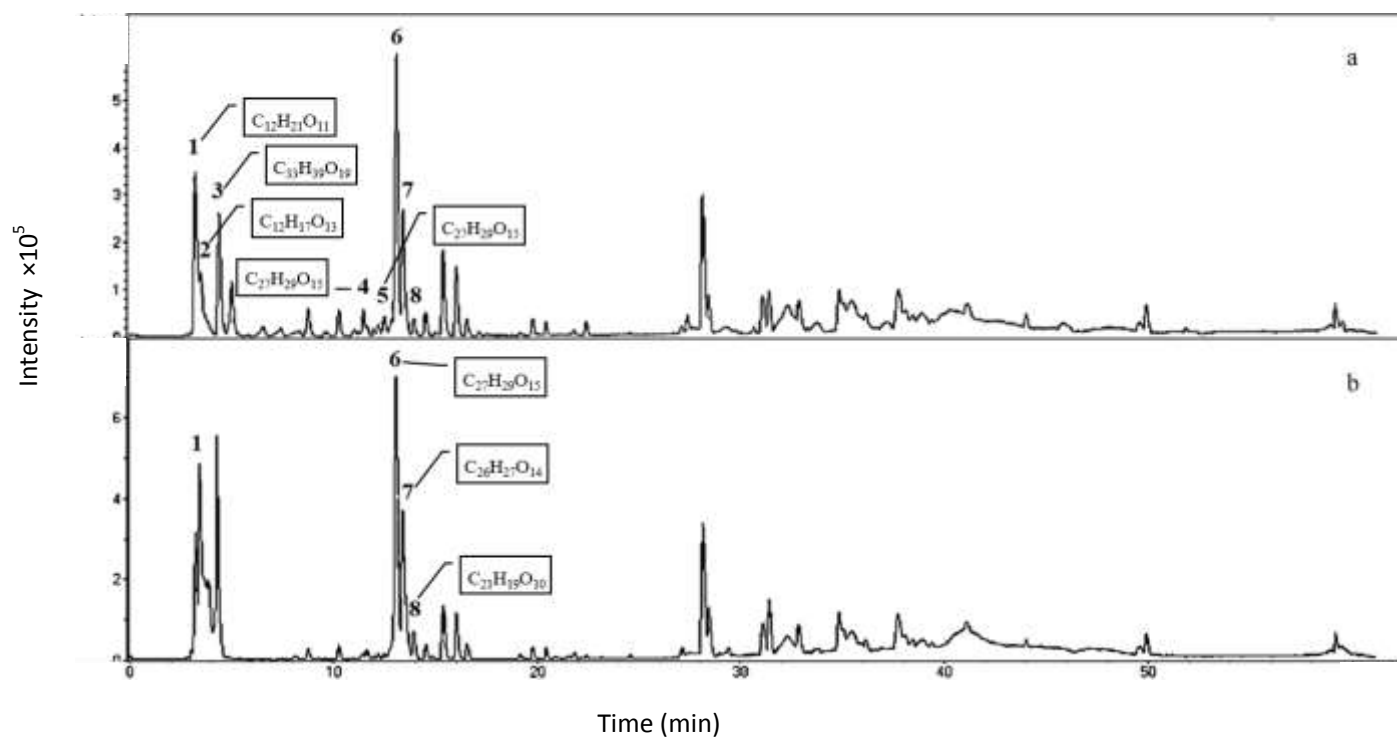


Figure 3. HPLC-ESI-MS analysis (negative mode) of leaf extracts of *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. a) Micropropagated plants; b) *In vivo*-grown plants.

Table 2. Antioxidant potential of leaf extracts of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado as determined by the DPPH and iron chelating assays.

Sample	EC ₅₀ (g/L)	
	DPPH assay*	Iron chelating assay*
Quercetin	0.04±0.005 ^a	-
EDTA	-	0.001±0.004 ^a
<i>In vivo</i> plants	64 ± 6.1 ^b	1.9 ± 0.1 ^b
Micropropagated plants	64.4 ± 1.8 ^b	2.5 ± 0.07 ^c

*Data expressed as means ± standard errors. Different lowercase letters within each column indicate data statistically different (Tukey test, $p \leq 0.05$).

al., 2013). Schaftoside has been reported as the major constituent of *P. incarnata* (Abourashed et al., 2002) and in leaf extracts of *Passiflora mucronata* (Da Silva et al., 2018). Both flavonoids have been associated with sedative, anxiolytic and analgesic activities (Sakalem et al., 2012). In addition, vicenin-2 has been related to antiplatelet and anticoagulant activities (Lee and Bae, 2015), whereas schaftoside has been recently reported to be effective against the coronavirus SARS-CoV-2 (Yalçın et al., 2021).

The antioxidant potential of extracts from leaves of *in vivo* and micropropagated plants of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado was also evaluated using two distinct techniques, the DPPH and iron chelation assays. Although several reports have studied the antioxidant potential of *Passiflora* species by the DPPH assay (Silva et al., 2013), the use of different and complementary techniques must be taken into consideration since plant-derived compounds may show distinct mechanisms of action (Santos-Sánchez et al., 2019).

The DPPH radical scavenging capacity assay revealed a low antioxidant potential, with EC₅₀ values of 64 ± 6.1 and 64.4 ± 1.8 g/L in extracts from *in vivo* and micropropagated plants, respectively (Table 2). On the other hand, these extracts showed high iron chelating capacity, with significantly low EC₅₀ values. Higher chelating capacity was observed in leaves from *in vivo*-grown plants when compared with micropropagated plants (EC₅₀ values 1.9 ± 0.1 and 2.5 ± 0.1 g/L, respectively) (Table 2). Since flavonoids with 5-hydroxy-4-keto-2,3-double bond are able to chelate iron ions (Mladěnka et al., 2011), it is possible that this difference can be explained by the action of the apigenin type flavonoids that were found in this study (Table 1). Similar results were observed in root and rhizome extracts of *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis* (Wang et al., 2010a), root extracts of *Periploca sepium* (Wang et al., 2010b) and buds extracts of *Brassica oleracea* L. (Köksal and Gülçin, 2008).

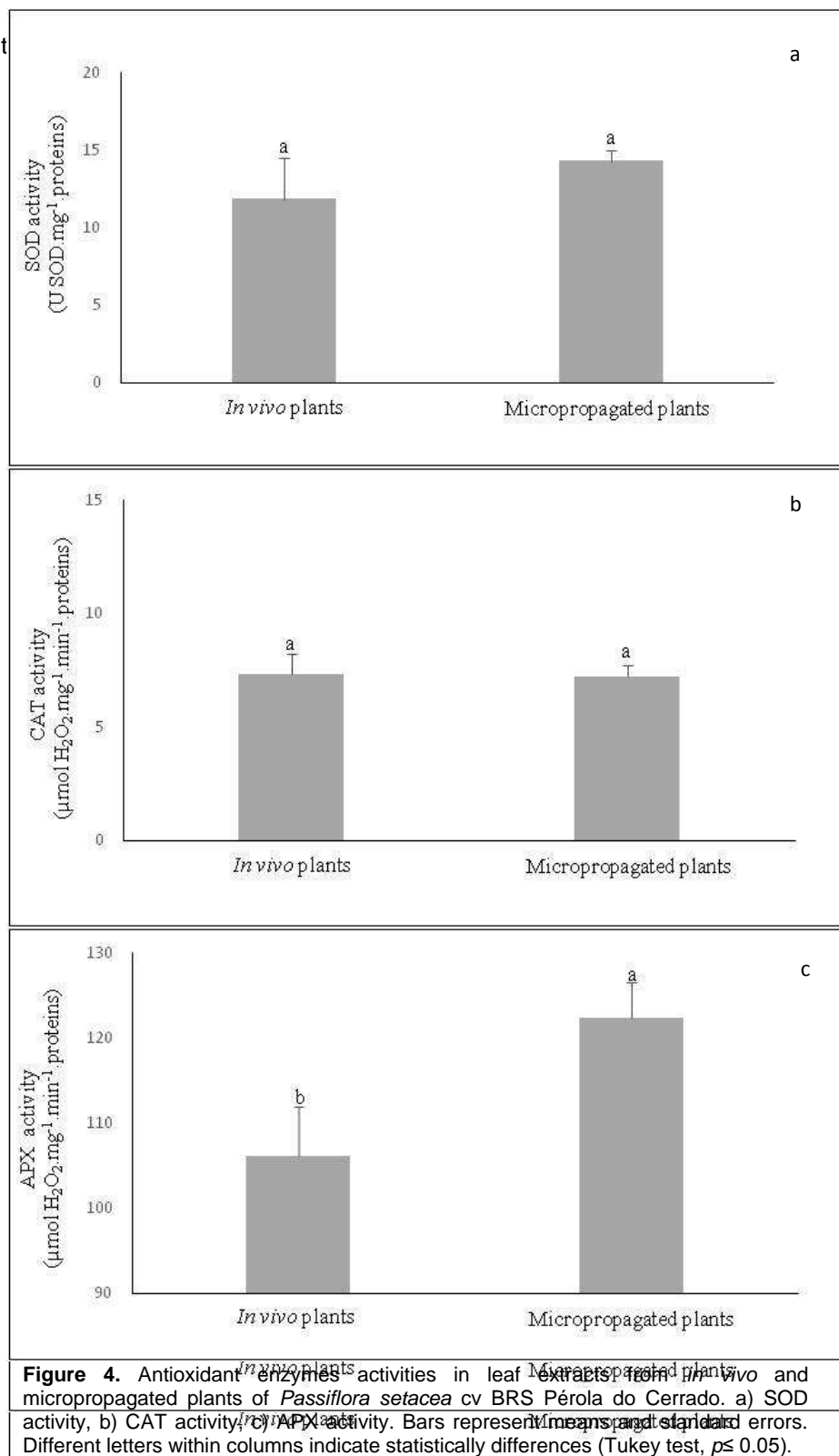
The activity of enzymes associated with the cellular antioxidant system, namely SOD, CAT and APX, was also evaluated in the leaf extracts. SOD catalyzes the dismutation of the superoxide radical into molecular

oxygen and hydrogen peroxide and thus is considered an important defense against free radicals, whereas CAT and APX are responsible for the degradation of hydrogen peroxide mainly in peroxisomes and chloroplasts, respectively (Kim et al., 2017). In this study, although no statistical differences were observed in the specific activity of SOD and CAT extracted from both leaf tissues (Figure 4a and b), there was a significant increase in APX activity in leaves from micropropagated plants (Figure 4c). These results might reflect the stressful conditions imposed by the *in vitro* environment, which led to an increase of hydrogen peroxide concentration and, thus, of the APX activity aiming its degradation. Moreover, considering that APX is the only enzyme responsible for maintaining low hydrogen peroxide levels in the chloroplasts, it is possible that its high activity rates, when compared with CAT activity, is associated with specific damages to the photosynthetic apparatus induced by *in vitro* conditions (Škodová-Sveráková et al., 2020).

Hydrogen peroxide is not considered a highly reactive ROS. In high concentrations, however, it can interact with metallic ions, such as Fe⁺³, giving rise to hydroxyl radicals (OH[•]), which are considered one of the most relevant ROS, due to their potential to cause cell membrane damages and the absence of specific enzymatic mechanisms for their degradation (Kaczmarczyk et al., 2012; Sharma et al., 2012; Demidchik, 2015). Therefore, considering the increase in APX activity and the high iron chelating capacity observed here, it seems that both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems are acting together in order to reduce OH[•] formation (Hasanuzzaman et al., 2020).

In conclusion, the chromatographic analyses of leaf extracts from both *in vivo* and micropropagated plants of *P. setacea* cv BRS Pérola do Cerrado described here detected the presence of vicenin-2 and schaftoside in higher content in comparison to the other flavonoids.

The antioxidant potential of the extracts was also evaluated, and despite the low capacity observed by the DPPH assay, a high antioxidant activity was accessed by the iron chelating assay, corroborating the importance of distinct and complementary assays in order to access the



antioxidant potential of plant-derived compounds. These results suggest that *in vitro* plants can be used as an alternative for flavonoid production from cultivar BRS Pérola do Cerrado.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) [Grant Number E-26/010.001840/2019], and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant Number 310238/2018-8]. This study was also funded by Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [Finance Code 001].

REFERENCES

- Abourashed E, Vanderplank J, Khan I (2002). High-Speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants -I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 40(2):81-91.
- Araújo MH, Silva ICV, Oliveira PF, Barreto ARR, Konno TUP, Esteves FA, Barth T, Aguiar FA, Lopes PL, Dermenjian RK, Guimarães DO, Leal ICR, Lasunskia EB, Muzitano MF (2017). Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian resting. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 27:702-710.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998). Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104(2):280-292.
- Bassolino L, Giacomelli E, Giovanelli S, Pistelli L, Casseti A, Damonte G, Ruffoni B (2015) Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121(1):83-95.
- Birk CD, Provensi G, Gosmann G, Reginatto FH, Schenkel EP (2005). TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies* 28(14):2285-2291.
- Bomtempo LL, Costa AM, Lima H, Engeseth N, Gloria MBA (2016) Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. *Food Research International* 89(1):733-738.
- Braga MF, Santos EC, Junqueira NTV, Sousa AATC, Faleiro FG, Rezende LN, Junqueira KP (2006). Cutting rooting of three wild *Passiflora* species. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28(2):284-288.
- Carvalho MVO, Oliveira LL, Costa AM (2018). Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. *Food Chemistry* 266:350-358.
- Castañeda-Valbuena D, Ayora-Talavera T, Luján-Hidalgo C, Álvarez-Gutiérrez P, Martínez-Galero N, Meza-Gordillo R (2021) Ultrasound extraction conditions effect on antioxidant capacity of mango by-product extracts. *Food and Bioprocess Technology* 127:212-224.
- Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 26:e00450.
- Chew YL, Goh JK, Lim YY (2009). Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry* 116(1):13-18.
- Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP, Reginatto FH (2011) Na HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22(6):1096-1102.
- Cvetkovikj I, Stefkov G, Acevska J, Stanoeva JP, Karapandzova M, Stefova M, Dimitrovska A, Kulevanova S (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A* 1282:38-45.
- Da Rosa LC, Siqueira MRP, Paumgarten FJR, Pacheco G, Mansur E, Moreira DL (2021). Development and validation of a new method to quantify vitexin-2''-O-rhamnoside on *Passiflora* L. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 15(1):45-55.
- Da Silva ICV, Kaluderović GN, De Oliveira PF, Guimarães DO, Quaresma CH, Porzel A, Muzitano MF, Wessjohann LA, Leal ICR (2018). Apoptosis caused by triterpenes and phytosterols and antioxidant activity of an enriched flavonoid extract from *Passiflora mucronata*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 18(10):1405-1416.
- Demidchik V (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109:212-228.
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Jesus ON, Costa AM (2018). Avanços e perspectivas do melhoramento genético de Passifloras no Brasil. In *Congreso Latino-americano de Pasifloras*, 2º, Neiva, Huila, Colômbia pp. 12-23.
- Morera MP, Costa AM, Faleiro FG, Carlosama AR, Carranza C (Eds.) Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. Brasília, DF: ProImpress pp.81-93.
- Faleiro FG, Junqueira NTV, Junghans TG, Jesus ON, Miranda D, Otoni WC (2019). Advances in passionfruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura* 41(2):e-155.
- Farang MA, Otify A, Porzel A, Michel CG, Elsayed A, Wessjohann LA (2016). Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 408(12):3125-3143.
- García-Pérez E, Gutiérrez-Urbe JA, García-Lara S (2011). Luteolin content and antioxidant activity in micropropagated plants of *Polimntha glabrescens* (Gray). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(3):521-527.
- Gomes S, Portugal L, Anjos J, Jesus O, Oliveira E, David J, David J (2017). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchemical Journal* 132:28-35.
- Gosmann G, Provensi G, Comunello LN, Rates SMK (2011). Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Biosciences* 9(1):88-99.
- Gunathilake KDP, Ranaweera KKDS, Rupasinghe HPV (2017). Optimization of phenolics and carotenoids extraction from leaves of *Passiflora edulis* using response surface methods. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology* 1(1):1-12.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHM, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9(8) 681.
- Kaczmarczyk A, Funnekotter B, Menon A, Phang PY, Al-Hanbali A, Bunn E, Mancera RL (2012). Current Issues in Plant Cryopreservation. In: Katkov I (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology*. London: IntechOpen pp. 417-438.
- Kim Y-H, Khan AL, Waqas M, Lee IJ (2017). Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. *Frontiers in Plant Science* 8:510.
- Köksal E, Gülçin I (2008). Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 32(1):65-78.
- Lee W, Bae JS (2015). Antithrombotic and antiplatelet activities of vicenin-2. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 26(6):628-34.
- Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L (2011). *In vitro* analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105(5):693-701.
- Monteiro ABC, Higashi EN, Gonçalves NA, Rodriguez APM (2000). 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 Development-Plant* 36(6):527-531.
- Ozarowski M, Piasecka A, Paszel-Jaworska A, Siqueira Chaves D, Romaniuk A, Rybczynska M, Grysczyńska A, Sawikowska A, Kachlicki P, Mikolajczak P, Seremak-Mrozikiewicz A, Klejewski A, Thiem B (2018). 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. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 28:179-191.
- Ozarowski M, Thiem B (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23(6):937-947.
- Park H-Y, Kim K-S, Ak G, Zengin G, Cziáky Z, Jekő J, Adaikalam K, Song K, Kim D-H, Sivanesan I (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities *Plants* 10(4):698.
- Pashkovskiy PP, Soshinkova TN, Korolkova DV, Kartashov AV, Zlobin IE, Lyubimov VY, Kreslavski VD, Kuznetsov VV (2018). The effect of light quality on the pro-/antioxidant balance, activity of photosystem II,

- and expression of light-dependent genes in *Eutrema salsugineum* callus cells. *Photosynthesis Research* 136(2):199-214.
- Pereira PPA, Lima LKS, Soares TL, Laranjeira FF, Jesus ON, Girardi EA (2019). Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. *Crop Protection* 121:195-203.
- Puente-Garza CA, García-Lara S, Gutiérrez-Urbe JA (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products* 105:225-230.
- Sakalem ME, Negri G, Tobach R (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(6):1219-1232.
- Sanchez BAO, Celestino SMC, Gloria MBA, Celestino IC, Lozada MIO, Junior DAS, Alencar ER, Oliveira LL (2020). Pasteurization of passion fruit *Passiflora setacea* pulp to optimize bioactive compounds retention. *Food Chemistry X*:6-100084.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FA (1998). Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food Agriculture* 76(2):270-276.
- Santana FC, Shinagawa FB, Araujo ES, Costa AM, Mancini-Filho J (2015). Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian *Passiflora* seed oils. *Journal of Food Science* 80(12):C2647-C2654.
- Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. London, UK: IntechOpen pp. 23-50.
- Santos-Tierno R, Garcia R, Fonseca E, Faleiro F, Moreira D, Pacheco G, Mansur E (2021). Light quality and explant type modulate growth, antioxidant properties and bioactive compounds production of calluses of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 147(3):635-646.
- Sena L, Zucolotto S, Reginatto F, Schenkel E, De Lima T (2009). Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa Degener: Putative involvement of C-glycosyl flavonoids. *Experimental Biology and Medicine* 234(8):967-975.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakdi M (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 217037.
- Silva JK, Cazarin CBB, Colomeu TC, Batista AG, Meletti LMM, Paschoal JAR, Júnior SB, Furlan MF, Reyes FGR, Augusto F, Júnior MRM, Zollner RL (2013). Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *in vitro* and *in vivo* study. *Food Research International* 53(2):882-890.
- Simão MJ, Barbosa TJS, Vianna MG, Garcia R, Mansur E, Ignacio ACPR, Pacheco G (2018). A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of *in vitro* derived materials of four *Passiflora* species. *Annals of the Brazilian academy of sciences* 90(3):2805-2813.
- Simirgiotis M, Schmeda-Hirschmann G, Borquez J, Kennelly E (2013). The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. *Molecules* 18(2):1672-1692.
- Škodová-Sveráková I, Záhonová K, Bučková B, Füssy Z, Yurchenko V, Lukeš J (2020). Catalase and Ascorbate Peroxidase in Euglenozoan Protists. *Pathogens* 9(4):317.
- Smruthi R, Divya M, Archana K, Maddaly R (2021). The active compounds of *Passiflora* spp and their potential medicinal uses from both *in vitro* and *in vivo* evidences. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 4(1):45-55.
- Viana ML, Costa AM, Celestino SMC (2016). Informations for the composition of nutritional table of the passion fruit pulp BRS Pérola do Cerrado. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa Cerrados* 335:17-ref.18.
- Vianna MG, Garcia RO, Mansur E, Engelmann F, Pacheco G (2019). Oxidative stress during the cryopreservation of *Passiflora suberosa* L. shoot tips using the V-Cryo-plate technique: determination of the critical stages of the protocol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 139(2):369-379.
- Wang J, Liu H, Zhao J, Gao H, Zhou L, Zhilong L, Chen Y, Sui P (2010b). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules* 15(8):5807-5817.
- Wang J, Zhao J, Liu H, Zhou L, Liu Z, Wang J, Han J, Yu Z, Yang F (2010a). Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two Valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules* 15(9):6411-6422.
- Wosch L, dos Santos KC, Imig DC, Santos CAM (2017). Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 27(1):40-49.
- Yalçın S, Yalçinkaya S, Ercan Fn (2021). In silico detection of inhibitor potential of *Passiflora* compounds against SARS-Cov-2(Covid-19) main protease by using molecular docking and dynamic analyses. *Journal of Molecular Structure* 1240:130556.
- Yu W, Liu Y, Song L, Jacobs DF, Du X, Ying Y, Shao Q, WU J (2017). Effect of differential light quality on morphology, photosynthesis, and antioxidant enzyme activity in *Campytheca acuminata* Seedlings. *Journal Plant Growth Regulation* 36(1):148-160.
- Zucolotto S, Reginatto F, Ramos F, Castellanos L, Duque C, Schenkel E (2011). Analysis of C-glycosyl flavonoids from south American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis* 23(3):232-239.
- Zucolotto S, Goulart S, Montanher A, Reginatto F, Schenkel E, Fröde T (2009). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Medica* 75(11):1221-122.