



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marcela Gomes Vianna Almeida

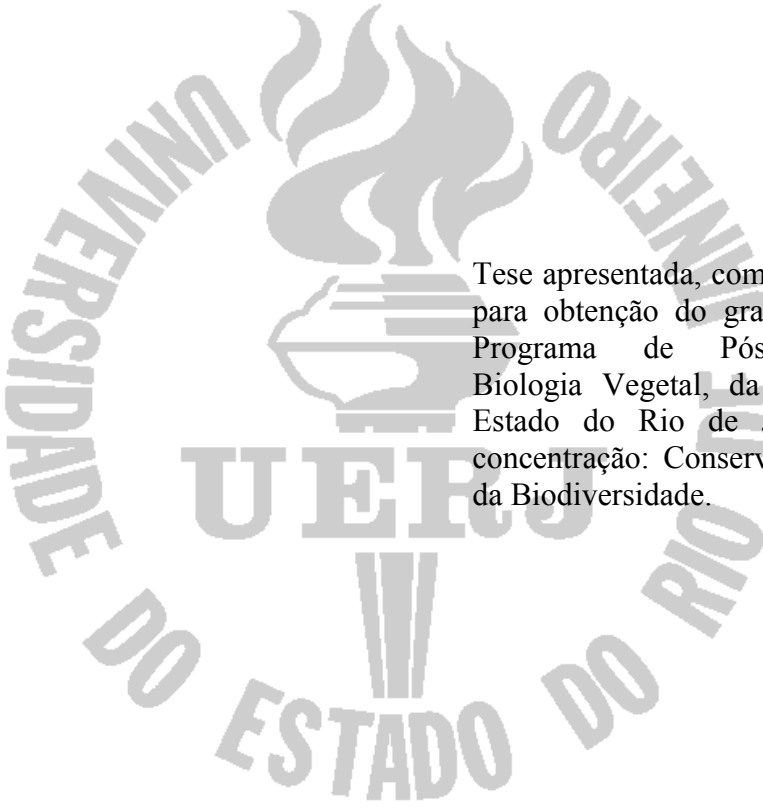
**Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria
e da capacidade biossintética de *Passiflora suberosa* L.
após a criopreservação**

Rio de Janeiro

2021

Marcela Gomes Vianna Almeida

**Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria
e da capacidade biossintética de *Passiflora suberosa* L.
após a criopreservação**



Tese apresentada, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutora, ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Vegetal, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de
concentração: Conservação e Utilização
da Biodiversidade.

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

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

Rio de Janeiro

2021

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

A447 Almeida, Marcela Gomes Vianna.
Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria e da capacidade biossintética de *Passiflora suberosa* L. após a criopreservação / Marcela Gomes Vianna Almeida. – 2021.
114 f.: il.

Orientadora: Georgia Pacheco Peters de Almeida

Coorientadora: 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. Maracujá- Teses. 3. Criopreservação - Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. I. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. II. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. 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

Data

Marcela Gomes Vianna Almeida

**Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria e da capacidade biossintética de
Passiflora suberosa L. após a criopreservação**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora, ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Área de concentração: Conservação e
Utilização da Biodiversidade

Aprovada em 07 de dezembro de 2021

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida (Orientadora)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.^a Dra. Cláudia Simões Gurgel

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.^a Dra. Nina Claudia Barboza da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof.^a Dra. Maria Carolina Anholeti da Silva

Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Andre Mesquita Marques

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2021

À Deus, minha orientadora, família e amigos, que me impulsionaram a persistir, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de viver cada dia, pelas alegrias, pelo sustento nos momentos difíceis, pelo cuidado de nos cercar de pessoas e amigos que nos fortalecem, principalmente, num período tão atípico quanto os anos de 2020/2021. O Senhor é o principal investidor dos meus sonhos de uma vida inteira, mas principalmente de fazer uma graduação, um mestrado e por fim, um doutorado. Tenho total convicção que sem Ti Deus, nada seria possível.

Agradeço à minha orientadora Dra. Georgia Pacheco pela orientação deste trabalho, mas também inúmeras coisas que não cabem em palavras, como a sensibilidade no tratamento diário, o comprometimento com o trabalho, mas principalmente com o ser humano. Georgia Pacheco (Ge), você participou de toda a minha vida acadêmica e sempre me encorajou a continuar, nunca riu e nem expôs minhas limitações, pelo contrário, sempre me mostrou que é possível superá-las. Eu nunca vou esquecer o que você fez por mim todos esses anos: permitiu que eu vivesse todo esse processo sem que isso fosse um peso a mais na minha vida. Eu nunca vou esquecer todo apoio durante a minha gravidez e nesse primeiro ano da Elisa. Muito obrigada por toda a sua competência, comprometimento, pela liderança por meio do exemplo e por sua amizade.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Elisabeth Mansur, primeiramente, por abrir as portas do laboratório para mim, por sua competência nas contribuições deste trabalho, por todas as correções e inúmeros aprendizados; e por todo o carinho durante todos esses anos.

Agradeço à querida equipe do Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas (LABMIT). Trabalhar com vocês durante esses anos tem sido um privilégio de aprendizado e companheirismo. Muito obrigada pelo auxílio na execução dos experimentos, por toda a paciência no compartilhamento dos espaços de trabalho, pelo carinho e amizade. Msc. Leila Cantelmo, Dra. Bianka Soares, Msc. Raphaela Tierno, Dra. Jamine Pettinelli, Msc. Vinicius Souza, Vinicius Barreto.

Agradeço à Dra. Renata Garcia por todo ensino, paciência, cuidado e carinho durante esse período. Ter sido sua aluna de Iniciação Científica e contar com você, ao longo desses anos, foi um diferencial para todo o meu trajeto acadêmico e de vida.

Agradeço à MscTielen Viana, pela amizade e companhia no trabalho e no transporte público; pela contribuição neste trabalho no auxílio com minhas amostras. Muito obrigada por toda a disponibilidade e boa vontade.

Agradeço à Dra. Mariela Simão por fazer parte deste trabalho e também por sua amizade. Mari contar com você neste período de laboratório foi um presente em termos de aprendizado e carinho gratuito. Muito obrigada pela disponibilidade em ajudar (seja na bancada, na edição de imagens, seja na vida pessoal) e ser essa amiga para todas as horas independente da distância.

Agradeço à Dra. Isabela Souza Machado. Compartilhando estes anos de UERJ são tantas coisas para agradecer que a gente nem sabe por onde começar. Muito obrigada pela amizade, por me ouvir, por todo apoio e por fazer parte da minha vida. Não tenho palavras para agradecer a disponibilidade em me auxiliar na finalização deste trabalho, Isa, muito obrigada de coração.

Agradeço aos estagiários: Marina Kaiate, Igor Rodrigues, Vitória Sampaio por sua participação neste trabalho.

Agradeço à equipe do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ) por compartilhar espaços e por toda a ajuda ao longo desses anos.

Agradeço à professora Dra. Claudia Simões-Gurgel, por suas contribuições e carinho ao longo de toda a trajetória de todo o trabalho, da graduação ao doutorado.

Agradeço aos meus familiares (mãe Sandra Paula Gomes Vianna; pai Arli de Assis Vianna) por todo apoio, sustento físico e emocional durante a minha formação acadêmica. Vocês são a prova do amor e cuidado de Deus para com a minha vida; e são também meus principais exemplos de dignidade, generosidade e fé.

Agradeço ao meu amor Paulo Almeida, pelo amor genuíno nestes anos que estamos juntos. A vida com você adquiriu outra nuance em termos de amor, companheirismo, cumplicidade e carinho. Muito obrigada por ver o melhor em mim, pelas cobranças para eu não me acomodar, pelo colo diário e por sua parceria. Eu te amo.

Agradeço à minha pequena filha Elisa Vianna Almeida. Ter você na minha vida foi o maior e melhor presente de Deus. A sua chegada trouxe uma intensidade de sentimentos que não tem explicação. Filha você é a luz do meu dia, minha maior motivação de ser um ser humano melhor e não desistir. Muito obrigada por contribuir na minha vida.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal (PGBV) da UERJ, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço à banca avaliadora por aceitar contribuir e avaliar este trabalho.

Agradeço à CAPES, FAPERJ, CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre

Albert Einstein

RESUMO

ALMEIDA, Marcela Gomes Vianna. **Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria e da capacidade biossintética de *Passiflora suberosa* L. após a criopreservação.** 2021. 134f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Passiflora suberosa L., conhecida como maracujazinho-cortiça, é uma espécie silvestre de maracujá, com potencial agrônomo, ornamental e medicinal. Dessa forma, estratégias, que visam à conservação desta espécie como a criopreservação, são consideradas de grande relevância. Como o processo de criopreservação pode estar associado a danos oxidativos que causam injúrias e resultam em baixas taxas de sobrevivência, o objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos bioquímicos associados à crioinjúria visando à identificação das etapas críticas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* pela técnica de V-Crioplaca. Para a avaliação de injúrias oxidativas, a peroxidação de lipídios de membrana e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foram quantificadas em diferentes etapas do protocolo de criopreservação. Além disso, diferentes concentrações de ácido ascórbico e glutatona foram adicionadas nas etapas críticas do processo criogênico visando à redução do estresse oxidativo. A estabilidade metabólica de plantas derivadas de ápices caulinares criopreservados, foi analisada por meio de Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e pela avaliação do potencial antioxidante. O conteúdo de malondialdeído (subproduto da peroxidação de lipídios) nos explantes foi significativamente maior após tratamento com a solução crioprotetora PVS3 e imersão em nitrogênio (NL), com valores até 2,5 maiores que os observados nos controles. Contudo, essas taxas foram reduzidas durante a etapa de recuperação. Todas as enzimas antioxidantes analisadas (SOD, CAT, APX) apresentaram um aumento expressivo das suas atividades nas etapas iniciais do protocolo de criopreservação, embora tenha sido observada uma redução significativa nas atividades específicas de SOD e CAT após a osmoproteção. Com base nesses resultados, a osmoproteção e desidratação foram consideradas os estágios mais críticos do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* por V- Crioplaca. Contudo, a aplicação direcionada de ácido ascórbico e glutatona, nessas etapas, visando à redução do estresse oxidativo, não levou ao aumento das taxas de recuperação de plantas pós-resfriamento. Na investigação da manutenção da estabilidade metabólica após a criopreservação, as análises cromatográficas não apontaram diferenças entre folhas de plantas submetidas ou não à criopreservação. Da mesma forma, um elevado potencial antioxidante foi observado em todos os extratos analisados, evidenciado tanto pela captura direta de radicais livres, quanto pela capacidade de quelar íons metálicos. A atividade antioxidante dos diferentes materiais foi ainda relacionada à presença de flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas nos extratos. Os resultados obtidos contribuem para a maior compreensão das respostas celulares de plantas tropicais ao estresse induzido pelo frio e pela desidratação. Além disso, a manutenção da capacidade biossintética em plantas derivadas de ápices criopreservados agrega informações relevantes para o estudo do funcionamento do metabolismo secundário durante e após a criopreservação. Esse conjunto de dados confirma a eficiência da criopreservação como uma estratégia de conservação em longo prazo para *P. suberosa*.

Palavras-chave: Crioproteção. Estresse oxidativo. Maracujá. Metabólitos secundários. V-Crioplaca

ABSTRACT

ALMEIDA, Marcela Gomes Vianna. **Evaluation of the biochemical aspects of cryoinjury and biosynthetic capacity of *Passiflora suberosa* L. after cryopreservation.** 2021. 134f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Passiflora suberosa L., commonly known as *maracujazinho-cortiça* is a wild species of passion fruit with agronomic, ornamental and medicinal potential. Thus, strategies aiming at the conservation of this species, such as cryopreservation, are considered of great relevance. Since the cryopreservation process can be associated with oxidative damage that causes injuries and results in low survival rates, the objective of this study was to evaluate biochemical aspects associated with cryoinjury, aiming at identifying the critical steps of the cryopreservation protocol for *P. suberosa* shoot tips using the V-Cryoplate technique. For the evaluation of oxidative injuries, membrane lipid peroxidation and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were quantified at different stages of the cryopreservation protocol. In addition, different concentrations of ascorbic acid and glutathione were added at the critical steps of the cryogenic process in order to reduce the oxidative stress. The metabolic stability of plants derived from cryopreserved shoot tips was analyzed by Thin Layer Chromatography, High Performance Liquid Chromatography and by the evaluation of the antioxidant potential. The malondialdehyde content (subproduct of lipid peroxidation) in the explants was significantly higher after treatment with the cryoprotectant solution PVS3 and immersion into nitrogen (LN), with values up to 2.5 times higher than those observed in the controls. However, these rates were reduced during the regrowth stage. All antioxidant enzymes analyzed (SOD, CAT, APX) showed an expressive increase in their activities during the early stages of the cryopreservation protocol, although a significant reduction of the specific activities of SOD and CAT was observed after osmoprotection. Based on these results, osmoprotection and dehydration were considered the most critical stages of the cryopreservation protocol for *P. suberosa* shoot tips using V-Cryo-plate. However, the application of ascorbic acid and glutathione in these stages, aiming at reducing the oxidative stress, did not lead to an increase in plant recovery rates. In the investigation of the metabolic stability after cryopreservation, the chromatographic analyzes did not show differences between leaves of plants submitted or not to cryopreservation. Likewise, a high antioxidant potential was observed in all extracts, both by the direct scavenge of free radicals and by the ability to chelate metallic ions. The antioxidant activity of the different materials was also associated with the presence of flavonoids, phenolic acids and saponins in the extracts. These results contribute to a better understanding of the cellular responses of tropical plants to the stressful conditions induced by cold and dehydration. Furthermore, maintenance of biosynthetic capacity in plants derived from cryopreserved shoot tips provides relevant information for the study of the functioning of secondary metabolism during and after cryopreservation. These data confirm the effectiveness of cryopreservation for long-term conservation of *P. suberosa*.

Keywords: Cryoprotection. Oxidative stress. Passion fruit. Secondary metabolites. V-Cryo-plate

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diversidade de flores em <i>Passiflora</i>	22
Figura 2 -	Distribuição geográfica de <i>Passiflora suberosa</i> L. no Brasil.....	25
Figura 3 -	Folhas, flores e frutos <i>Passiflora suberosa</i> L.....	26
Figura 4 -	Aspectos morfológicos de <i>Passiflora suberosa</i> L.....	27
Figura 5 -	Alterações induzidas pelo processo de criopreservação.....	34
Figura 6 -	Formação de radicais hidroxil (OH [•]) através da reação de Fenton e Haber-Weiss.....	35
Figura 7 -	Ação integrada dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante celular na remoção de ERO.....	36
Figura 8 -	Ciclo ascorbato-glutationa e ação da APX na neutralização de H ₂ O ₂	38
Figura 9 -	Estrutura molecular do ácido ascórbico	42
Figura 10 -	Estruturas moleculares da glutathiona nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	43
Figura 11 -	Etapas da criopreservação de ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. utilizando a técnica de V-Crioplaca	52
Figura 12 -	Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) obtida pelo método de Bradford.....	54
Figura 13 -	Sistema desenvolvido para avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase no NBV/UERJ.....	55
Figura 14 -	Curva padrão de quercetina	61
Figura 15 -	Curva padrão de EDTA	63
Figura 16 -	Curva padrão de ácido gálico	64
Figura 17 -	Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) em ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca.....	65

Figura 18 –	Teor de proteínas totais em ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca.....	66
Figura 19 –	Atividade específica de superóxido dismutase (SOD) em ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca.....	67
Figura 20 –	Atividade específica de catalase (CAT) em ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. após diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca	68
Figura 21 –	Atividade específica de ascorbato peroxidase (APX) em ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca.....	69
Figura 22 –	Efeito da adição de ácido ascórbico em diferentes etapas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. pela técnica de V-Crioplaca	70
Figura 23 –	Recuperação de brotos a partir de ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após tratamento com diferentes concentrações de ácido ascórbico	71
Figura 24 –	Efeito da adição de glutathione em diferentes etapas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. utilizando a técnica de V-Crioplaca	72
Figura 25 –	Desenvolvimento de brotos a partir de ápices caulinares de <i>Passiflora suberosa</i> L. criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após tratamento com diferentes concentrações de glutathione	73
Figura 26 –	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para a detecção de ácidos fenólicos em folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	74
Figura 27 –	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de flavonoides em folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione.....	75
Figura 28 –	Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de saponinas em folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione.....	76
Figura 29 –	Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutathione, com detecção em UV _{340nm}	77

Figura 30 –	Espectros de absorção dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutathione, com detecção em UV _{340nm}	78
Figura 31 –	Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	81
Figura 32 –	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	83
Figura 33 –	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	84
Figura 34 –	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de saponinas em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	85
Figura 35 –	Correlação entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante de extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	86

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 –	Principais trabalhos de avaliação do estresse oxidativo associado à criopreservação de plantas.....	39
Quadro 2 –	Trabalhos sobre avaliação da capacidade biossintética de plantas submetidas à criopreservação	46
Quadro 3 –	Protocolos de criopreservação desenvolvidos para espécies de <i>Passiflora</i> L.	48
Tabela 1 –	Áreas dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutathione, com detecção em UV _{340nm}	79
Tabela 2 –	Comparação das áreas dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV, com detecção em UV _{340nm} , em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> e daquelas derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutathione	80
Tabela 3 –	Capacidade de captura do radical DPPH por extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	82
Tabela 4 –	Potencial antioxidante avaliado pela capacidade quelante de íons ferrosos em extratos de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> L. mantidas <i>in vitro</i> ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	–	Ácido abscísico
ANA	–	Ácido α -naftalenoacético
APX	–	Ascorbato peroxidase
BAP	–	6-benzilaminopurina
BSA	–	Albumina de soro bovino
CAT	–	Catalase
CCD	–	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD-UV	–	Detector de UV com arranjo de diodos
DMSO	–	Dimetilsufóxido
DHA	–	Dehidroascorbato
DHAR	–	Dehidroascorbato redutase
DPPH	–	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTT	–	1,4-Ditiotreitol
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	–	Etilenoglicol
ERO	–	Espécies reativas de oxigênio
GR	–	Glutathione redutase
GSH	–	Glutathione reduzida
GSSG	–	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	–	Peróxido de hidrogênio
MDA	–	Malondialdeído
MDAR	–	Monodehidroascorbato redutase
MDHA	–	Radical monodehidroascorbato
MS	–	Meio de Murashige&Skoog (1962)
MSM	–	Meio MS modificado por Monteiro et al. (2000b)
MSM ½	–	Meio meio MSM contendo metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose
NBT	–	Nitroazultetrazólio
NL	–	Nitrogênio Líquido
NP/PEG	–	Reagente Produtos Naturais/Polietilenoglicol
¹ O ₂	–	Oxigênio singleto
O ₂ [•]	–	Radical superóxido

O₃– Ozônio

OH•– Radical hidroxil

OOH• – Radical hiperhidroxil

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

PVS1 – *Plant Vitrification Solution 1*

PVS2 – *Plant Vitrification Solution 2*

PVS3 – *Plant Vitrification Solution 3*

PVS4 – *Plant Vitrification Solution 4*

PVS7 – *Plant Vitrification Solution 7*

R_F – Fator de Retenção

RO•– Radical alcóxil

ROO• – Radical peróxil

SOD– Superóxido redutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

t_R – Tempo de Retenção

UV – Ultravioleta

VSL – *Vitrification Solution*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Gênero <i>Passiflora</i> L.	20
1.1.1	<u><i>Passiflora suberosa</i> L.</u>	24
1.2	Criopreservação	29
1.2.1	<u>Estresse oxidativo e indução de crioinjúrias</u>	32
1.2.2	<u>Criopreservação aplicada à conservação de plantas com potencial medicinal ...</u>	44
1.2.3	<u>Criopreservação de espécies de <i>Passiflora</i> L.</u>	45
2	OBJETIVOS	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Material Vegetal e condições de cultura	51
3.2	Criopreservação	51
3.3	Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria	53
3.3.1	<u>Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação de malondialdeído (MDA)</u>	53
3.3.2	<u>Determinação das atividades das enzimas antioxidante</u>	54
3.3.2.1	Quantificação de proteínas totais.....	54
3.3.2.2	Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	55
3.3.2.3	Avaliação da atividade da catalase (CAT).....	56
3.3.2.4	Avaliação da atividade da ascorbato peroxidase (APX).....	57
3.4	Avaliação do uso de substâncias antioxidantes em diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca	57
3.5	Preparo de extratos vegetais	58

3.6	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	58
3.7	Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD-UV)	59
3.8	Avaliação da atividade antioxidante	60
3.8.1	<u>Ensaio de captura do radical DPPH</u>	60
3.8.2	<u>Ensaio de avaliação da capacidade quelante de íons ferrosos</u>	62
3.8.3	<u>Análise por CCD-DPPH</u>	63
3.9	Determinação do conteúdo fenólico e correlação com a atividade antioxidante	63
3.10	Análise estatística	64
4	RESULTADOS	65
4.1	Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação do MDA	65
4.2	Análise das atividades das enzimas antioxidantes	66
4.2.1	<u>Quantificação de proteínas totais</u>	66
4.2.2	<u>Avaliação da atividade da SOD</u>	67
4.2.3	<u>Avaliação da atividade da CAT</u>	68
4.2.4	<u>Avaliação da atividade da APX</u>	69
4.3	Avaliação do uso de substâncias antioxidantes em diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca	70
4.3.1	<u>Avaliação da influência do ácido ascórbico</u>	70
4.3.2	<u>Avaliação da influência da glutatona</u>	72
4.4	Avaliação da estabilidade metabólica dos materiais submetidos à criopreservação	74
4.4.1	<u>Análise por CCD</u>	74
4.4.1.1	Análise de ácidos fenólicos	74
4.4.1.2	Análise de flavonoides	75
4.4.1.3	Análise de saponinas	76

4.5	Análise por CLAE-DAD-UV	77
4.6	Avaliação da atividade antioxidante	81
4.6.1	<u>Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH</u>	81
4.6.2	<u>Avaliação da capacidade quelante de íons ferrosos</u>	82
4.6.3	<u>Análise qualitativa da atividade antioxidante CCD-DPPH</u>	87
4.6.4	<u>Determinação do conteúdo fenólico e correlação com a capacidade de captura do radical DPPH</u>	83
5	DISCUSSÃO.....	87
	CONCLUSÕES	97
	PERSPECTIVAS	98
	REFERÊNCIAS	99

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* reúne aproximadamente 560 espécies, sendo o de maior representatividade da família Passifloraceae. Os maracujás, como são conhecidas suas espécies, possuem distribuição tropical e subtropical, sendo encontrados principalmente nos continentes Americano e Africano. O Brasil é considerado um importante centro de diversidade do gênero, abrigando 146 espécies, das quais 84 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2018).

Diferentes composições infragenéricas já foram propostas para o gênero, baseadas em caracteres morfológicos e ecológicos. Inicialmente, Killip (1938) propôs a divisão em 22 subgêneros compostos por várias seções e séries. Posteriormente, Escobar (1989) reconheceu 23 subgêneros. Em 2004, Feuillet e Mac Dougal agruparam as espécies em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora*. Em seguida, Kronisck, Ford, Freudenstein (2009) propuseram a inclusão de um novo subgênero, *Tetrapathea*, aumentando o número para cinco.

O subgênero *Astrophea* possui 57 espécies de lianas e arbustos, com grande diversidade na América do Sul, enquanto *Deidamioides* apresenta somente 14 espécies conhecidas, encontradas na América Central e América do Sul. O subgênero *Decaloba* engloba cerca de 230 espécies, distribuídas por toda a América, Ásia e Oceania, enquanto *Passiflora* inclui cerca de 250 espécies, sendo o subgênero com o maior número de espécies conhecidas e estudadas, devido à sua importância econômica. O subgênero *Tetrapathea*, mais recente, inclui apenas três espécies de lianas, distribuídas na Austrália, Papua-Nova Guiné e Nova Zelândia (KROSNICK et al., 2013; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

As passifloras são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com rara formação arbustiva. A maior parte dos representantes apresentam gavinhas axilares, enquanto em outros foram reduzidas a espinhos (VANDERPLANK, 2013). A maioria das espécies apresenta flores grandes, actinomorfas, com formas e cores variadas. Frequentemente, apresentam nectário extrafloral que atua como um sistema de recompensa e desempenha uma ação protetora contra herbívoros. Os frutos são indeiscentes, geralmente globosos ou ovoides, com casca espessa, de

coloração e tamanho variados, abrigando sementes envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997; YOCKTENG et al., 2011).

O cultivo do maracujá como atividade econômica no Brasil surgiu na década de 1980, e o país é hoje considerado o maior produtor mundial de maracujá, com cerca de 600.000 toneladas produzidas por ano (IBGE, 2018). Embora, inicialmente, a cultura do maracujazeiro tenha sido de caráter domiciliar, ao longo do tempo tornou-se economicamente atraente pelo seu rápido retorno e pelo incentivo da agroindústria, sendo destinada não somente ao setor de frutas frescas, mas também de alimentos processados, como sucos, sorvetes e geleias (MELETTI, 2011). Além disso, a expansão da atividade para atender à demanda comercial adquiriu um caráter social, na medida em que auxiliou a fixação de mão-de-obra rural, gerando empregos diretos nos diversos segmentos da cadeia produtiva (MELETTI, 2011).

Diversas espécies do gênero apresentam frutos comestíveis, com potencial para comercialização. No entanto, as maiores culturas estão voltadas para o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), o maracujá-amarelo (*P. edulisf. Flavicarpa* Degener) e o maracujá-doce (*P. alata* Curtis). A cultura de maracujá-amarelo é a de maior importância comercial, representando 95% dos pomares da produção nacional, devido ao seu vigor, produtividade e qualidade dos frutos (BERNACCI et al., 2003; MELETTI, 2005; ZERAIK et al., 2010; JESUS et al., 2018). O maracujá-roxo produz frutos menores, de coloração arroxeada e menor acidez, sendo mais apreciado no exterior, principalmente na Austrália e África do Sul (BELLON et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009). Além disso, possui potencial de produção de até 30 - 40 toneladas por hectare, podendo ser destinado para indústria, consumo *in natura* e exportação. O cultivo do maracujá-doce, uma espécie nativa do Brasil, tem apresentado uma crescente expansão devido a seus frutos grandes e ovalados, de aroma agradável, sabor doce e baixa acidez. Tais atributos representam alto potencial para o mercado, pela possibilidade de consumo *in natura* (BERNACCI et al., 2003).

Mais recentemente, a cadeia produtiva do maracujá vem sendo ampliada com o uso e a comercialização de frutos de outras espécies de *Passiflora*. Entre essas, destacam-se *Passiflora setacea* D.C. (maracujá do sono, maracujá do cerrado ou maracujá pérola) e *Passiflora cincinnata* Mast.(maracujá do mato, maracujá da caatinga), espécies que apresentam características interessantes para o cultivo agrícola, como elevado teor nutricional e sabor diferenciado dos seus frutos, e tolerância a doenças. O potencial destas espécies silvestres para o mercado foi fortalecido por meio de melhoramento genético, resultando no lançamento das cultivares ‘BRS Pérola do cerrado’ (*P. setacea*) e ‘BRS Sertão forte’ (*P. cincinnata*), que

apresentam maior produtividade, rendimento e tamanho dos frutos, e também mais resistência a doenças e tolerância a estresse hídrico (FALEIRO et al., 2017; 2018).

Além da utilização dos frutos na indústria e no mercado de frutas frescas, os maracujás também têm se destacado no mercado de plantas ornamentais devido à sua complexidade morfológica e exuberância de suas flores, com cores atrativas e formas exóticas (Figura 1). Embora as passifloras sejam bastante utilizadas como ornamentais em países europeus, a aplicação comercial para essa finalidade no Brasil ainda é incipiente (PEIXOTO, 2005; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; MIKOVSKI et al., 2019).

Com intuito de melhorar as perspectivas sobre o uso de maracujás no setor ornamental no nosso país, investimentos têm sido direcionados para a produção de híbridos interespecíficos que apresentem características mais vantajosas para este segmento, como maior produção de flores, possibilidade de florescimento durante todo o ano e resistência a doenças. Assim, recentemente, foram lançadas as cultivares 'BRS Estrelado Cerrado', 'BRS Roseflora', 'BRS Rubiflora' e 'BRS Pérola do Cerrado', todas produzidas pela EMBRAPA em associação com outras instituições. Essas variedades atendem às demandas tanto do paisagismo em ambientes externos, quanto à de produção de plantas de porte reduzido, para o uso em ambientes internos (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; FONSECA et al., 2017; MIKOVSKI et al., 2019).

Figura 1 – Diversidade de flores em espécies do gênero *Passiflora*



Fonte: <http://flickrhivemind.net/Tags/flores,passiflora/Recent>

Diversas espécies de *Passiflora* são também utilizadas como plantas medicinais. Suas folhas, raízes e frutos são utilizados na medicina popular desde o século XIX no preparo de chás, infusões, loções e emplastos para o tratamento de insônia, ansiedade e irritabilidade (DHAWAN et al., 2004). Além disso, em estudos farmacológicos com o gênero foram observadas ainda outras atividades biológicas, incluindo atividades antibacteriana, anti-hiperglicêmica, ansiolítica, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante, entre outras (PATEL et al., 2011; HE et al., 2020; CHIAVAROLI et al., 2020). Algumas dessas espécies estão presentes em diversas farmacopeias internacionais (DHAWAN et al., 2004; GOSMANN et al., 2011) e na brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

As diferentes atividades farmacológicas observadas em espécies de *Passiflora* estão associadas à presença de substâncias como alcaloides (FRYE; HAUSTEIN, 2007; LUTOMSKI; MALEK, 1975; TSUCHIYA et al., 1999), saponinas (YOSHIKAWA et al., 2000; REGINATTO et al., 2004; BIRK et al., 2005; GOSMANN et al., 2011; WANG et al., 2013) e substâncias fenólicas (DHAWAN et al., 2004), principalmente flavonoides (BARBALHO et al., 2011; MORAES et al., 1997; MÜLLER et al., 2005; ZERAIK; YARIWAKE, 2010), além de glicosídeos cianogênicos, carotenoides, aminoácidos, carboidratos, óleos essenciais, vitaminas, fibras e minerais, o que possibilita a classificação dos maracujás como alimento funcional (YOCKTENG et al., 2011; ZERAIK et al., 2010).

Flavonoides, especialmente os C-glicosilados derivados de apigenina e luteonina, são a principal classe de metabolitos secundários em espécies de maracujá, sendo considerados um importante marcador químico para a identificação de qualidade e fidelidade de diferentes materiais (SAKALEM et al., 2012; ZUCOLLOTO et al., 2012). Entre esses, orientina, isoorietina, vitexina, isovitexina, vitexina-2''-O-ramnosídeo e rutina são os mais utilizados em estudos de caracterização fitoquímica, devido à ampla ocorrência no gênero e às suas potencialidades farmacológicas como antioxidantes, ansiolíticos, antimicrobianos, antifúngicos e anti-inflamatórios (FARAG et al., 2016; GADIOLI et al., 2018; OZAROWSKI et al., 2018; ALVES et al., 2020).

Saponinas representam o outro grupo de substâncias majoritárias em extratos de *Passiflora*. Apresentam estrutura complexa, constituída por uma aglicona esteroidal ou terpenoide, ligada a cadeias de açúcares (SINGH et al., 2018). Nos maracujás, essas substâncias já foram relacionadas a atividades antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, anti-inflamatória, antioxidante e gastroprotetora, sendo o quadrangulosídeo uma saponina bem caracterizada de *P. alata* (GOSMANN et al., 2011; ROCHA et al., 2012; WASICKY et al., 2015). No entanto,

devido a sua complexidade estrutural e restrição de sua ocorrência a certos grupos dos representantes de maracujá, o estudo e o aprofundamento na caracterização fitoquímica e atividades biológicas das saponinas ainda são escassos.

Apesar da importância medicinal, agrônômica e ornamental, a maior parte das espécies de *Passiflora* ainda não é conhecida ou não foi devidamente caracterizada. Dessa forma, a prospecção, a conservação e a caracterização de germoplasma do maracujá são consideradas estratégias essenciais para o seu uso em programas de melhoramento genético, em sistemas de produção de mudas por enxertia e como plantas ornamentais ou medicinais.

1.1.1 *Passiflora suberosa* L.

Passiflora suberosa L., a espécie estudada neste trabalho, é popularmente conhecida como maracujazinho, maracujá-mirim ou maracujazinho-cortiça-preto. Pertence ao subgênero *Decaloba*, tendo sido mencionada em registros de descrição de plantas da América por Charles Plumier em 1693 (PORTER-UTLEY, 2014). É uma espécie nativa das Américas, que apresenta distribuição em regiões tropicais, ocorrendo em partes do México, na América Central e do Sul (ULMER; MACDOUGAL, 2004), embora seja encontrada também na Europa (PORTER-UTLEY, 2014). No Brasil, *P. suberosa* já foi encontrada em todas as regiões, ocupando domínios fitogeográficos impactados por ação antrópica, incluindo Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BERNACCI et al., 2015) (Figura 2).

As plantas são trepadeiras de pequeno porte, apresentando caule cilíndrico estriado quando jovens, e exibindo uma grossa camada suberosa quando adultas, característica que dá nome à espécie. Suas flores são pequenas (1,3 a 2,5 cm de diâmetro), com cinco sépalas de coloração verde-claro ou amarelo-esverdeado, e ausência de pétalas (Figura 3). Podem apresentar uma ou duas brácteas e duas séries de corona de filamentos filiformes. Os frutos são pequenos (0,6 a 1,5 cm de diâmetro), do tipo bagas, podendo ser ovóides ou globosos, com coloração verde quando imaturos, e roxo intenso, quando atingem a maturidade (Figura 3). As sementes são ovaladas, assimétricas ($3,0 - 4,0 \times 0,2 - 2,5$ mm) e alveoladas (CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

Figura 2 – Distribuição geográfica de *Passiflora suberosa* L. no Brasil



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>

A floração de *P. suberosa* ocorre ao longo de todo o ano, com o pico entre os meses de setembro e janeiro, e antese no início das manhãs. A frutificação acontece principalmente entre os meses de janeiro e maio (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). A espécie é classificada como autocompatível, ao contrário da maioria das passifloras (CRUZ et al., 2008). Sua reprodução cruzada é dependente de polinizadores, como aves, borboletas e abelhas, os quais se beneficiam de uma câmara nectarífera rasa e de fácil acesso. Os polinizadores mais comuns são vespas (*Mischocyttarus interjectus*) e abelhas (*Plebeia droryana* e *Augochlorella michaelis*) (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). Além disso, as flores de *P. suberosa* também são visitadas por outros insetos, como as borboletas *Heliconius charitonia*, que embora não estejam associadas ao processo de polinização, apresentam uma estreita relação evolutiva, visto que utilizam pólen e néctar como fonte nutritiva, e folhas para a postura de ovos (ULMER; MACDOUGAL, 2004; CRUZ et al., 2008).

Figura 3 – Folhas, flores e frutos de *Passiflora suberosa* L.



Foto: Gustavo Giacon.

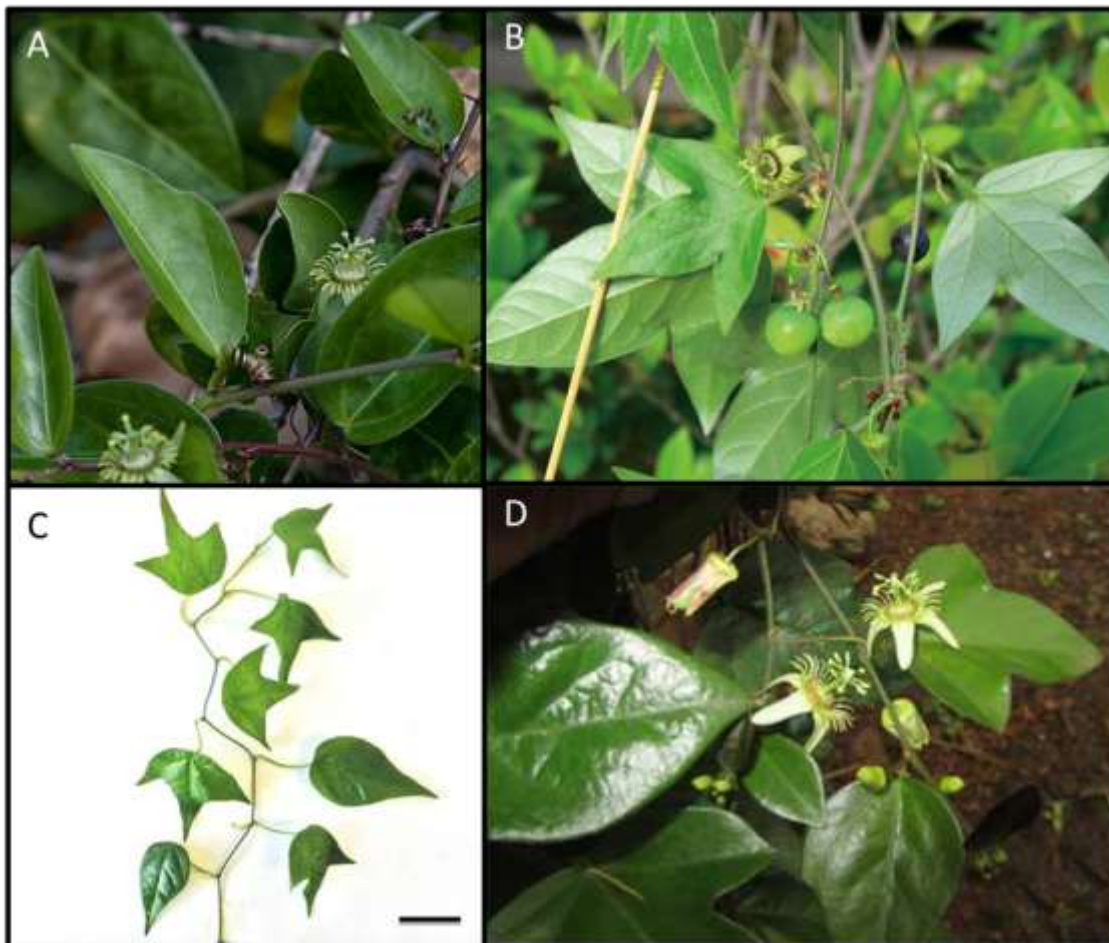
Fonte: <http://blogdoviveirista.blogspot.com/2017/12/micro-maracuja-preto-ou-maracujazinho.html>

Passiflora suberosa possui grande potencial ornamental devido às suas flores exóticas, aos frutos pequenos e roxos e à plasticidade morfológica de suas folhas, que podem ser polimórficas, variando de inteiras a profundamente trilobadas em um mesmo indivíduo (Figura 4) e apresentando glândulas nos pecíolos (ULMER; MACDOUGAL, 2004; CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014). Além disso, as folhas podem adquirir uma coloração arroxeada quando expostas à radiação solar intensa por longos períodos, em virtude do acúmulo de antocianinas e derivados fenólicos (BARP et al., 2006). Estas variações fenotípicas resultam em uma vasta sinonímia para diversos representantes da espécie, gerando dificuldades para a sua classificação taxonômica (CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

A variabilidade de *P. suberosa* também é observada em nível de ploidia, com espécimes diploides ($2n= 12$) e poliploides ($2n= 24$ e 36 cromossomos) (OTONI et al., 1996). Esta característica, assim como sua resistência a patógenos, tem despertado interesse para uso como fonte de variabilidade para o melhoramento de espécies cultivadas (JUNQUEIRA et al., 2005). Estudos já realizados demonstraram que *P. suberosa* apresenta resistência ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV) (OTONI et al., 1996) e ao fungo *Fusarium*

oxysporum f. sp. *Passiflorae*, e por isso, é utilizada como porta-enxerto na cultura do maracujá-amarelo (GARDNER, 1989).

Figura 4 – Aspectos morfológicos de *Passiflora suberosa* L.



Legenda: Espécimes de *P. suberosa* apresentando folhas inteiras (A), trilobadas(B) ou osdois tipos foliares simultaneamente (C e D).

Fonte: (A) <https://treasurecoastnatives.wordpress.com/category/passion-flower/>; (B) <http://taibif.tw/flower/detail.php?sc=Passiflora+suberosa&locale=tw>; (C) Marcela Vianna; (D) http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/apg_passiflor.htm.

Embora diversas espécies de *Passiflora* apresentem atividades farmacológicas reconhecidas, existem poucos relatos sobre o potencial de *P. suberosa*. Na medicina popular, essa espécie é utilizada para o tratamento de hipertensão, diabetes e de doenças de pele de origem bacteriana, ou como sedativo (DHAWAN et al., 2004). No entanto, os estudos sobre as atividades biológicas e investigações fitoquímicas que corroboram o uso etnobotânico são limitados. Spencer e Segler (1987) descreveram a presença de dois glicosídeos cianogênicos

ciclopentenoides, denominados de passisuberosina e epipassisuberosina. Além desses, a análise de extratos de frutos revelou a presença de oito tipos diferentes de antocianinas (KIDOY et al., 1997) que, além de apresentarem importância ecológica na atração de insetos e animais, podem ser utilizadas na indústria como corantes naturais (STINTZING; CARLE, 2004). Recentemente, Bandara e colaboradores (2018) e Sudasinghe e Peiris (2018) descreveram ações hipoglicêmica e hipolipidêmica em extratos aquosos de folhas de *P. suberosa*.

Considerando os potenciais ornamental, agrônomo e medicinal de *P. suberosa*, alguns estudos biotecnológicos foram desenvolvidos visando ao estabelecimento de sistemas de cultura de tecidos para essa espécie (MONTEIRO et al., 2000a; GARCIA et al., 2011a; ROSA; MONTE-BELLO; DORNELAS, 2016). Nesses trabalhos, plantas de *P. suberosa* foram obtidas pelo desenvolvimento de meristemas pré-existent e por organogênese, sendo o potencial morfogenético observado a partir de diferentes explantes. A produção de plantas por via direta foi observada em explantes internodais na presença de 6-benzilaminopurina (BAP) (GARCIA et al., 2011a), enquanto a organogênese indireta foi descrita a partir de segmentos nodais e foliares em resposta a BAP e ácido α -naftalenoacético (ANA) (MONTEIRO et al., 2000a; GARCIA et al., 2011a) e de segmentos radiculares na presença de BAP (ROSA; MONTE-BELLO; DORNELAS, 2016).

Os trabalhos relacionados acima serviram ainda como base para o desenvolvimento de metodologias de conservação *in vitro* em médio e longo prazo, por crescimento lento e criopreservação (GARCIA et al., 2011b; VIANNA et al., 2019).

1.2 Criopreservação

A criopreservação, considerada a alternativa mais adequada para a conservação de germoplasma vegetal em longo prazo, tem ampliado as perspectivas de conservação de recursos genéticos, tanto em relação ao tempo, quanto à qualidade dos propágulos. Essa metodologia baseia-se no armazenamento em temperaturas ultrabaixas, utilizando nitrogênio líquido (NL, -196°C) ou sua fase vapor (aproximadamente -150°C). Nessas condições, as reações celulares e os processos metabólicos são interrompidos, permitindo que o material seja estocado por períodos teoricamente ilimitados, com riscos reduzidos de variações genéticas e contaminação (ENGELMANN, 2011). Adicionalmente, a permanência do material em NL reduz os custos de manutenção e o espaço necessário para a conservação (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

A criopreservação vem sendo bastante utilizada como estratégia complementar na conservação de diversas espécies vegetais, principalmente aquelas que apresentam limitações para o uso de outras metodologias, como as que produzem sementes recalcitrantes, apresentam propagação vegetativa ou espécies raras e ameaçadas (DULLO et al., 1998). Além disso, é a única opção para o armazenamento em longo prazo de produtos biotecnológicos (CRUZ-CRUZ et al., 2013).

As metodologias de criopreservação foram desenvolvidas inicialmente para a conservação de células animais, utilizando glicerol e gelo seco para o armazenamento de espermatozoides de aves e bovinos (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). Os trabalhos para a criopreservação de células vegetais somente foram iniciados na década de 1960 (SAKAI, 1965; WANG et al., 2020). Embora o armazenamento em temperaturas ultrabaixas seja realizado de forma relativamente simples para diferentes tipos de células animais, o estabelecimento de protocolos de criopreservação vegetal é um processo mais complexo e com alta especificidade devido, principalmente, à presença da parede celular (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

Um dos principais aspectos que devem ser considerados na criopreservação é a formação de cristais de gelo resultante do congelamento da água intracelular, os quais podem afetar a integridade estrutural e coligativa das células, causando danos às membranas celulares e comprometendo a recuperação do material após o reaquecimento (KACZMARCZYK et al., 2012). Assim, uma etapa crítica do processo é a desidratação dos materiais, com o objetivo de remover parcialmente a água, prevenindo danos ocasionados pela cristalização (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2008). Nas primeiras técnicas desenvolvidas para a criopreservação de tecidos vegetais, denominadas clássicas ou convencionais (ENGELMANN, 2011) a desidratação é induzida pela redução gradual da temperatura, em velocidade controlada (0,5 - 2,0°C/min) até atingir, aproximadamente, -40°C, antes da imersão do material em NL (CRUZ-CRUZ; GONZÁLEZ-ARNAO; ENGELMANN, 2013; KULUS; ZALEWSKA, 2014). O resfriamento do material biológico, a uma taxa baixa e constante, induz a formação de gelo (nucleação) nos espaços extracelulares, diminuindo a disponibilidade de água líquida. Esse desequilíbrio osmótico estimula um fluxo contínuo de saída da água do meio intracelular, que se torna muito concentrado. Essa condição restringe a movimentação das moléculas de água residual e reduz as possibilidades de arranjo na forma de cristais de gelo (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011). Além disso, a membrana plasmática age como uma barreira, permitindo que o resfriamento no meio intracelular seja mantido, porém sem formação de gelo (ENGELMANN, 2011; KACZMARCZYK et al., 2012).

A técnica de desidratação induzida por resfriamento é baseada nos processos naturais observados nos vegetais. Plantas de clima temperado são naturalmente capazes de desenvolver tolerância ao resfriamento pela diminuição gradual da temperatura (MIURA; FURUMOTO, 2013), o que induz cascatas de sinalização e reprogramação gênica que resultam em alterações metabólicas e fisiológicas (JAN et al., 2009). Essas alterações incluem o aumento da concentração de açúcares, proteínas e de aminoácidos, como a prolina, fundamentais para o ajuste osmótico (VAN RENSBURG et al., 1993; PANIS; LOMBARDI, 2005). Plantas de clima tropical e subtropical, no entanto, são mais sensíveis a baixas temperaturas e, em sua maioria, não possuem capacidade de aclimação ao frio (XIN; BROWSE, 2000; JAN; HUSSAIN; ANDRABI, 2009). Além disso, tecidos multicelulares complexos, com diferentes tipos celulares, demandam também condições específicas para desidratação. Portanto, a indução da tolerância ao resfriamento nestes materiais requer a utilização de substâncias com a dupla função de desidratar e proteger os sistemas celulares (MARTINEZ-MONTERO; HARDING, 2015).

A partir da década de 1990, foram desenvolvidas técnicas de criopreservação, denominadas contemporâneas, nas quais a desidratação do material é realizada antes da imersão direta em NL. Nessas técnicas, a remoção da água intracelular é alcançada por meio da exposição do material a substâncias altamente concentradas (desidratação osmótica) ou por desidratação evaporativa. Dessa forma, quando o material vegetal é imerso em NL, ocorre a vitrificação do meio intracelular, que se encontra concentrado, passando da fase líquida para um estado vítreo amorfo, que apresenta propriedades físicas e mecânicas de um sólido, mas sem cristalização (TAYLOR; et al., 2004; ENGELMANN, 2011).

Para a desidratação osmótica, o material vegetal é, geralmente, exposto a soluções constituídas por uma mistura de substâncias crioprotetoras. Esses componentes, capazes de diminuir o ponto de congelamento (KULUS; ZALEWSKA, 2014), incluem açúcares complexos, álcoois, polietilenoglicol e outras substâncias de alto peso molecular, além de moléculas pequenas, como dimetil sulfoxido (DMSO), glicerol, etilenoglicol, propileno glicol. As substâncias de alto peso molecular são osmoticamente ativas e induzem a desidratação pelo aumento da osmolaridade do meio extracelular, enquanto as de menor peso molecular apresentam facilidade de difusão pela membrana atuando, principalmente, no aumento da viscosidade do citoplasma (KIM et al., 2009). Embora as substâncias crioprotetoras tenham sido, durante alguns anos, classificadas como penetrantes e não penetrantes (KIM et al., 2009), essas definições não são mais recomendadas, uma vez que a capacidade de atravessar as membranas não é absoluta. Em teoria, todos os crioprotetores são capazes de penetrar na célula, sendo as

diferenças, portanto, relacionadas apenas à velocidade de penetração e à ação sinérgica entre as diferentes substâncias, o que pode interferir na facilidade da penetração (HUGHES; MANCERA, 2014).

As soluções de vitrificação variam quanto ao tipo e à concentração dos componentes (Quadro 1). Como algumas dessas substâncias são tóxicas, o tipo de solução crioprotetora, assim como o tempo e a temperatura de exposição do material, são parâmetros importantes que devem ser avaliados no desenvolvimento de protocolos de criopreservação baseados no processo de vitrificação (VOLK; WALTERS, 2006).

As soluções crioprotetoras mais utilizadas atualmente são a *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) e a *Plant Vitrification Solution 3* (PVS3) (KIM et al., 2009; KULUS; ZALEWSKA, 2014). Essas soluções atuam nas propriedades coligativas das células, uma vez que possuem componentes solúveis capazes de interagir com a água através de ligações de hidrogênio (TEIXEIRA et al., 2014). Além disso, os grupos hidrofílicos dos seus componentes também interagem com a porção polar dos fosfolipídios de membrana, contribuindo para sua estabilização (KACZMARCZYK et al., 2012).

Embora seja amplamente utilizada, a PVS2 possui componentes citotóxicos quando em altas concentrações, como o dimetilsufóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG), aos qual a membrana celular é altamente permeável (SAKAI; ENGELMANN, 2007; KIM et al., 2009). A ação conjunta dessas substâncias, principalmente quando em altas concentrações, pode levar à formação de poros, o que altera a dinâmica de penetração de água e demais crioprotetores, podendo causar danos celulares (FUNNEKOTTER et al., 2017). O glicerol, por exemplo, adquire maior poder de difusão na presença de DMSO e EG (KIM et al., 2009). Por esse motivo, recomenda-se que a exposição às soluções crioprotetoras seja realizada à temperatura de 0°C, o que diminui a velocidade de penetração dos crioprotetores (SAKAI; ENGELMANN, 2007). Por outro lado, a PVS3 oferece menor risco, por ser composta apenas de sacarose e glicerol. Contudo, o grau e a intensidade da sensibilidade do material à solução crioprotetora é variável para cada espécie e tipo de material (SAKAI; ENGELMANN, 2007; KIM et al., 2009).

Diferentes metodologias com base no processo de vitrificação já foram desenvolvidas, tais como dessecação, vitrificação, encapsulamento-vitrificação e encapsulamento-desidratação. Novos avanços da área de criobiologia têm ocorrido nos últimos anos, como consequência do estabelecimento de técnicas que otimizam a relação entre o tempo de exposição, a quantidade e velocidade de penetração de crioprotetores, assim como a aceleração das trocas de temperatura durante as etapas de imersão em NL e reaquecimento. Nesse sentido, as técnicas de vitrificação

em gota (PANIS et al, 2005), vitrificação por infiltração a vácuo (KAZUTAKA et al., 2012) e vitrificação/desidratação em placas de alumínio (YAMAMOTO et al., 2011; 2015; NIINO et al., 2013) vêm sendo consideradas bastante promissoras.

Nas metodologias de desidratação ou vitrificação em placas (crioplacas), os explantes são aderidos em uma base de alumínio e expostos à dessecação por corrente de ar (D-Crioplaca) ou a soluções de vitrificação (V-Crioplaca), antes da imersão direta em NL (MATSUMOTO et al., 2017). A alta condutividade térmica do metal e quantidade mínima de solução crioprotetora utilizada aumentam a velocidade dos processos de resfriamento e reaquecimento, favorecendo a sobrevivência do material criopreservado (KULUS; ZALEWSKA, 2014). Além disso, o reaquecimento do material é feito também em soluções altamente concentradas, à temperatura ambiente. As crioplacas apresentam ainda a vantagem adicional de viabilizar a manipulação de um grande número de explantes, evitando injúrias e perdas durante as diferentes etapas do processo (YAMAMOTO et al., 2012). Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para diferentes espécies vegetais, incluindo crisântemo (YAMAMOTO et al., 2011), *Dianthus caryophyllus* (SEKIZAWA et al., 2011), *Fragaria spp* (YAMAMOTO et al., 2012), *Clinopodium odorum* (ENGELMANN-SYLVESTRE; ENGELMANN, 2015), *Cleome rosea* (CORDEIRO et al., 2015) e *Passiflora pohlii* (SIMÃO et al., 2018), *Platycodon grandiflorum* (MATSUMOTO et al., 2020).

Independente do protocolo de criopreservação utilizado, algumas etapas, como a desidratação e a crioproteção, são consideradas críticas, devido ao seu potencial de induzir danos celulares quando realizadas em condições sub-ótimas. Dessa forma, um importante aspecto que deve ser considerado no estabelecimento de protocolos de criopreservação é caracterização de alterações celulares e fisiológicas nas suas diferentes etapas.

1.2.1 Estresse oxidativo e indução de crioinjúrias

Os danos decorrentes do processo de criopreservação são coletivamente denominados *crioinjúrias* e podem resultar em baixas taxas de recuperação pós-resfriamento (PANIS; LOMBARDI, 2005; UCHENDU et al., 2010b). Os principais tipos de crioinjúrias (Figura 5) resultam do estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas moléculas são altamente reativas e capazes de retirar elétrons de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, resultando na sua alteração estrutural e perda de função (UCHENDU et al., 2010b). As ERO podem ser constituídas por radicais livres, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($OH^{\bullet}$), hidroperóxil ($OOH^{\bullet}$), peróxil ($ROO^{\bullet}$), alcóxil ($RO^{\bullet}$) ou não radicais, como oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) (KACZMARCZYK et al., 2012).

Em condições fisiológicas normais, a produção de ERO ocorre principalmente em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, como resultado do metabolismo energético da célula. Dessas, 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$ e H_2O_2 são os mais comumente associados ao estresse oxidativo (DEMIDCHIK, 2015). O 1O_2 , por exemplo, pode ser formado nos cloroplastos durante a fotossíntese, e sua superprodução em condições de estresses luminoso, hídrico ou salino, pode levar à perda da atividade do fotossistema II e à morte celular (ASADA, 2006; DEMIDCHIK, 2015).

A produção de superóxido, por sua vez, ocorre pela redução monovalente do O_2 em diversos componentes celulares, como os fotossistemas I e II dos cloroplastos e os complexos I e III das mitocôndrias. Além disso, esse radical também pode ser produzido pela ação da NADPH oxidase presente na membrana plasmática e nos peroxissomos (MØLLER et al., 2007; SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015). Embora o $O_2^{\bullet-}$ seja moderadamente reativo e de vida curta, é o primeiro radical formado em sistemas biológicos, a partir do qual são derivadas outras espécies mais reativas, sendo considerado um fator importante para o aumento do estresse oxidativo (SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015).

Figura 5 – Alterações induzidas pelo processo de criopreservação



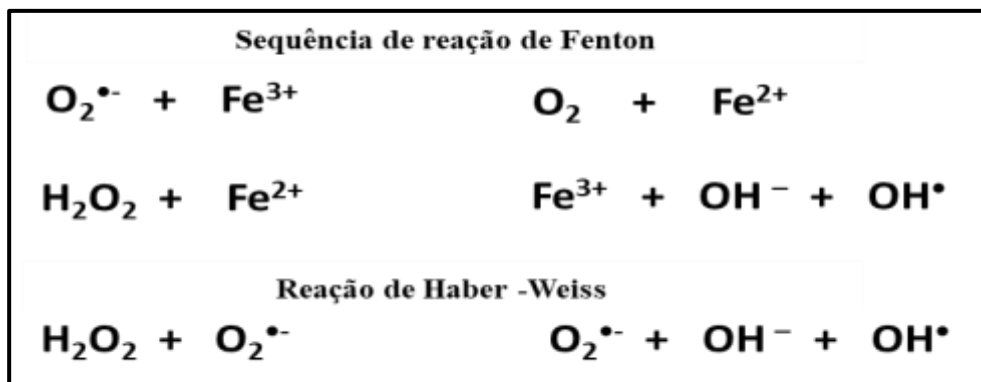
Fonte:

KACZMARCZYK et al. (2012), adaptado.

O peróxido de hidrogênio é um não radical produzido pela dismutação do superóxido, que não possui um sítio específico de formação. Apesar de não apresentar alta reatividade, o H_2O_2 pode oxidar componentes biológicos e causar danos à célula. Além disso, pode ser potencialmente tóxico em grandes quantidades, pois é a única ERO com capacidade de difusão através das aquaporinas nas membranas, podendo causar alterações em diversos compartimentos celulares (GECHEV et al., 2006; SHARMA et al., 2012).

Os radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), formados pela reação entre os íons metálicos Cu^{+3} e Fe^{+3} com H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$, são considerados os mais relevantes entre as ERO, especialmente em relação às membranas celulares (Figura 6). Isso se deve, possivelmente, à sua alta reatividade e à ausência de mecanismos enzimáticos específicos para a sua eliminação (VRANOVÁ et al., 2002; KACZMARCZYK et al., 2012; SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015).

Figura 6 – Formação de radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) através da reação de Fenton e Haber-Weiss

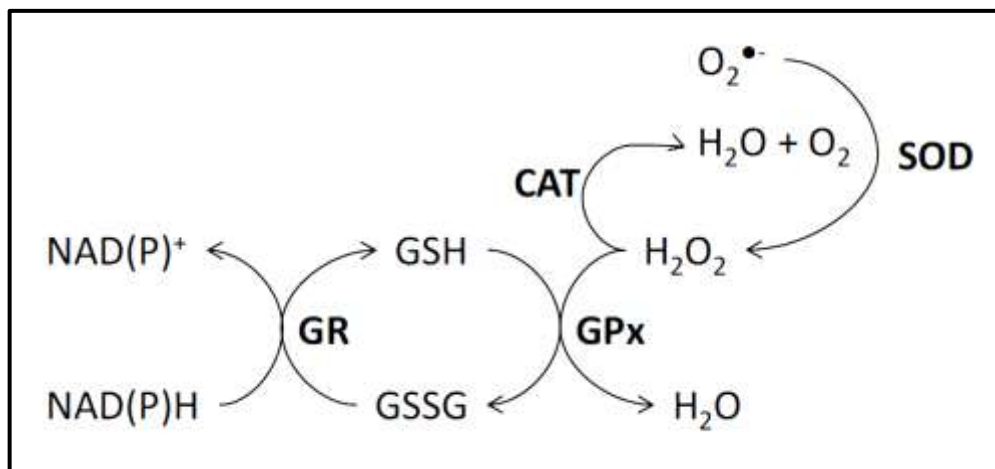


Fonte: <http://radicaisbiobio.blogspot.com/2008/06/ferro-radicais-livres-e-patologias.html>

Embora as ERO possam representar uma fonte potencial de danos para as células, sua produção em concentrações fisiológicas é importante para diversos processos celulares básicos. Em vegetais, atuam no crescimento e alongamento de raízes, dominância apical, maturação de elementos traqueais, desenvolvimento de tricomas e senescência (GECHEV et al., 2006; SHARMA et al., 2012). Além disso, são importantes também na transdução de sinais em resposta a estresses abióticos e bióticos, desempenhando o papel de mensageiros secundários nas vias mediadas pelo ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico, ácido salicílico, e na ativação de canais de cálcio intracelulares, induzindo mecanismos de proteção e aclimação (KWAK et al., 2006; GECHEV et al., 2006).

A manutenção das ERO em níveis basais nas células ocorre pela ação de um sistema antioxidante que inclui enzimas, vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol) e metabólitos secundários, como os flavonoides (WANG; DENG, 2004; UCHENDU et al., 2010a). A ação dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante celular tem papel primordial no controle da produção e eliminação de ERO (BAEK; SKINNER, 2012). Entre esses, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases, como a ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e redutases como a dehidroascorbato redutase (DHAR) e monodehidroascorbato redutase (MDAR), que atuam de forma integrada (Figura 7) (BAEK; SKINNER, 2012).

Figura 7 – Ação integrada dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante celular na remoção de ERO



Legenda: CAT – catalase; SOD – superóxido dismutase; GPx – glutathione peroxidase; GR – glutathione reductase; GSH – glutathione; GSSG – glutathione oxidada

Fonte: FUNNEKOTTER (2015)

A SOD é a enzima responsável pela dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 (Figura 7). Essa metaloenzima pode ser encontrada em diferentes isoformas, dependendo do metal integrante em grupo prostético, tal como, Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD (DEL RÍO et al., 2017). A distribuição celular das isoformas de SOD está diretamente relacionada a sítios de produção de $O_2^{\bullet-}$, podendo ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, incluindo núcleo, citosol, apoplasto, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (DEL RÍO et al., 2017). A enzima desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo, já que atua de forma direta na regulação do $O_2^{\bullet-}$ e inibe, de forma indireta, a produção do $OH^{\bullet}$ pela reação de Haber-Weiss (SHARMA et al., 2012; BAEK; SKINNER, 2012; DEL RÍO et al., 2017).

A CAT é uma metaloenzima com estrutura tetramérica, contendo um grupamento heme, capaz de converter duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Figura 7). Pode ser encontrada em diversos locais na célula, porém seus principais sítios de ação são os peroxissomos, organelas onde existe uma elevada produção de H_2O_2 (SHARMA et al., 2012). Embora apresente alta especificidade com o substrato, sua afinidade é baixa, visto que é necessária a captura simultânea de duas moléculas de H_2O_2 em seu sítio ativo. Assim, sua atividade é mais eficaz na presença de altas concentrações de H_2O_2 , condição em que pode neutralizar até 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto. Além disso, a catalase não requer o consumo de equivalentes redutores, como o NADPH, utilizado por outras peroxidases, conferindo uma atividade energeticamente

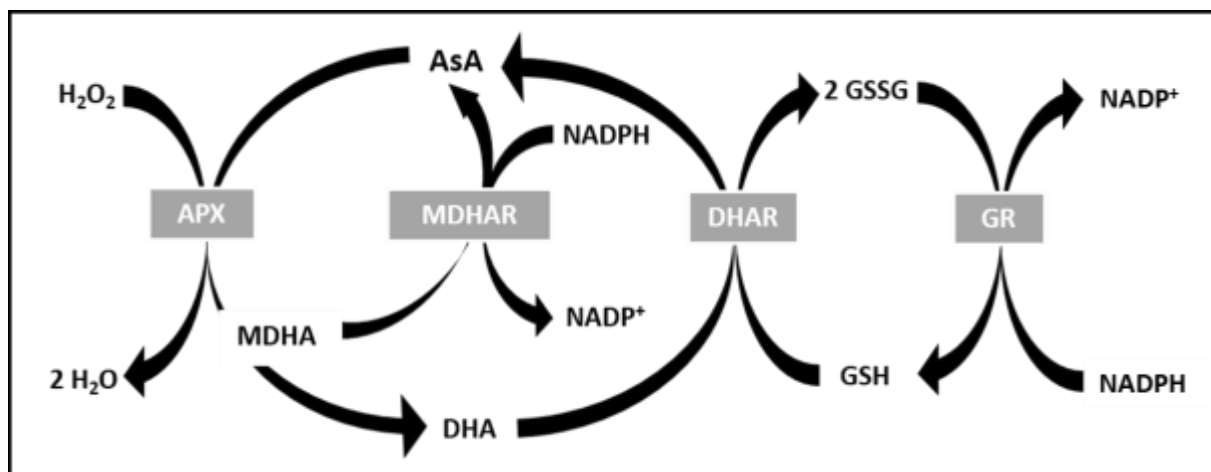
econômica para a célula em situações de estresse (MITTLER, 2002; SHARMA; AHMAD, 2014; IMAHORI, 2014).

A APX é outra enzima responsável pela degradação do H_2O_2 , que possui alta afinidade pelo substrato. Apesar de ser encontrada em diferentes sítios intracelulares, apresenta uma ação mais destacada nos cloroplastos, onde reduz H_2O_2 utilizando duas moléculas de ascorbato como doador de elétrons, gerando o radical monodeidroascorbato (MDHA). A produção de ascorbato utilizado nessa reação é realizada a partir de MDHA ou do deidroascorbato (DHA) no ciclo ascorbato-glutationa, conhecido como ciclo Halliwell-Asada, através de várias reações de oxirredução (Figura 8) (SHARMA et al., 2012).

Embora o sistema antioxidante atue de forma eficaz em condições normais, a formação das ERO pode exceder a capacidade antioxidante da célula em situações de estresse, tendo como consequência diversos tipos de danos, incluindo a peroxidação de lipídios, rupturas de membranas, alterações em proteínas e ácidos nucleicos e outras desordens que podem levar à morte celular (BENSON, 1990; MITTLER, 2002; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; HALLIWELL, 2006). Entre essas injúrias, a peroxidação de lipídios é considerada a mais crítica para a recuperação do material após a criopreservação (UCHENDU et al., 2010b). Os fosfolipídios de membrana, principalmente os que contêm ácidos graxos poli-insaturados, são os principais alvos do estresse oxidativo, em especial pela ação de radicais hidroxil (FANG et al., 2008; SHARMA et al., 2012), resultando em alterações na integridade e função das membranas, além de causar uma série de lesões que podem levar à morte celular (BENZIE, 1996).

A peroxidação dos fosfolipídios pode ainda resultar na formação de subprodutos que também são reativos e podem causar danos a outras moléculas (ESTERBAUER; ZOLLNER, 1989). Esses subprodutos incluem os lipídios hidroxiperóxidos, hidrocarbonetos voláteis e aldeídos, os quais são considerados como indicadores de danos causados por crioinjúria (UCHENDU et al., 2010b; WEN et al., 2012). Entre esses, o malondialdeído (MDA), produto final dessa peroxidação, tem sido utilizado como um biomarcador de estresse oxidativo desde 1960 (HEALTH; PAKER, 1968; JOHNSTON et al., 2007b). A quantificação do MDA pode ser realizada espectrofotometricamente, por meio de uma reação com o ácido tiobarbitúrico, que gera um produto de coloração rosa-avermelhada, com absorbância máxima a 532 nm (HODGES et al., 1999). Por ser um ensaio simples, rápido e de baixo custo, essa técnica vem sendo explorada por vários autores para a detecção de crioinjúrias (Quadro 1).

Figura 8 – Ciclo ascorbato-glutationa e ação da APX na neutralização de H_2O_2



Legenda: AsA– ácido ascórbico; GSH – glutathiona; APX – ascorbatoperoxidase; MDHAR –monodehidroascorbato redutase; DHAR –dehidroascorbato redutase; GR –glutathiona redutase; MDHA –monodehidroascorbato; DHAR – dehidroascorbato.

Fonte: BLOKHINA et al. (2003), adaptado.

O acúmulo de ERO em condições de estresse é refletido também na produção e na atividade de enzimas envolvidas na resposta antioxidante da célula, como SOD, CAT, APX e GR, entre outras (LYNCH et al., 2011). Assim, análises dessas enzimas vêm sendo bastante utilizadas para caracterizar as etapas mais críticas de protocolos de criopreservação (LYNCH et al., 2011; DANOVA et al., 2012; GEORGIEVA et al., 2014; CHEN, et al., 2015) (Quadro 1).

Como os mecanismos de indução e ação das crionjúrias ainda não estão completamente elucidados, principalmente em espécies tropicais, os danos resultantes da criopreservação não podem ser previstos. Dessa forma, a implementação de sistemas de monitoramento do estresse oxidativo induzido pela criopreservação é de grande importância para determinar as etapas mais críticas dos protocolos e possibilitar o uso direcionado de substâncias com ação antioxidante, visando à otimização das taxas de recuperação de plantas pós-resfriamento.

Quadro 1 – Principais trabalhos de avaliação do estresse oxidativo associado à criopreservação de plantas

Espécie	Material vegetal	Avaliação	Etapas	Referência
<i>Ribes ciliatum</i> e <i>Ribesnigrum</i>	Ápices caulinares	Dosagem de etileno, metano, fenóis totais, clorofila a/b, proteínas totais	Pré-condicionamento em sacarose, encapsulamento, dessecação em fluxo de ar, armazenamento em NL	JOHNSTON et al., 2007a
<i>Zea mays</i>	Embriões zigóticos	Extravasamento de eletrólitos, caracterização ultraestrutural, atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX, DHAR, CAT e GR); MDA	Dessecação em sílica gel e reaquecimento	WEN et al., 2010
<i>Rubus</i> spp.	Ápices caulinares	Deteção de MDA	Pré-tratamento, osmoproteção, reaquecimento	UCHENDU et al., 2010b
<i>Hypericum perforatum</i>	Ápices caulinares	Produção de hipericina, detecção de carotenoides, prolina, H ₂ O ₂ e MDA	Recuperação de plantas	SKYBA et al., 2010
<i>Olea europaea</i>	embriões somáticos	Deteção de H ₂ O ₂ , CH ₄ ; atividade de enzimas antioxidantes (SOD, POD, CAT e GR)	Pré-cultura	LYNCH et al., 2011
<i>Livistona chinensis</i>	Embriões zigóticos	Extravasamento de eletrólitos, caracterização ultraestrutural, atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX, DHAR, CAT e GR), detecção de MDA	Dessecação em sílica gel e reaquecimento	WEN et al., 2012
<i>Amarylli sbelladonna</i> e <i>Haemanthus montanus</i>	Embriões zigóticos	Quantificação de O ₂ ^{•-} , atividade de enzimas antioxidantes (SOD, POD, CAT e GR)	Dessecação, crioproteção e resfriamento (rápido e lento)	SERSHEN et al., 2012
<i>Dendrobium</i>	Protocormos	Quantificação de atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT)	Pré-cultura, osmoproteção, desidratação, <i>unloading</i> , recuperação	POOBATHY et al., 2013
<i>Lilium</i> × <i>siberia</i>	Pólen	Deteção de ERO	Osmoproteção, desidratação, reaquecimento, <i>unloading</i> , resfriamento	XU et al., 2014
<i>Brassidium</i>	protocormos	Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes CAT, APX	Pré-cultura; osmoproteção, desidratação, reaquecimento,	RAHMAH et al., 2015

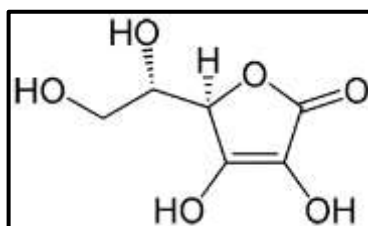
			<i>unloading</i> , resfriamento	
<i>Arabidopsis</i>	Plântulas	Quantificação de $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, H_2O_2 , quantificação e atividade de enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, POD, CAT, AsA e GSH), detecção de MDA	Osmoproteção, desidratação, reaquecimento, recuperação	CHEN et al., 2015
<i>Agapanthus praecox</i>	Calos embriogênicos	Quantificação de $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, H_2O_2 , quantificação e atividade de enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, POD, CAT, AsA e GSH), detecção de MDA	Pré-cultura, desidratação, reaquecimento, diluição e recuperação	ZHANG et al. 2015
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plântulas	Deteção <i>in situ</i> de ERO ($O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ e H_2O_2) e quantificação de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e POD)	Pré-cultura, osmoproteção, desidratação, reaquecimento, diluição e recuperação	REN et al., 2015
<i>Agapanthus praecox</i>	Calos embriogênicos	Quantificação de ERO ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) e de enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, POD, CAT, AsA e GSH), detecção de MDA	Pré-cultura, osmoproteção, desidratação, reaquecimento, diluição, recuperação	CHEN et al., 2016
<i>Hancorniasp eciosa</i>	Gemas laterais	Atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT), detecção de MDA e H_2O_2	Reaquecimento	PRUDENTE et al., 2017
<i>Passiflora ligularis</i>	Embriões	Atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT), MLS e ICL, detecção de MDA e H_2O_2 . Quantificação de prolina	Recuperação	PRUDENTE et al., 2017
<i>Oryza sativa</i>	plântulas	Histodeteção de ERO ($OH^{\cdot}$ e H_2O_2), quantificação de enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, APX, CAT, MDHAR, DHAR, GR, AsA e GSH), detecção de MDA	Pré-cultura, osmoproteção, desidratação, resfriamento	HUANG et al., 2018
<i>Peonia lactiflora</i> <i>Magnolia denudata</i>	Pólen	Quantificação da atividade de enzimas e substância antioxidantes (SOD, CAT e AsA), detecção de MDA e EROS	Controle Recuperação	JIA et al., 2018
<i>Actinidia chinensis</i>	Ápice	Quantificação da atividade de enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, APX, CAT, GR AsA e GSH), detecção de peróxido de lipídios e proteínas	PC Pré-cultura + PC PC + pré-cultura + ASA	MATHEW et al., 2019

		carboniladas		
<i>Paeonia lactiflora</i>	Pólen	Quantificação de ERO, enzimas e substâncias antioxidantes (SOD, CAT, AsA), conteúdo de cálcio, taxa de apoptose (caspase tipo 3) detecção de MDA	Recuperação	REN et al., 2019
<i>Paeonia lactiflora</i>	Pólen	Quantificação de ERO (H_2O_2 , $OH^\bullet$; $O^\bullet$), enzimas (SOD, CAT, POD, APX GR) e substâncias antioxidantes (GSH e AsA), taxa de apoptose (caspase tipo 3)	Controle Recuperação (após 1, 3, 5 e 8 meses)	REN et al., 2020
<i>Agapanthus praecox</i>	Calos embriogênicos	Quantificação de ERO (H_2O_2 , $OH^\bullet$), enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POD), taxa de apoptose (caspase tipos 1 e tipo 3), detecção de MDA	Controle, pré-cultura, osmoproteção, desidratação, diluição e recuperação	CHEN et al., 2021
<i>Agapanthus praecox</i>	Plântulas	Quantificação de ERO (H_2O_2), MDA, atividade de enzimas (CAT e POD) substâncias (AsA e GSH) antioxidantes e análise expressão gênica	Osmoproteção, desidratação e reaquecimento	ZHANG et al., 2021
<i>Paeonia suffruticosa</i>	Polén	Quantificação de ERO (H_2O_2 , $OH^\bullet$; $O^\bullet$), MDA, enzimas (SOD, CAT, GR, POD, APX) e substâncias (GSH e AsA) antioxidantes, detecção de proteínas carboniladas	Controle Recuperação (após 1, 3, 5 e 8 meses)	REN et al 2021
<i>Dendrobium nobile</i>	Protocormos	Quantificação de ERO (H_2O_2), enzimas (SOD, CAT, APX, GR) e substâncias (AsA e GSH) antioxidantes, Atividade de NADPH e conteúdo de ACC	Pré-cultura, osmoproteção e reaquecimento	ZHANG et al., 2021

Legenda: AsA= ácido ascórbico; GSH= glutathione; GR= glutathione redutase; SOD= superóxido dismutase; CAT= catalase; APX= ascorbatoperoxidase; POD= peroxidase; MDA= malondialdeído; MDHAR = monodehidroascorbato redutase; DHAR = dehidroascorbato redutase; MLS = malatositase; ICL = isocitratoliase; PC = Pré-condicionamento À baixa temperatura

Entre as substâncias com ação antioxidante mais utilizadas em protocolos de criopreservação, estão o ácido ascórbico e a glutathione (UCHENDU et al., 2010b; CHEN et al., 2016; PRUDENTE et al., 2017). O ácido ascórbico (Figura 9), também conhecido na sua forma aniônica como ascorbato e, popularmente, como vitamina C, é um dos antioxidantes mais significativos na defesa celular, neutralizando diretamente os radicais superóxido, hidroxil e oxigênio singlete (MAKAVITSKAYA et al., 2017). Essa molécula ocorre em altas concentrações em todos os compartimentos celulares e pode atuar como cofator de enzimas, como as peroxidases e enzimas do ciclo ascorbato-glutathione. Adicionalmente, o ascorbato atua como precursor em algumas vias de biossíntese e participa da renovação do α -tocoferol (vitamina E), o que reforça sua importância nos processos de defesa antioxidante celular (AKRAM et al., 2017).

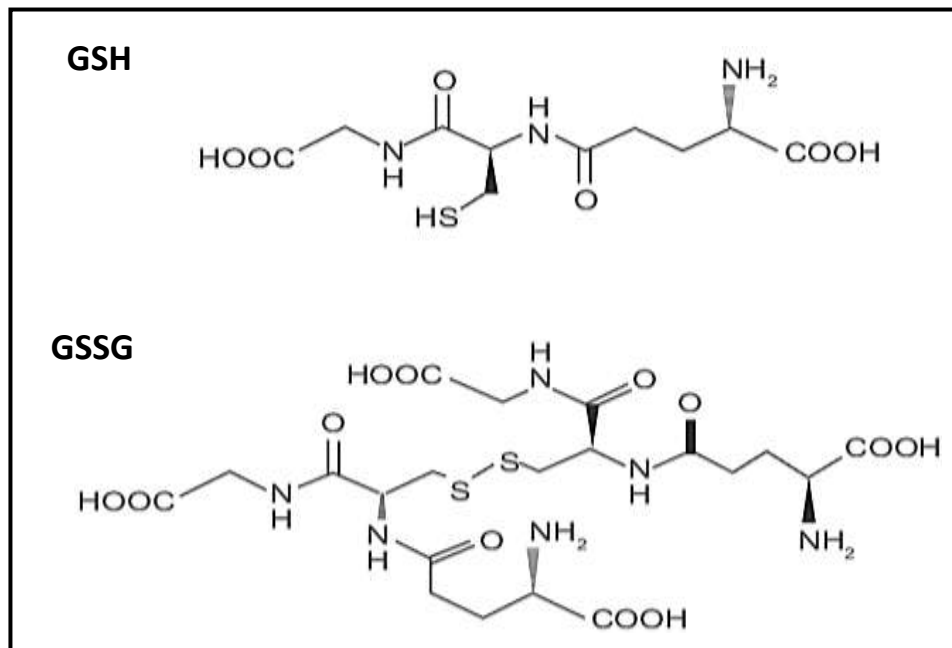
Figura 9 – Estrutura molecular do ácido ascórbico



Fonte: <https://www.worldofmolecules.com/antioxidants/vitaminC.htm>

A glutathione (γ -L-glutamyl-L-cisteinylglycine) é um tripeptídeo de baixo peso molecular formado por glutamato, cisteína e glicina, pela ação das enzimas glutamylcisteína sintase e glutathione sintase. É considerada uma das substâncias mais abundantes nas células (GILL et al., 2013; SINGH et al., 2016), podendo ser encontrada em altas concentrações em todos os compartimentos celulares sob sua forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) (Figura 10). As proporções entre essas formas são mantidas em níveis adequados para a resposta antioxidante pela ação da enzima glutathione redutase (GR) (GILL et al., 2013; ANJUM et al., 2014).

Figura 10 – Estruturas moleculares da glutathiona nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)



Fonte: WATANABE et al. (2014), adaptado.

A glutathiona participa direta ou indiretamente de diversos processos metabólicos, tais como a sinalização para desenvolvimento vegetal e morte celular. No sistema antioxidante, atua diretamente na captura de radicais hidroxil e oxigênio singlete (GILL et al., 2013; DISTÉFANO et al., 2018). Devido à presença de grupo tiol (-SH), essa molécula desempenha um papel fundamental na captura de metais e na proteção de grupo tiol de proteínas, funcionando como um redutor dissulfeto (NOCTOR et al., 2012; 2017). Além disso, atua na manutenção da homeostase do estado redox das células, participando no ciclo ascorbato-glutathiona, como substrato de peroxidases e mantendo o *status* reduzido de outros agentes antioxidantes (GILL et al., 2013; SINGH et al., 2016; HASANUZZAMAN et al., 2019).

1.2.2 Criopreservação aplicada à conservação de plantas com potencial medicinal

Metabólitos secundários ou especiais são substâncias produzidas pelas plantas em resposta a interações com o ambiente, permitindo assim a sua integridade, sobrevivência e tolerância a condições adversas. Dessa forma, enquanto o metabolismo primário dos vegetais está envolvido com o crescimento e desenvolvimento do vegetal, o metabolismo secundário está ligado às respostas das plantas ao ambiente, especialmente em condições de estresse químico, físico ou biológico (KESSLER; KALSKE, 2018; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários são produzidos pelos vegetais por meio de diferentes vias biossintéticas, podendo ser classificados de acordo com sua origem química. Os derivados das vias do acetato incluem como os ácidos graxos, prostaglandinas, poliacetilenos, antraquinonas e tetraciclins, enquanto os derivados da via do chiquimato abrangem os alcaloides aromáticos e fenilpropanoides precursores de estilbenos, flavonoides, ligninas, lignanas e cumarinas. Além dessas, existem os derivados das vias do mevalonato (MEV) e do fosfato de 2-metileritritol (MEP), incluindo terpenoides e esteroides, como as saponinas triterpênicas e esteroidais (DEWICK, 2009; SIMÕES et al., 2017).

Os metabólitos secundários vêm sendo amplamente utilizados como pigmentos, biopesticidas, aditivos alimentares, agroquímicos e fármacos (CANTRELL et al., 2012; DAVIES; DEROLE, 2014; FULDA; EFFERTH, 2014; MASSON et al., 2014). Nos últimos anos, a utilização das plantas para fins medicinais tem aumentado significativamente em todo o mundo, como consequência da maior demanda por terapias naturais e de menor custo. A comprovação da eficácia terapêutica de muitos metabólitos tem acompanhado essa demanda, com base na realização de diversos trabalhos científicos. No entanto, a coleta predatória e a destruição de ecossistemas, especialmente para fins agrícolas, tem resultado em perda de espécies, muitas ainda não descritas ou caracterizadas.

A criopreservação representa uma importante alternativa de conservação em longo prazo de plantas de interesse medicinal (POPOVA et al., 2011; KUNDU et al., 2018), tendo em vista que a interrupção dos eventos metabólicos durante o armazenamento em temperaturas ultrabaixas assegura, em teoria, a manutenção do seu potencial morfogênético e da sua capacidade biossintética (ENGELMANN, 2011; MATSUMOTO; NIINO, 2017). Contudo, considerando a possibilidade de danos oxidativos em etapas críticas dos protocolos de criopreservação, o estabelecimento de protocolos de criopreservação para espécies produtoras de

substâncias de interesse deve incluir a avaliação da manutenção de sua capacidade biossintética pós resfriamento. Para isso, a produção de substâncias bioativas pelos materiais criopreservados deve ser comparada à dos materiais mantidos *in vitro* ou sob condições naturais, por meio de análises cromatográficas e/ou pela comparação de suas atividades biológicas.

A detecção, identificação e quantificação de substâncias presentes em materiais submetidos à criopreservação podem ser realizadas por meio de análises cromatográficas (DANOVA et al., 2012; BI et al., 2016; BRUŇÁKOVÁ; CELLÁROVÁ, 2017; WANG et al., 2021b), principalmente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), as quais permitem a separação de componentes distintos em uma determinada amostra, em função da distribuição e interação destes com duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel (BONTA, 2017).

Nos últimos vinte anos, a estabilidade metabólica de materiais submetidos à criopreservação foi investigada em *Dioscorea floribunda* (AHUJA et al., 2002), *Wasabia japônica* (MATSUMOTO et al., 2013), *Thymus moroderi* (MEDINA; CASAS, 2013), *Hypericum* sp. (DANOVA et al., 2012; GEORGIEVA et al., 2014, BRUŇÁKOVÁ; CELLÁROVÁ, 2017), *Chrysanthemum* sp. (KULUS et al., 2019), *Rosa* sp. (PAWŁOWSKA et al., 2019) e *Allium* sp. (WANG et al., 2021a). No entanto, poucos estudos correlacionam a capacidade biossintética dos materiais criopreservados com a manutenção das suas atividades biológicas (Quadro 2).

1.2.3 Criopreservação de espécies de *Passiflora* L.

Nos últimos anos, a criopreservação vem sendo considerada uma importante alternativa para a conservação de espécies de *Passiflora*, uma vez que a erosão genética no gênero é cada vez maior devido ao uso de grandes áreas para fins agrícolas e industriais (FALEIRO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016). Dessa forma, a criopreservação consiste em uma medida complementar ao armazenamento tradicional em bancos de sementes e coleções de campo.

Protocolos de criopreservação de espécies de *Passiflora* já foram desenvolvidos para sementes e propágulos vegetativos. Os principais estudos sobre a criopreservação de sementes visaram à determinação dos teores hídricos adequados para a criopreservação e à tolerância ao resfriamento (MELETTI et al., 2007; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009; VEIGA-BARBOSA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016; ARAÚJO, 2017) (Quadro 4). No entanto, embora muitas espécies sejam capazes de manter elevadas taxas de germinação após a dessecação e o

resfriamento, algumas são significativamente afetadas pelo armazenamento em NL, resultando em baixas taxas de germinação após o reaquecimento.

Quadro 2 – Trabalhos sobre avaliação da capacidade biossintética de plantas submetidas à criopreservação

Espécie	Material vegetal	Técnica criopreservação	Avaliação metabólica	Referência
<i>Dioscorea floribunda</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	CLAE (diosgenina)	AHUJA et al., 2002
<i>Hypericum rumeliacum</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	CLAE (hipericina, pseudo-hipericina); Teor de fenóis e flavonoides totais; Atividade da PAL	DANOVA et al., 2012
<i>Wasabia japonica</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	CLAE (sinigrina)	MATSUMOTO et al., 2013
<i>H. rumeliacum</i> H. <i>tetrapterum</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	Determinação de carotenoides, fenóis e flavonoides totais; avaliação da atividade antioxidante	GEORGIEVA et., 2014
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Ápice caulinar	Vitrificação em gotas	CLAE; CLUE (flavonoides e ácido hidroxicinamoilquinico)	BI et al., 2016
<i>H. perforatum</i> , <i>H. rumeliacum</i> H. <i>tetrapterum</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	CLAE (hipericina, pseudo-hipericina e floroglucinol)	BRUŇÁKOVÁ; CELLÁROVÁ, 2017
<i>Thymus moroderi</i>	Ápice caulinar	Vitrificação	CG-EM (óleos essenciais - cânfora, cineole, borneol)	MEDINA; CASAS, 2013
<i>Chrysanthemum</i> (<i>Chrysanthemum</i> × <i>grandiflorum</i> /Ramat./ Kitam.	Ápice caulinar	Encapsulamento-desidratação	Quantificação de antocianinas e carotenoides	KULUS et al., 2019
<i>Rosa agrestis</i> , <i>R. canina</i> , <i>R. dumalis</i> and <i>R. rubiginosa</i>	Ápice caulinar	Vitrificação em gotas	Determinação de fenóis e flavonoides totais; avaliação da atividade antioxidante	PAWŁOWSKA et al., 2019
<i>Allium cepa</i> var. <i>aggregatum</i>),	Ápice caulinar	Vitrificação	CLUE (flavonóis)	WANG et al., 2021

Para a criopreservação de propágulos vegetativos, as técnicas contemporâneas, principalmente vitrificação e encapsulamento-vitrificação, são as mais utilizadas. Diferentes explantes (ápices caulinares, segmentos nodais, embriões zigóticos) e parâmetros que afetam a recuperação após o resfriamento, incluindo a pré-cultura em meio com altas concentrações de sacarose, exposição às soluções de vitrificação PVS2 e PVS3, além de diferentes condições de recuperação, já foram avaliados (Quadro 4) (GARCIA et al., 2011b; FALCÃO, 2011; MERHY et al., 2014; ARAÚJO, 2017; SIMÃO et al., 2018).

Recentemente, duas novas técnicas foram utilizadas para a criopreservação de passifloras. Nadarajan e colaboradores (2014) desenvolveram uma metodologia inovadora para embriões zigóticos de *Passiflora edulis*, na qual a solução de vitrificação PVS2 foi infiltrada a vácuo no material vegetal. Dessa forma, a remoção da água intracelular ocorreu de forma mais rápida e eficiente, resultando em maiores taxas de recuperação pós-resfriamento. Além disso, Simão e colaboradores (2018) desenvolveram um protocolo para a criopreservação de segmentos radiculares de *Passiflora pohlii* Mast. com a técnica de V-Crioplaca, utilizando placas de alumínio adaptadas para este tipo de explante. Nesse trabalho, a caracterização anatômica das alterações celulares induzidas durante as diferentes etapas do protocolo de criopreservação foi realizada pela primeira vez no gênero (Quadro 4).

Nos últimos 14 anos, o grupo do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ) vem desenvolvendo estratégias biotecnológicas para espécies de *Passiflora* que resultaram na obtenção de diferentes respostas morfogênicas e no estabelecimento de sistemas de conservação *in vitro* por crescimento lento e criopreservação. Para *Passiflora suberosa*, espécie estudada neste trabalho, foi desenvolvido, inicialmente, um protocolo de criopreservação de ápices caulinares utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação, tendo sido obtida uma taxa de recuperação pós-resfriamento de 28% (GARCIA et al., 2011b). Recentemente, a utilização da técnica de V-Crioplaca para a criopreservação dos mesmos explantes resultou em uma taxa de recuperação de 60% (VIANNA et al., 2019). No entanto, essa taxa é ainda considerada moderada, e pode estar associada a injúrias oxidativas provocadas pelas condições de estresse durante uma ou mais etapas do protocolo.

Quadro 4 – Protocolos de criopreservação desenvolvidos para espécies de *Passiflora* L.

Espécies	Técnica de Criopreservação	Material vegetal	Referência
<i>P. nitida</i> e <i>P. serrato-digitata</i>	Dessecação	Sementes	MELETTI et al., 2007
<i>P. pinnatistipula</i> , <i>P. tarminiana</i> e <i>P. mollissima</i>	Dessecação	Sementes	GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009
<i>P. foetida</i>	Vitrificação/ Encapsulamento- vitrificação	Ápicescaulinares	FALCÃO, 2011
<i>P. suberosa</i>	Vitrificação/ Encapsulamento- vitrificação	Ápicescaulinares	GARCIA et al., 2011b
<i>P. alata</i> , <i>P. coriacea</i> , <i>P. foetida</i> , <i>P. giberti</i> , <i>P. micropetala</i> , <i>P. morifolia</i> , <i>P. mucronata</i> , <i>P. nítida</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Dessecação	Sementes	VEIGA-BARBOSA et al., 2013
<i>P. pohlii</i>	Vitrificação/ Encapsulamento- vitrificação	Segmentosnodais	MERHY et al., 2014
<i>P. edulis</i>	Vitrificação por infiltração a vácuo	Embrião zigótico	NADARAJAN; PRITCHARD, 2014
<i>P. setacea</i>	Vitrificação/ Encapsulamento- vitrificação	Segmentosnodais	ARAÚJO, 2017
<i>P. ligularis</i>	Vitrificação	Embriões	PRUDENTE et al., 2017
<i>P. pohlii</i>	V-Crioplaca	Segmentosradiculares	SIMÃO et al., 2018
<i>P. mucronata</i>	Vitrificação	Sementes	ARAÚJO et al., 2019
<i>P. edulis</i>	Dessecação	Sementes	GENEROSO et al., 2019
<i>P. suberosa</i>	V-Crioplaca	Ápicescaulinares	VIANNA et al., 2019
<i>P. eichleriana</i> , <i>P. cristalina</i> e <i>P. nitida</i>	Vitrificação	Sementes	FARIA et al., 2020

Dessa forma, os aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das injúrias associadas ao processo de criopreservação, especialmente aquelas induzidas pelo estresse oxidativo, ainda precisam ser investigados. Estas análises contribuirão não só para a ampliação do conhecimento acerca das crioinjúrias, como também para a identificação das etapas mais críticas do protocolo, permitindo o direcionamento das ações visando à otimização do processo e à obtenção de taxas mais altas de recuperação pós-resfriamento. Além disso, como se trata de uma espécie produtora de substâncias bioativas com potencial medicinal, a avaliação da capacidade biossintética dos materiais derivados dos ápices criopreservados é também de fundamental importância para e validar a criopreservação como uma metodologia eficiente para o armazenamento em longo prazo desse germoplasma.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar aspectos bioquímicos associados à crioinjúria durante a criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. utilizando a técnica de V-Crioplaca, assim como analisar a estabilidade metabólica dos materiais criopreservados.

Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a ocorrência de injúrias nas membranas celulares de explantes submetidos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação, por meio da determinação da taxa de peroxidação de lipídios;
- Analisar o estresse oxidativo de explantes submetidos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação, por meio da determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX;
- Avaliar os efeitos da adição de substâncias com ação antioxidante (ácido ascórbico, glutathiona e prolina) nas etapas críticas do protocolo de criopreservação, visando ao aumento das taxas de recuperação pós-resfriamento;
- Avaliar a estabilidade metabólica dos materiais submetidos à criopreservação, em comparação com plantas mantidas *in vitro*, por meio da análise dos perfis cromatográficos obtidos por CCD e CLAE, e da determinação do conteúdo fenólico;
- Determinar o potencial antioxidante das plantas criopreservadas, em comparação com plantas mantidas *in vitro*, por meio dos ensaios de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e da capacidade quelante de íons ferrosos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultura

Plantas de *P. suberosa* obtidas a partir da germinação *in vitro* (Garcia et al., 2011a) e mantidas no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas do NBV/UERJ foram utilizadas como fontes de explantes. Um exemplar representativo da planta cultivada em condições naturais encontra-se depositado no herbário da UERJ, sob o registro HRJ12783.

Foi utilizado o meio basal MSM (MONTEIRO et al., 2000b), contendo vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sacarose a 0,09 M, solidificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm). A manutenção das plantas *in vitro* foi realizada por meio de subcultivos mensais de segmentos caulinares (2 – 3cm), contendo de 2 a 4 nós, em meio MSM contendo metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose (MSM ½) (GARCIA et al., 2011a).

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C ±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa média de 46 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria.

3.2 Criopreservação

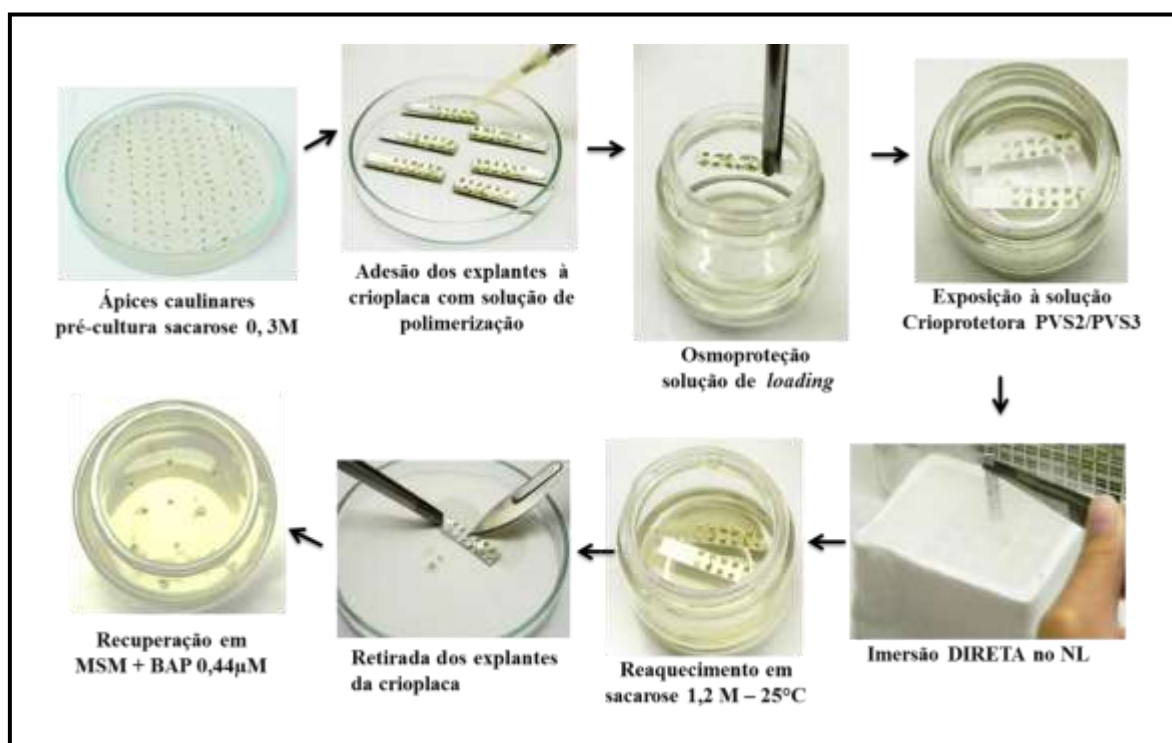
Os ensaios de criopreservação foram realizados no Labmit, em colaboração com o pesquisador Dr. Florent Engelmann, do *Unité Mixte de Recherche: Diversité, Adaptation, Développement des Plantes, L'Institut de Recherche pour le Développement* (DIADE/IRD, Montpellier - França).

Ápices caulinares foram criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, de acordo com Vianna e colaboradores (2019). Segmentos nodais (0,5 cm), contendo apenas uma gema axilar, foram retirados de plantas mantidas *in vitro* e inoculados em placas de Petri (90x15 mm) contendo 30 ml de meio MSM ½ sólido e cultivados por 40 dias para a formação dos brotos. Após esse período, os ápices foram excisados dos brotos e pré-cultivados em meio MSM^{1/2} sólido suplementado com sacarose a 0,3 M por 24 horas, sob condições padrão de cultivo. Em seguida, os ápices foram transferidos para placas de alumínio (7 mm × 37mm × 0,5 mm), cada uma contendo 10 poços (1,5 mm × 2,5 mm × 0,75 mm).

A adesão dos explantes nas placas (10 ápices/placa) foi realizada pela polimerização das soluções de alginato de sódio a 3% e CaCl_2 a 100mM. Em seguida, as placas foram expostas à solução de *loading* (sais do meio MS + glicerol a 2 M + sacarose a 0,4 M) durante 20 minutos, a 25°C, e transferidas para a solução de vitrificação PVS3 a 25°C por 90 minutos. As placas contendo os ápices caulinares foram então transferidas para criotubos preenchidos com NL, onde permaneceram por cinco minutos.

Para o reaquecimento do material, as placas foram transferidas para uma solução de *unloading* (sais do meio MS + sacarose a 1,2 M), a 25°C, por 20 minutos. Os explantes foram então removidos com o auxílio de um bisturi e inoculados em frascos de cultura (5,8 cm x 5,8 cm) contendo meio de recuperação (MSM suplementado com BAP a 0,44 μM) (GARCIA et al., 2011b). Os ápices criopreservados foram mantidos em ausência de luz até o início do desenvolvimento de primórdios foliares, antes da transferência para as condições padrão de cultura, em meio MSM $\frac{1}{2}$ (Figura 11).

Figura 11– Etapas da criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. utilizando a técnica de V-Crioplaca



Fonte: Vianna, 2016

3.3 Avaliação de aspectos bioquímicos da crioinjúria

A avaliação dos aspectos bioquímicos associados às injúrias induzidas pelo processo de criopreservação foi realizada por meio da quantificação da peroxidação de lipídios nas membranas celulares e da determinação da atividade de enzimas antioxidantes em ápices caulinares submetidos às seguintes condições:

- i) condições padrão de cultura *in vitro*;
- ii) pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M;
- iii) pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M e exposição à solução de *loading*;
- iv) pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M, exposição às soluções de *loading* e PVS3 por 90 minutos;
- v) pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M, exposição às soluções de *loading* e PVS3 por 90 minutos, imersão em NL e avaliação imediata após o reaquecimento;
- vii) pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M, exposição às soluções de *loading* e PVS3 por 90 minutos, imersão em NL e cultura em meio de recuperação por 10 dias.

3.3.1 Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação de malondialdeído (MDA)

A determinação da peroxidação de lipídios foi realizada pela quantificação espectrofotométrica do MDA, de acordo com o método descrito por Zhang e colaboradores (2015). Aproximadamente 50mg de material vegetal fresco foi triturado e homogeneizado em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C, por 10 minutos. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi adicionada a 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,65% (p/v), diluído em TCA a 10% (p/v). As amostras foram misturadas vigorosamente, incubadas a 95°C por 30 minutos e resfriadas em banho de gelo. Em seguida, a absorbância do sobrenadante foi medida a 532, 450 e 600 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV- B382). O conteúdo de MDA foi expresso em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ MDA e determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol.L}^{-1}) = 6,45 (\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) - 0,56 \text{ Abs}_{450}$$

Onde: A_{532} = máxima absorbância do complexo MDA-TBA₂;

A_{600} = correção de interferentes não-específicos;

A_{450} = correção de interferentes gerados pelo complexo TBA-açúcares;

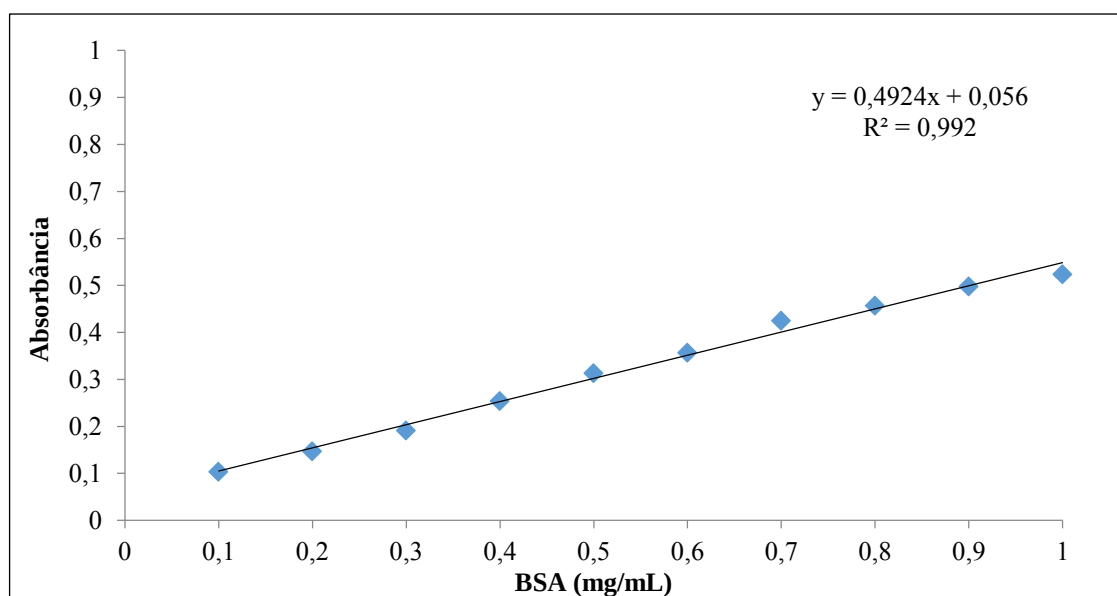
3.3.2 Determinação das atividades das enzimas antioxidantes

A extração de proteínas nos diferentes materiais foi realizada de acordo com Azevedo e colaboradores (1998), com modificações. Aproximadamente 75mg de material vegetal fresco foram triturados na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 20% e NL. Em seguida, o material foi homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato a 100 mM (pH 7,2), 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.

3.3.2.1 Quantificação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nos extratos foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), em triplicatas, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Figura 12). Os valores de proteínas obtidos, calculados por meio da equação gerada a partir da curva padrão, foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas em cada extrato.

Figura 12– Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) obtida pelo método de Bradford



3.3.2.2 Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi avaliada espectrofotometricamente pela sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitrozultetrazólio (NBT), levando à formação de um precipitado de cor azul violáceo, denominado formazana (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). O ensaio foi realizado em sistema fechado, em uma cuba de madeira ($28 \times 65 \times 33$ cm), contendo uma lâmpada tubular de LED branca fria, revestimento de alumínio e uma placa de isopor ($63 \times 26 \times 0,15$ cm), como suporte para os tubos de ensaio (2×10 cm), disposta a 15 cm da fonte luminosa (Figura 13).

Figura 13– Sistema desenvolvido para avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase no NBV/UERJ



Legenda: Visão frontal do sistema para avaliação de SOD (A); suporte de isopor revestido de alumínio para encaixe dos tubos (B e C); visão da fonte de iluminação do sistema fornecida por lâmpada do tipo LED (D). Fonte: Da autora

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 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina a 5 μ M) e 50 μ L 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).

$$U\ SOD = (Abs_{formazana\ total} / Abs_{amostra}) - 1 * (1000 / vol_{amostra} * 1 / []\ prote\acute{a}na\ totais)$$

Onde:

Abs_{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;

3.3.2.3 Avaliação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da 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 0,34M 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⁻¹proteína.

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

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 (1500µL);

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

3.3.2.4 Avaliação da atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A determinação da atividade da enzima APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), com modificações. Inicialmente, 50µL de extrato vegetal foram adicionados a uma solução de reação contendo 650 µL de tampão fosfato a 80mM, pH 7,0, 100 µL de ácido ascórbico a 0,5mM e 100 µL de EDTA a 1mM, mantida em banho-maria a 30°C. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL H₂O₂ a 10mM 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 mM⁻¹ cm⁻¹) e os resultados foram expressos em µMol H₂O₂. min⁻¹. mg⁻¹ proteína.

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

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 (1000µL);

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

3.4 Avaliação do uso de substâncias antioxidantes em diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

Após análise do estresse oxidativo durante a criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* utilizando a técnica de V-Crioplaca, diferentes substâncias com ação antioxidante foram adicionadas nas etapas consideradas críticas do protocolo, visando aumentar as taxas de recuperação de plantas.

Diferentes concentrações de ácido ascórbico (0,15mM ou 0,30mM) e glutathione (0,08mM ou 0,16mM) foram adicionadas, de modo independente, em diferentes etapas do protocolo de V-Crioplaca. As soluções contendo as substâncias antioxidantes foram preparadas e filtradas em membrana milipore (0,45µm), imediatamente antes de serem adicionadas às soluções de *loading* e PVS3 e da exposição do material vegetal. A avaliação da

porcentagem de recuperação dos ápices submetidos aos diferentes tratamentos foi realizada 60 ou 90 dias após o reaquecimento.

3.5. Preparo de extratos vegetais

Com intuito de avaliar a influência do processo de criopreservação na capacidade biossintética das plantas, foram preparados extratos brutos de folhas excisadas de plantas derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione na etapa de osmoproteção (exposição à solução de *loading*) e desidratação (exposição a PVS3), em comparação com plantas derivadas da germinação *in vitro* e mantidas em condições padrão de cultura, em meio MSM $\frac{1}{2}$.

Para o preparo dos extratos, foram selecionadas folhas de aspecto saudável, de plantas mantidas *in vitro* por, pelo menos, seis meses após a criopreservação. As folhas foram secas em estufa a 40°C, por 48 horas e, em seguida, os extratos foram preparados utilizando-se etanol a 40%, na proporção 1:50 (p/v), em sistema de refluxo, por 1 hora (BIRK et al., 2005). Após este período, o material foi filtrado, seco em banho maria a 90°C, e armazenado a -20°C. Para a caracterização fitoquímica e ensaios de atividade antioxidante, os extratos foram ressolubilizados em metanol (Tedia®, Brasil) com auxílio de ultrassom.

3.6 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise da produção de substâncias bioativas nos diferentes materiais foi realizada por meio de três diferentes sistemas de CCD. Para isso, 20 µL de cada extrato (5 mg/mL) foram aplicados em placas de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} (Marcherey-Nagel), com auxílio de pipeta.

A detecção de flavonoides foi realizada por incubação da placa cromatográfica, em sistema saturado com fase móvel constituída por acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v) (WAGNER; BLADT, 2001). Para a revelação foi utilizada solução de NP/PEG 4000 (Natural Products - polietilenoglicol), pulverizando na placa cromatográfica a solução metanólica de 2-aminoetil difenilborinato (NP) (Sigma Aldrich®) a 1%, seguida de solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (PEG) a 5%, e posterior visualização em câmara de UV_{365nm} (WAGNER; BLADT, 2001). Como referência, foram

aplicados 5 µL dos flavonoides vitexina, vitexina-2''-O-ramnosídeo, rutina e quercetina na concentração de 1 mg/mL (Sigma- Aldrich®).

A análise de ácidos fenólicos foi realizada empregando fase móvel composta por clorofórmio:acetato de etila:acetona: ácido fórmico (40:30:20:10 v/v), com revelação por NP/PEG 4000 (Natural Products - polietilenoglicol), e visualização em câmara UV_{365nm} (JESIONEK et al., 2015). Para fins de comparação, foram também aplicadas na placa cromatográfica soluções metanólicas na concentração de 10mg/mL dos ácidos cafeico, gálico, clorogênico e ferúlico (Sigma- Aldrich®).

Para a detecção de saponinas, foi utilizada fase móvel contendo clorofórmio:ácidoacético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). A revelação foi realizada com uma solução constituída por anisaldeído (0,5 mL), ácido acético glacial (10 mL), metanol (85 mL) e ácido sulfúrico concentrado (5 mL). A visualização ocorreu sob luz visível, após aquecimento da placa a 100°C por 5 minutos (WAGNER; BLADT, 2001).

O cálculo do R_f dos padrões e das amostras foi realizado conforme a equação abaixo:

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

3.7 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD-UV)

Para as análises por CLAE-DAD-UV, extratos hidroalcoólicos de *P. suberosa* foram diluídos em metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil) na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram solubilizados com auxílio de banho de ultrassom por 15 minutos, filtrados em filtros Millipore de 0,45 µm (Merck®, Alemanha) e submetidos à análise em cromatógrafo líquido Agilent® 1260 Infinity, equipado com bomba LC-10AD, misturador FCV 10AL, degaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS, controlador SCL-10A e detector de UV com arranjo de diodos (DAD-UV) SPD-M10A. As amostras foram separadas em coluna Thermo-scientific® Hypersil Gold RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 Å).

Para a determinação do perfil cromatográfico, a fase móvel foi constituída por 95% de água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético PA (Sigma®) a pH 3,3, e 5% de acetonitrila grau HPLC (Tedia®), mantendo-se por 3 minutos de forma isocrática. Em seguida (3 – 40 minutos), aplicou-se um gradiente com inversão para 100% de acetonitrila, mantendo-se novamente isocrático até 45 minutos, e finalmente regressando à condição inicial em 47

minutos. O fluxo da fase móvel foi mantido constante, a 1 mL/min, em temperatura ambiente (23°C). O detector foi programado para realizar a varredura entre os comprimentos de 200 e 480 nm, com taxa de atualização de 1 Hz.

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.

3.8 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação comparativa do potencial antioxidante de plantas mantidas *in vitro* e daquelas derivadas de ápices caulinares criopreservados de *P. suberosa* foi realizada, quantitativamente, pela análise da capacidade de captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e da atividade quelante de íon ferrosos (Fe²⁺). A avaliação qualitativa foi realizada pelo ensaio de CCD-DPPH.

3.8.1 Ensaio de captura do radical DPPH

A avaliação da capacidade de captura do radical DPPH foi realizada conforme a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

Extratos ressolubilizado sem metanol 100% foram diluídos em diferentes concentrações (0,25 -5 mg/mL). Aliquotas de 25µL dos extratos foram então adicionadas a 975 µL solução metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich®) a 60 µM, e incubados no escuro por 1h. Como controle negativo, foi utilizada a solução de DPPH a 60 µM (975 µL) acrescida de metanol (25µL). Os valores obtidos foram comparados com a solução metanólica de quercetina, em diferentes concentrações (20 – 100 µg/mL). As leituras de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro a 515 nm (Shimadzu UV-B382), e o percentual de captura do radical foi determinado conforme a equação:

$$\% \text{ Captura do DPPH} = \left(\frac{A_c - A_a}{A_c} \right) \times 100$$

Onde:

A_c = absorbância do controle negativo

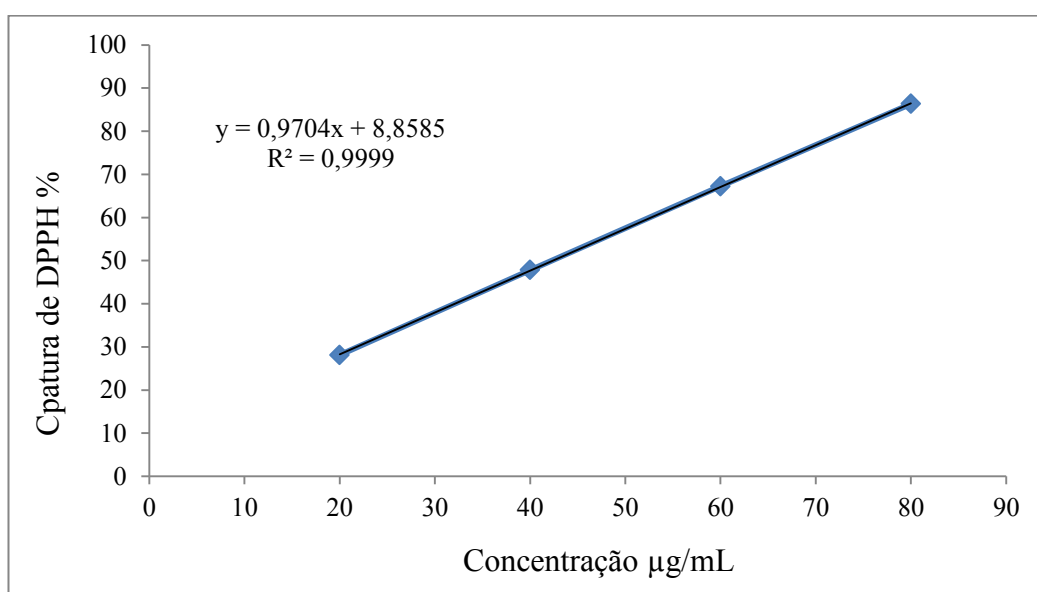
A_a = absorbância da amostra

A concentração eficaz de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (CE₅₀) foi calculada por regressão linear dos gráficos obtidos, a partir do percentual de captura do DPPH (y= eixo das ordenadas), para as concentrações de extratos avaliadas (x= eixo das abscissas). Para fins de comparação, os valores obtidos foram comparados com a quercetina, em diferentes concentrações (Figura 14). Os resultados foram calculados considerando as médias das triplicatas, de acordo com a equação:

$$y = -ax + b$$

Onde: y = 50 e x = CE₅₀ (mg/mL)

Figura 14 – Curva padrão de quercetina



3.8.2 Ensaio de avaliação da capacidade quelante de íons ferrosos

A capacidade quelante de íons ferrosos foi determinada de acordo com o método descrito por Chew e colaboradores (2009), com algumas modificações. Os extratos foram ressolubilizados em metanol 100% e diluídos em diferentes concentrações (0,5 – 5mg/mL). Aliquotas (250 µL) de cada diluição foram incubadas com 250 µL de sulfato ferroso (FeSO₄) a 0,1mM, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados de 250µL de ferrozina a 0,25mM e as amostras incubadas por 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Após este período, as leituras de absorbância foram efetuadas a 562nm, em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S (ThermoScientific).

A capacidade quelante de íons ferrosos foi calculada com a equação abaixo:

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

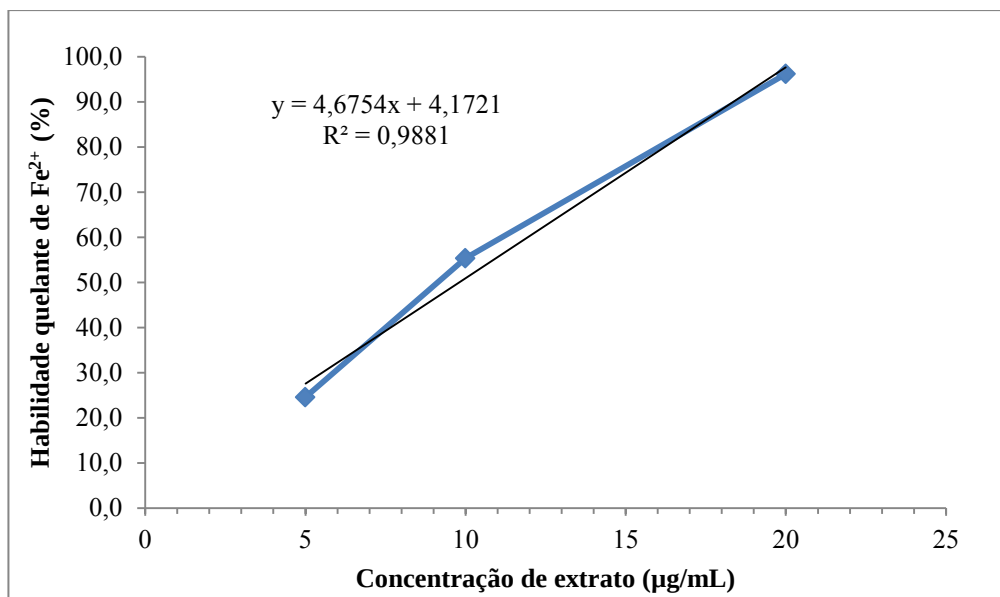
Onde:

A_c = absorbância do controle

A_a = absorbância da amostra

A_b = absorbância do branco

Os resultados foram também calculados através da concentração eficaz (CE₅₀) para a capacidade quelante de íons ferrosos, de forma similar ao descrito anteriormente. Os resultados foram comparados à curva padrão obtida com o EDTA, concentrações entre 5 e 50 µg/mL (Figura 15).

Figura 15 – Curva padrão de EDTA

3.8.3 Análise por CCD-DPPH

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante foi realizada utilizando a técnica de CCD associada ao ensaio de DPPH (MASOKO; ELOFF, 2007). Para isso, as amostras foram aplicadas sobre placas cromatográficas e submetidas às condições de detecção de flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas, conforme descrito no item 3.6. Em seguida, as placas foram pulverizadas com solução metanólica de DPPH a 0,2%, e mantidas no escuro por 30 minutos (SIMÃO, 2019). A atividade antioxidante foi observada a partir da mudança de coloração roxa para amarelo, nas manchas correspondentes às substâncias detectadas.

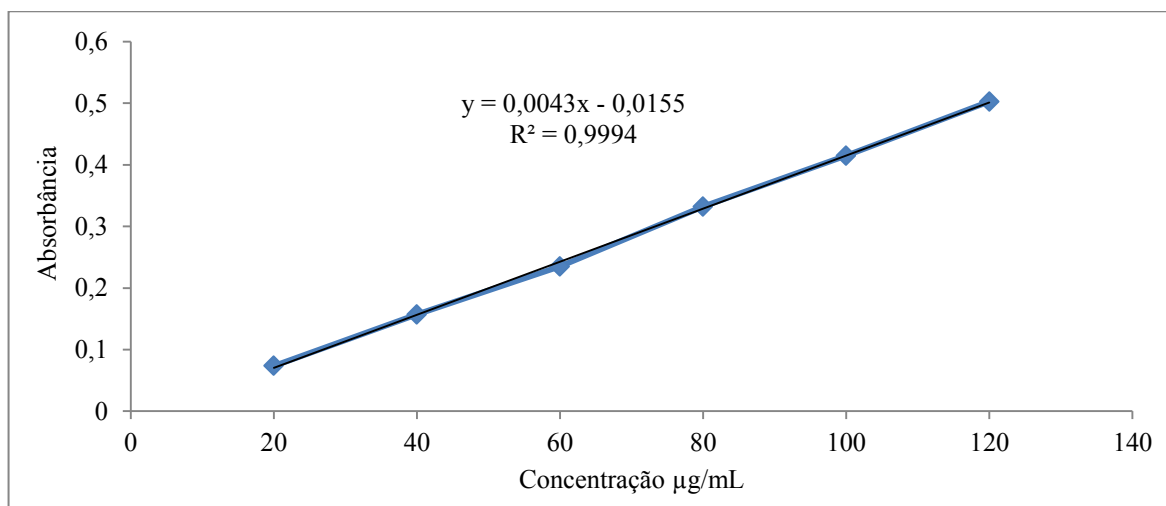
3.9 **Determinação do conteúdo fenólico e correlação com a atividade antioxidante**

A avaliação do conteúdo fenólico foi realizada utilizando-se o ensaio de Folin-Ciocalteu (HOLLAND et al., 2011). Amostras dos extratos (90 µL), em três diferentes concentrações (0,25 a 2,5 mg/mL) foram adicionadas a uma solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma - Aldrich®) a 10%. Após cinco minutos, foi adicionado NaCO₃ a 2% e a reação foi incubada a 25°C, no escuro, por 2 h, sendo a leitura das absorbâncias efetuada em espectrofotômetro (Shimadzu UV duplo-feixe - B382), a 765 nm.

Os resultados foram comparados à curva de calibração obtida com ácido gálico, elaborada nas concentrações entre 20 e 120 mg/L (Figura 16). O conteúdo total de fenóis das amostras foi representado como equivalentes de ácido gálico (EAG), em mg/g de extrato seco. A curva padrão de ácido gálico foi representada pela equação: $y = 0,0043x + 0,0155$, onde x = concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y = absorbância.

Para testar a correlação entre potencial antioxidante e conteúdo de fenóis totais, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa GraphpadInStat, sendo considerada significativa as diferenças com valores de $p \leq 0,05$.

Figura 16 - Curva padrão de ácido gálico



3.10 Análise estatística

As análises bioquímicas para determinação do conteúdo de MDA e a quantificação das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicatas. Para a avaliação do efeito da adição de substâncias antioxidantes no protocolo de criopreservação, os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando 10 explantes em cada repetição.

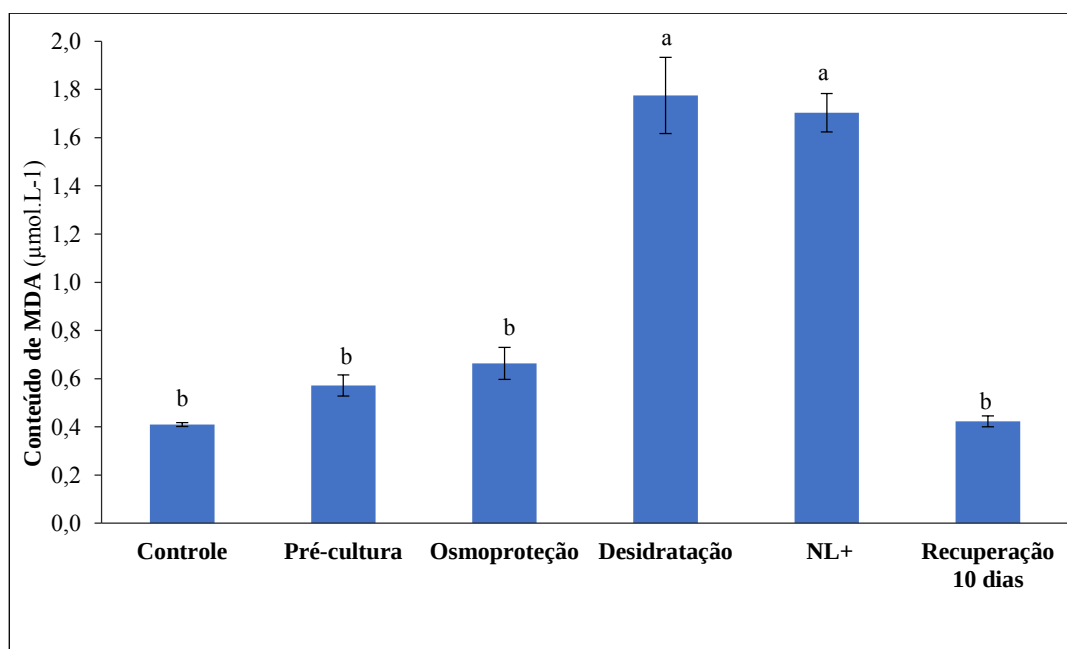
A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey, com o auxílio do programa *GraphpadPrism 6* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), sendo consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da peroxidação de lipídios pela quantificação do MDA

Um aumento sutil no conteúdo de MDA foi observado nos ápices caulinares nas etapas iniciais do protocolo, incluindo pré-cultura ($0,5717 \mu\text{mol L}^{-1}$) e exposição à solução de *loading* ($0,6635 \mu\text{mol L}^{-1}$), quando comparados com o controle ($0,4099 \mu\text{mol L}^{-1}$), embora não tenha apresentado diferenças significativas. Por outro lado, uma peroxidação de lipídios significativa ocorreu após a exposição ao tratamento com PVS3 e imediatamente após a etapa de reaquecimento ($1,775 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.703 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Após 10 dias em meio de recuperação, os níveis de MDA foram reduzidos, alcançando valores similares aos observados no controle (Figura 17).

Figura17-Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) em ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação utilizando a técnica de V-Crioplaca



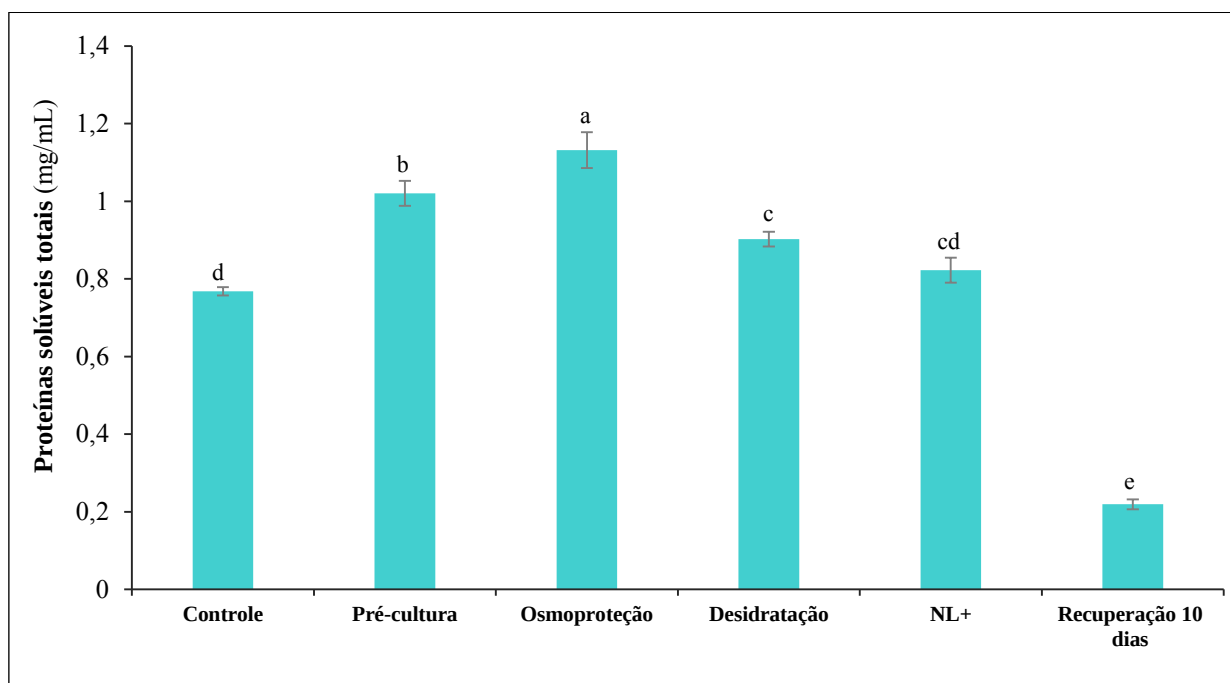
Legenda: Ápices caulinares derivados de plantas mantidas em condições padrão de cultura (**Controle**) e submetidos às etapas de: pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M (**Pré-cultura**); exposição à solução de *loading* (**Osmoproteção**); desidratação em PVS3 por 90 minutos (**Desidratação**); imersão direta em NL (**NL+**); recuperação por 10 dias em meio MSM suplementado com BAP a $0,44 \mu\text{M}$ (**Recuperação 10 dias**). Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.2 Análise das atividades das enzimas antioxidantes

4.2.1 Quantificação de proteínas totais

As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX, assim como o teor total de proteínas solúveis, apresentaram variações significativas ao longo do protocolo de criopreservação. Explantes submetidos às etapas de pré-cultura (1,02 mg/ml) e osmoproteção (1,13 mg/ml) apresentaram um aumento significativo no teor de proteínas solúveis, quando comparados ao controle (0,77 mg/ml). Após as etapas de desidratação e imersão em NL foi observado um decréscimo nos níveis de proteínas, que foi mais significativo nos materiais mantidos por 10 dias no meio de recuperação pós-resfriamento, tendo sido obtido um valor menor que o do controle (Figura 18).

Figura 18 – Teor de proteínas totais em ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

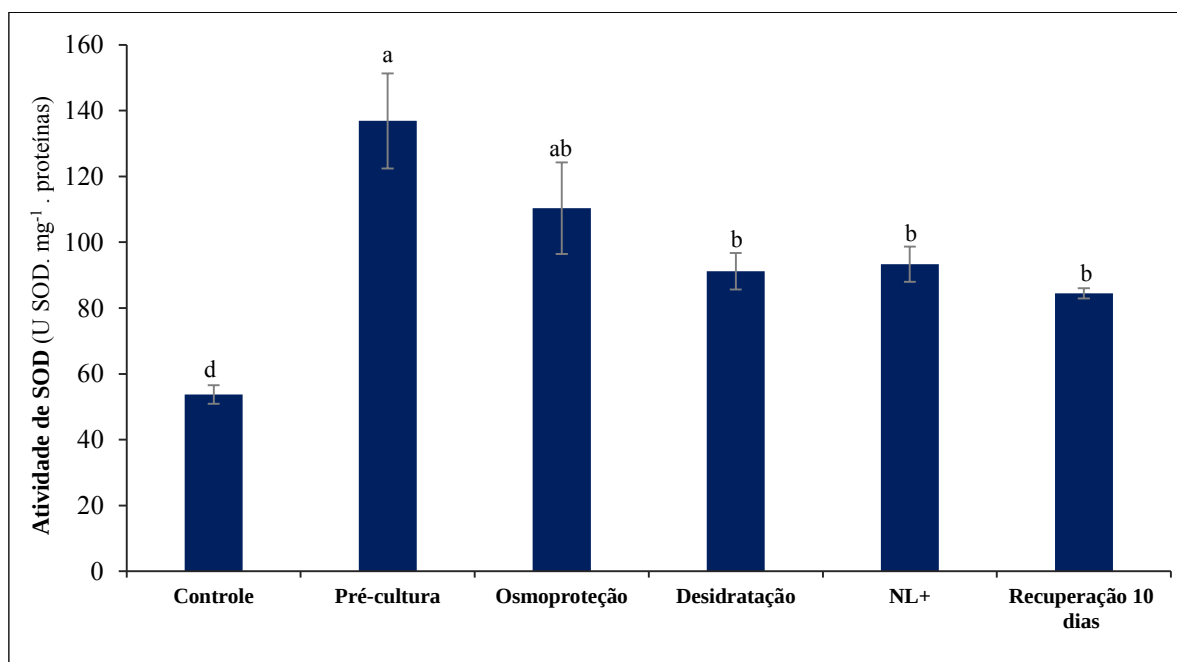


Legenda: Ápices caulinares derivados de plantas mantidas em condições padrão de cultura (**Controle**) e submetidos às etapas de: pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M (**Pré-cultura**); exposição à solução de *loading* (**Osmoproteção**); desidratação em PVS3 por 90 minutos (**Desidratação**); imersão direta em NL (**NL+**); recuperação por 10 dias em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μ M (**Recuperação 10 dias**). Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.2.2 Avaliação da atividade da SOD

Foi observada uma intensa atividade da SOD durante o protocolo de criopreservação, com valores significativamente maiores que o controle. A atividade máxima foi observada em ápices após o tratamento de pré-cultura, com uma taxa 2,5 vezes maior do que a apresentada pelo controle (137,0 e 54,0 U SOD. mg^{-1} proteínas, respectivamente). Nas etapas seguintes, por outro lado, ocorreu um decréscimo significativo e os valores permaneceram constantes imediatamente após a imersão em NL (cerca de 90U SOD. mg^{-1} proteínas) e em materiais mantidos por 10 dias no meio de recuperação (84,5 U SOD. mg^{-1} proteínas) (Figura 19).

Figura 19 – Atividade específica de superóxido dismutase (SOD) em ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

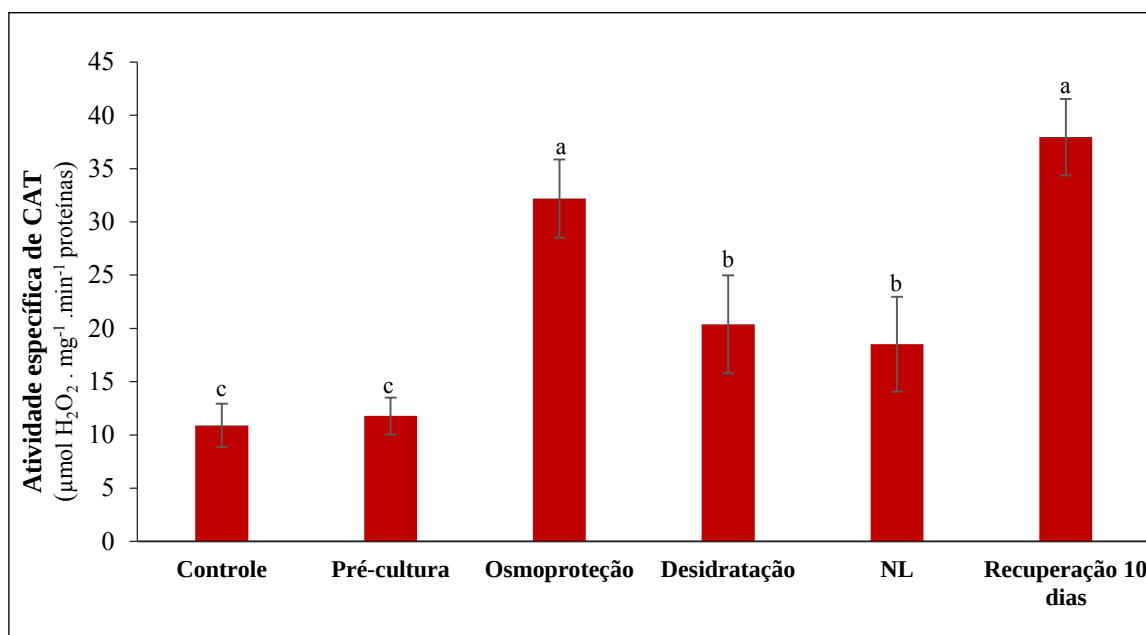


Legenda: Ápices caulinares derivados de plantas mantidas em condições padrão de cultura (**Controle**) e submetidos às etapas de: pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M (**Pré-cultura**); exposição à solução de *loading* (**Osmoproteção**); desidratação em PVS3 por 90 minutos (**Desidratação**); imersão direta em NL (**NL+**); recuperação por 10 dias em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μM (**Recuperação 10 dias**). Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.2.3 Avaliação da atividade da CAT

Ápices caulinares submetidos a pré-cultura exibiram valores de atividade de CAT semelhantes ao do controle (11,78 e 11,01 $\text{H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas, respectivamente). Entretanto, após a etapa de osmoproteção, foi observado um aumento significativo da atividade da enzima (32,2 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas), seguido pela redução desses valores após as etapas de desidratação e imersão em NL (20,4 e 17,51 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas, respectivamente). Os explantes criopreservados mantidos em meio de recuperação por 10 dias também apresentaram um aumento expressivo na atividade de CAT (37,0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas) (Figura 20).

Figura 20 – Atividade específica de catalase (CAT) em ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. após diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

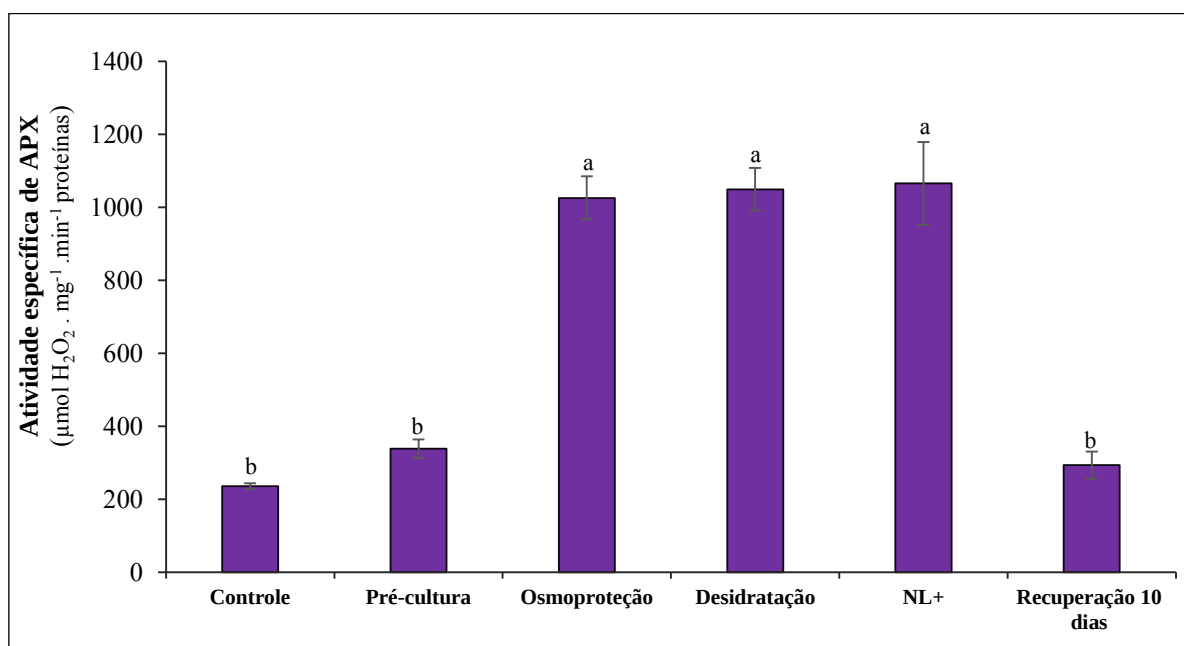


Legenda: Ápices caulinares derivados de plantas mantidas em condições padrão de cultura (**controle**) e submetidos às etapas de: pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M (**Pré-cultura**); exposição à solução de *loading* (**Osmoproteção**); desidratação em PVS3 por 90 minutos (**Desidratação**); imersão direta em NL (**NL+**); recuperação por 10 dias em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μM (**Recuperação 10 dias**). Os resultados expressam média $\pm$ desvio padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.2.4 Avaliação da atividade da APX

A avaliação da atividade específica de APX revelou que os ápices caulinares submetidos às etapas de osmoproteção, desidratação com PVS3 e imersão em NL apresentaram um aumento significativo na atividade desta enzima (1025,8; 1049,5 e 1065,7 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas, respectivamente). Por outro lado, não houve variação significativa da atividade de APX nos explantes submetidos à pré-cultura e nos materiais criopreservados mantidos em meio de recuperação por 10 dias, quando comparados ao controle (338,4; 293,5 e 236,1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ proteínas, respectivamente) (Figura 21).

Figura 21 – Atividade específica de ascorbato peroxidase (APX) em ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. após as diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca



Legenda: Ápices caulinares derivados de plantas mantidas em condições padrão de cultura (**Controle**) e submetidos às etapas de: pré-cultura em meio com sacarose a 0,3 M (**Pré-cultura**); exposição à solução de *loading* (**Osmoproteção**); desidratação em PVS3 por 90 minutos (**Desidratação**); imersão direta em NL (**NL+**); recuperação por 10 dias em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μM (**Recuperação 10 dias**). Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Considerando o aumento acentuado nos níveis de MDA e a redução da atividade de SOD e CAT, as etapas de osmoproteção e exposição a PVS3 foram consideradas as mais críticas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* por V-Crioplaca.

Dessa forma, na continuação deste trabalho, foi avaliada a aplicação direcionada de substâncias antioxidantes nessas etapas específicas do protocolo.

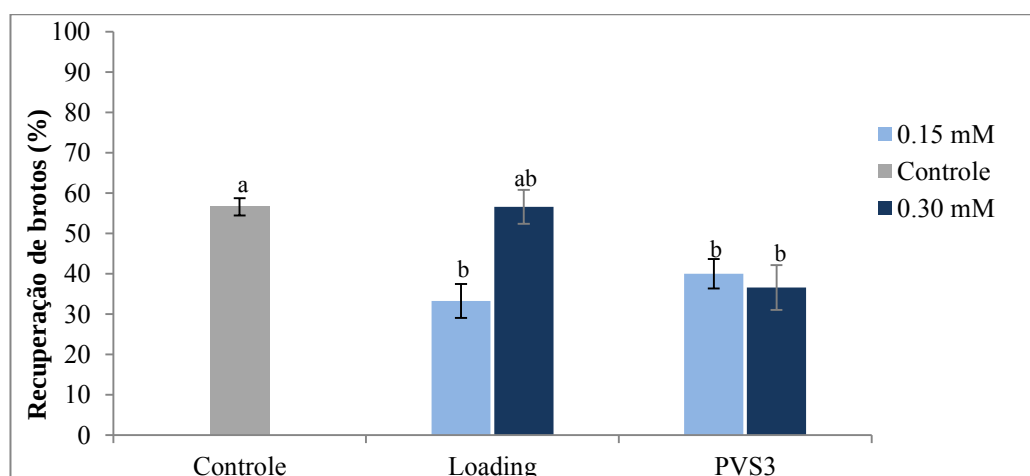
4.3 Avaliação do uso de substâncias antioxidantes em diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

4.3.1 Avaliação da influência do ácido ascórbico

A adição de ácido ascórbico no protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* permitiu a recuperação pós-resfriamento de brotos a partir de ápices caulinares, em diferentes taxas, nas duas concentrações testadas.

Quando adicionado na etapa de *loading*, o ácido ascórbico mostrou-se mais eficiente para a recuperação de brotos (56,6%) na maior concentração testada (0,30 mM), embora não tenha diferido estatisticamente do controle. Por outro lado, a resposta ao tratamento com a concentração inferior (0,15 mM) nesta mesma etapa foi influenciada negativamente, provocando um decréscimo na porcentagem de recuperação (33,3%). Quando adicionado ao PVS3, o uso desse antioxidante resultou em uma diminuição significativa na recuperação de brotos, em ambas as concentrações testadas (0,15mM – 40% e 0,30 mM – 36,6%) (Figura 22).

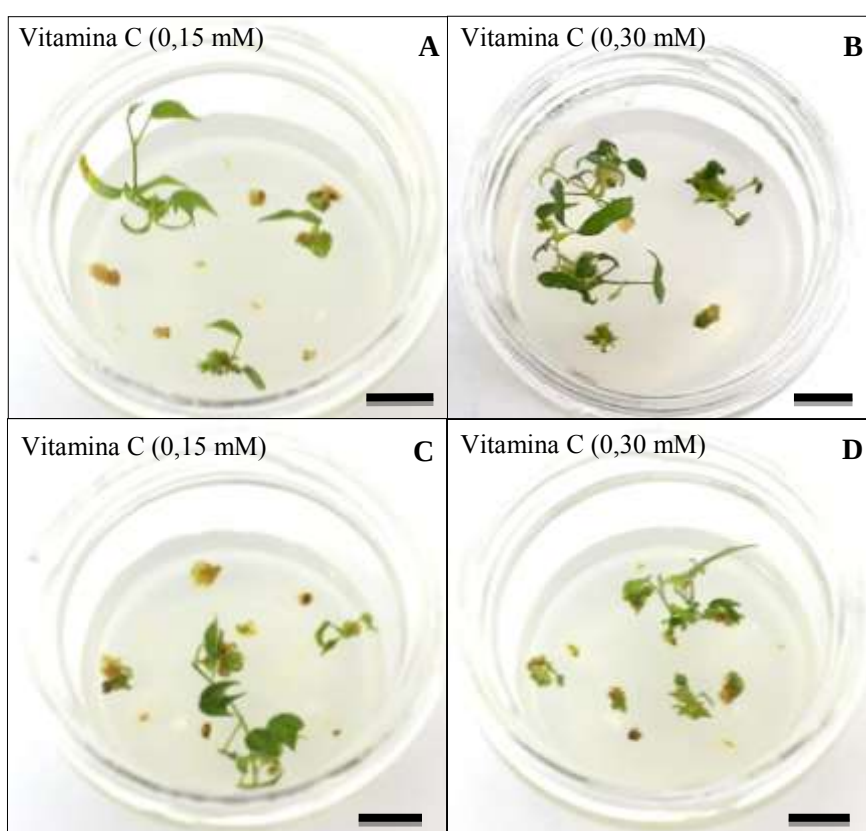
Figura 22 - Efeito da adição de ácido ascórbico em diferentes etapas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. pela técnica de V-Crioplaca



Legenda: Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

De maneira geral, ápices caulinares tratados com ácido ascórbico, independente da concentração e da etapa do protocolo de criopreservação, apresentaram o desenvolvimento de brotos de forma lenta, quando comparado ao controle, com sinais de regeneração após 60 dias e recuperação de brotos somente 90 dias após o reaquecimento (Figura 23).

Figura 23 – Recuperação de brotos a partir de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após tratamento com diferentes concentrações de ácido ascórbico



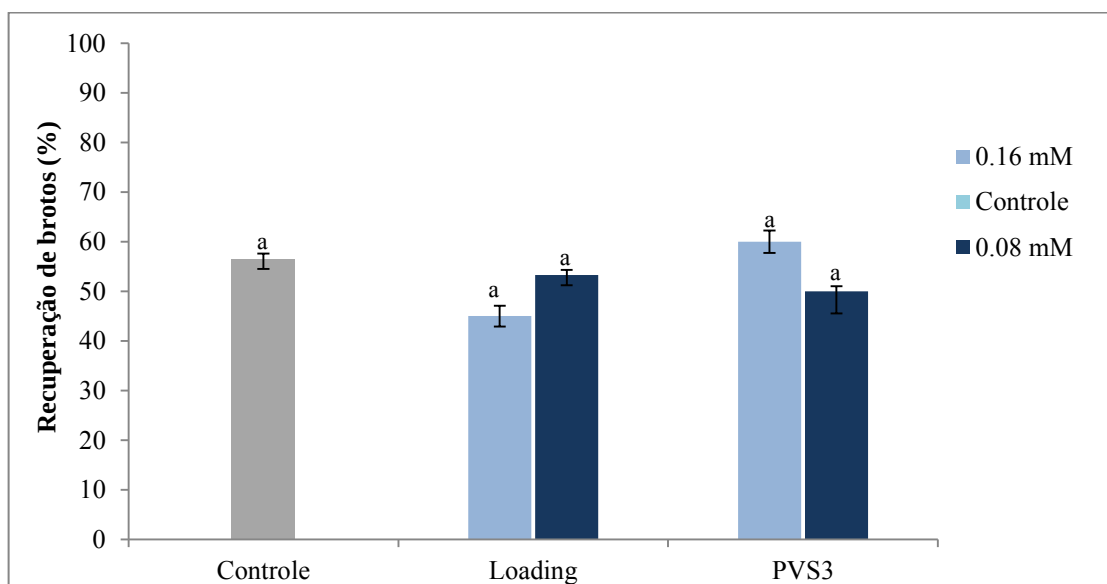
Legendas: Brotos obtidos 90 dias após o reaquecimento e tratamento com ácido ascórbico nas etapas de *loading* (A e B) ou PVS3 (C e D). Barra = 1cm

4.3.2 Avaliação da influência da glutathiona

Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de formação de brotos a partir de ápices caulinares tratados com as duas concentrações de glutathiona testadas, independentemente das etapas do protocolo de criopreservação analisadas. No entanto, embora os tratamentos não tenham sido estatisticamente diferentes, o uso de glutathiona a 0,16 mM na etapa de desidratação com PVS3 induziu um maior efeito positivo na porcentagem de recuperação dos brotos (60%) (Figura 24).

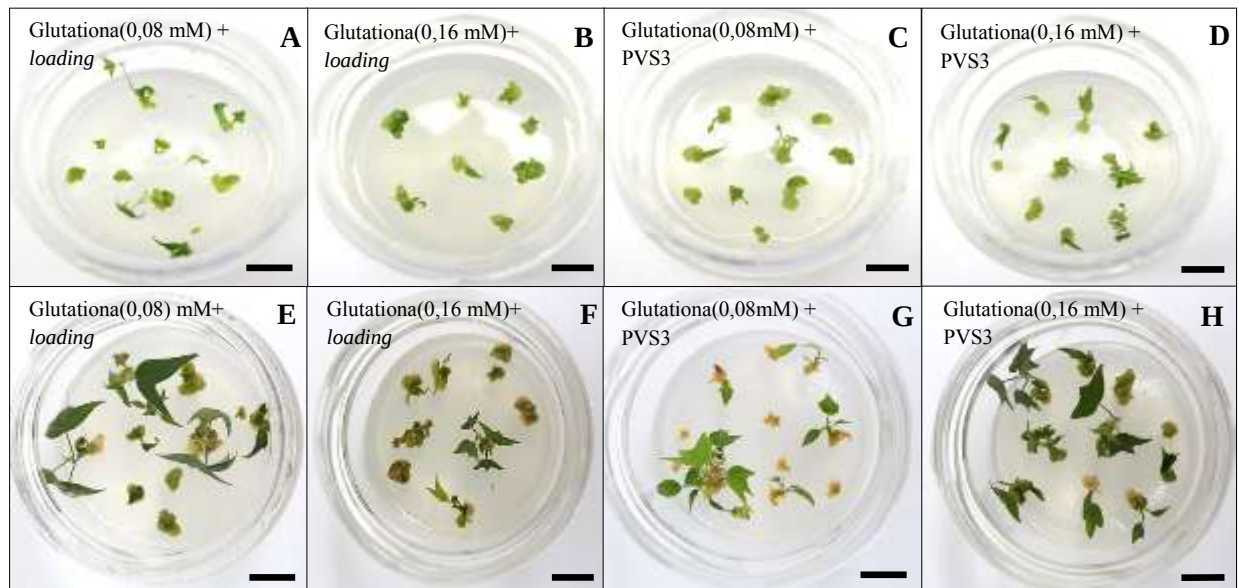
Nos materiais tratados com glutathiona, a sobrevivência, evidenciada pelo desenvolvimento dos primeiros folíolos e, ocasionalmente, pela produção de calos, foi observada em resposta aos tratamentos, 30 dias após transferência dos ápices caulinares para condições de recuperação (Figura 25 – A-D). A recuperação dos brotos ocorreu aproximadamente 60 dias após o reaquecimento, com grande incidência de calos na base dos explantes (Figura 25 – E-H). Porém, após a retirada dos calos, foi observado o desenvolvimento normal dos brotos.

Figura 24- Efeito da adição de glutathiona em diferentes etapas do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. utilizando a técnica de V-Crioplaca



Legenda: Os resultados expressam média $\pm$ erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 25 – Desenvolvimento de brotos a partir de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após tratamento com diferentes concentrações de glutathione



Legendas: Brotos obtidos 30 dias (A-D) ou 60 dias (E-H) após o reaquecimento, tratados com glutathione nas etapas de *loading* (A, B, E e F) ou PVS3 (C, D, G e H). Barra = 1 cm.

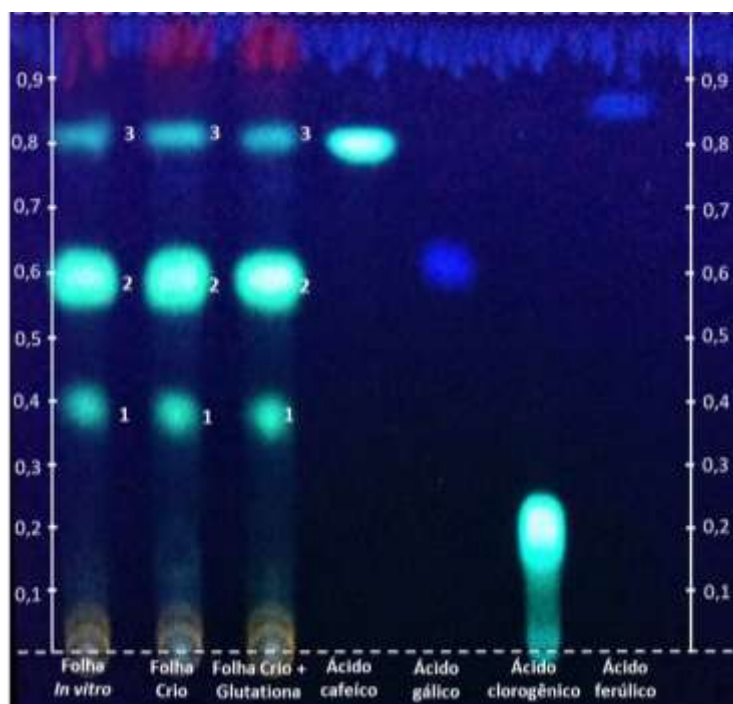
4.4 Avaliação da estabilidade metabólica dos materiais submetidos à criopreservação

4.4.1 Análise por CCD

4.4.1.1 Análise de ácidos fenólicos

A fase móvel utilizada para a investigação da presença de ácidos fenólicos permitiu a separação e a visualização de manchas em todos os materiais analisados (folhas de *P. suberosa* mantidas *in vitro* e de plantas derivadas de ápices criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona), sem diferenças em relação aos perfis cromatográficos. Foram detectadas três substâncias, representadas por manchas de coloração azul-esverdeado, com valores de R_f de 0,48, 0,62 e 0,79, respectivamente. Quando comparadas aos padrões utilizados, somente foi possível observar correspondência da substância 3 com o padrão de ácido cafeico (Figura 26).

Figura 26 – Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para a detecção de ácidos fenólicos em folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona

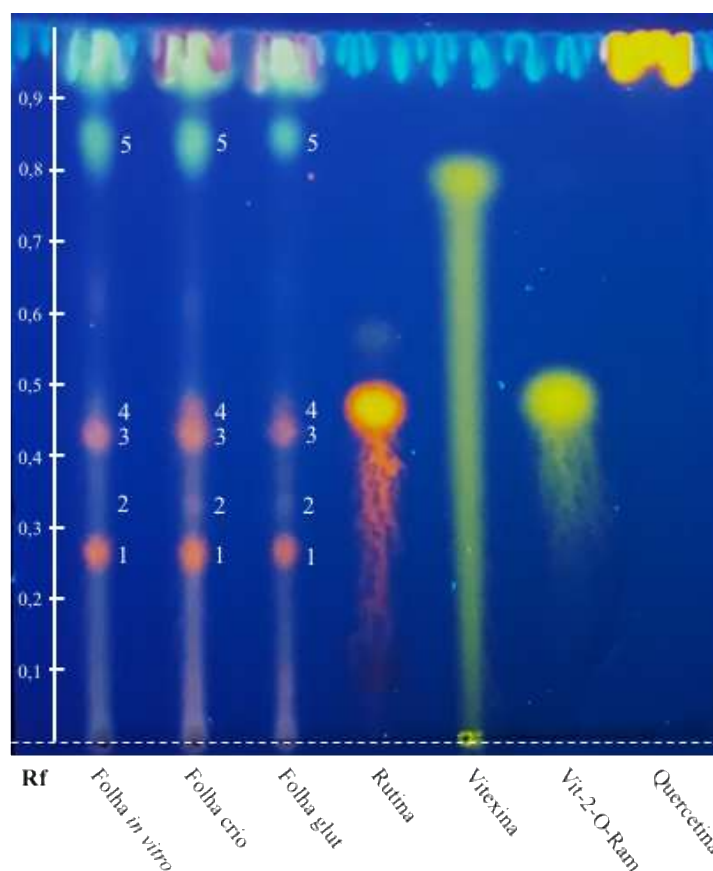


Legenda: Fase móvel: clorofórmio:acetato de etila:acetona: ácido fórmico (40:30:20:10). Revelação: NP/PEG 4000 (Natural Products/polietilenoglicol). Visualização: UV_{365nm}

4.4.1.2 Análise de flavonoides

A análise por CCD para a detecção de flavonoides revelou a presença de cinco manchas intensas nas amostras estudadas, com valores R_f entre 0,28 e 0,88, com exceção das manchas de R_f 0,35 e 0,49, que apresentaram baixa intensidade no extrato de folhas de plantas *in vitro*. As quatro manchas de menor R_f (0,28 a 0,49) apresentaram coloração alaranjada quando visualizadas em UV a 365 nm, compatível com flavonoides derivados de luteolina, como a orientina e a isoorientina. A mancha de maior R_f (0,88) apresentou coloração azulada em 365 nm, semelhante à coloração da mancha visualizada no fronte de solvente. As manchas observadas não puderam ser relacionadas aos padrões de flavonoides utilizados, embora a substância 3 tenha apresentado a mesma coloração e um fator de retenção próximo ao da rutina (0,50) (Figura 27).

Figura 27 - Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de flavonoides em folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona

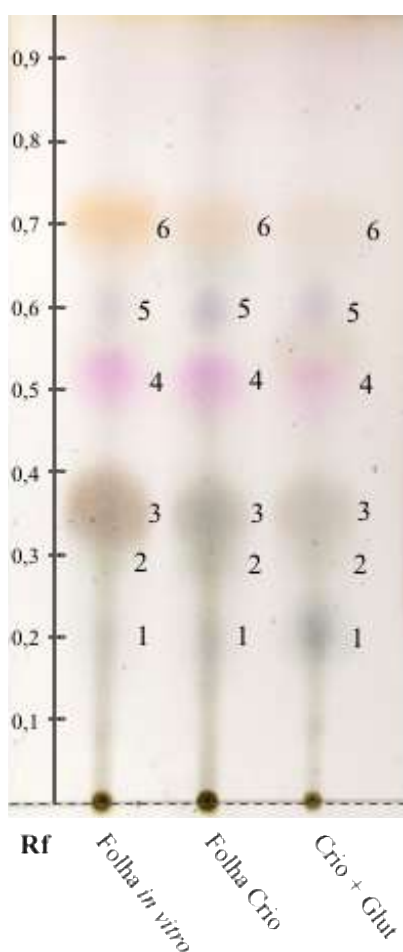


Legenda: Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v).
Revelação: NP/PEG 4000 (Natural Products/polietilenoglicol). Visualização: UV_{365nm}

4.4.1.3 Análise de saponinas

Todos os materiais analisados apresentaram manchas sugestivas de saponinas na análise por CCD. Seis manchas, com valores de R_f entre 0,22 e 0,73, foram observadas em todos os materiais, variando apenas na coloração (Figura 28).

Figura 28 - Perfil cromatográfico, pela técnica de CCD, para identificação de saponinas em folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona

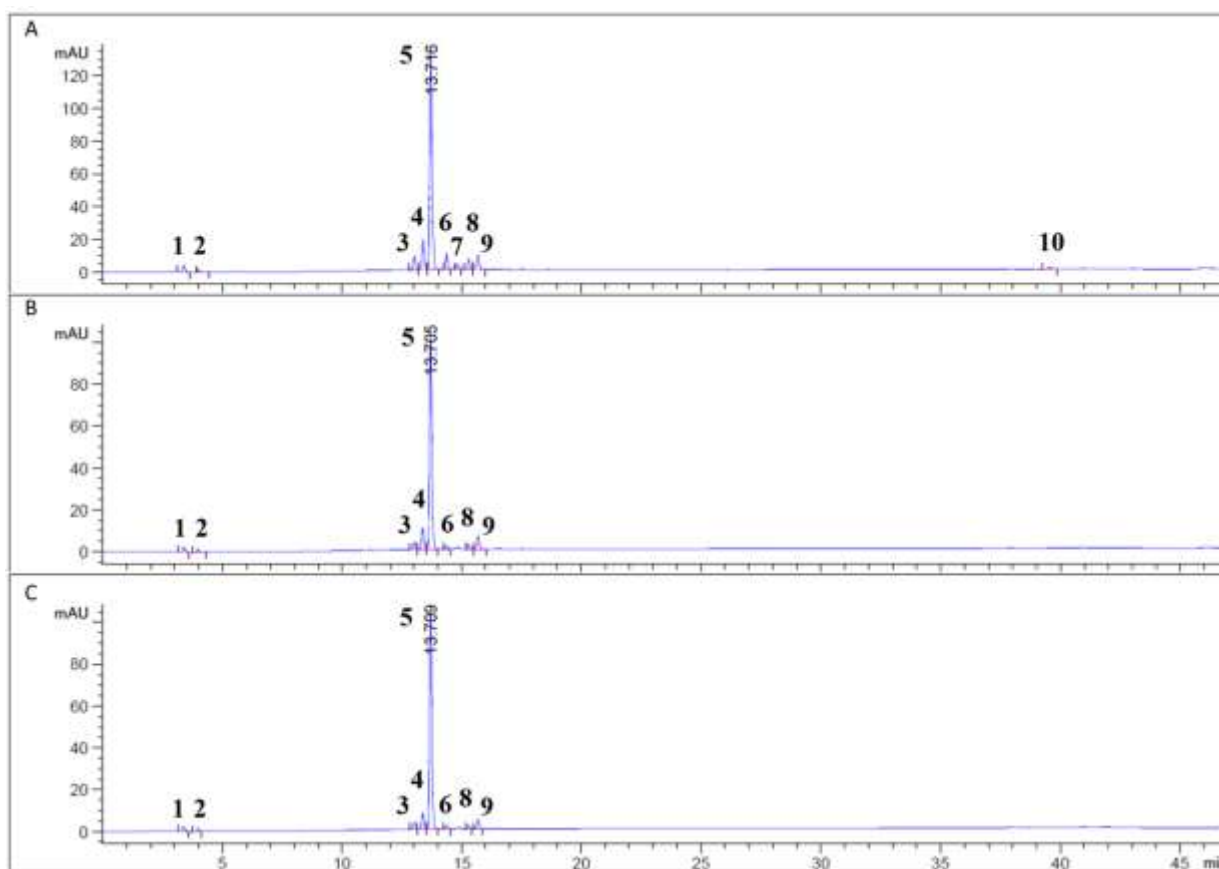


Legenda: Fase móvel: clorofórmio:ácidoacético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). Revelação: Anisaldeído sulfúrico. Visualização: Luz visível.

4.5 Análise por CLAE-DAD-UV

A análise cromatográfica, realizada a 340 nm, dos extratos de folhas de *P. suberosa* excisadas de plantas mantidas *in vitro* e daquelas derivadas de ápices criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona, indicou a presença de um grupo de substâncias, com tempos de retenção (tR) entre 13 e 16 minutos, nas três amostras analisadas. O maior número de sinais (10) foi observado no extrato de folhas de plantas mantidas *in vitro*, incluindo duas substâncias somente detectadas nesta amostra (7 e 10) (Figura 29).

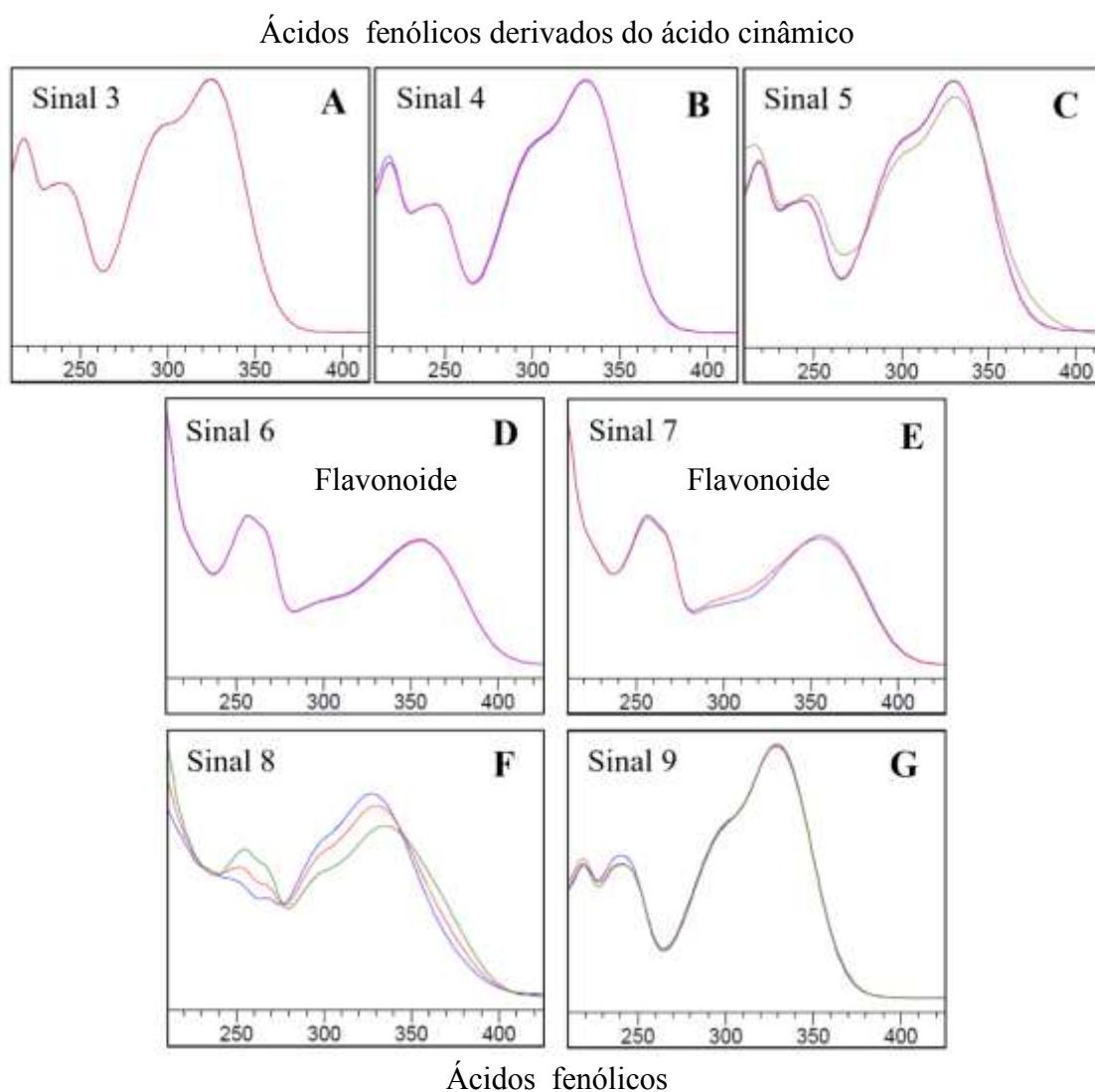
Figura 29 – Perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE-DAD-UV, de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona, com detecção em UV_{340nm}



Legenda: A) Extrato de folhas de plantas mantidas *in vitro*; B) Extrato de folhas de plantas criopreservadas; C) Extrato de folhas de plantas criopreservadas tratadas com glutatona.

Os sinais detectados apresentaram espectros de absorção característicos de ácidos fenólicos e flavonoides. Os sinais 3, 4, 5, 8 e 9 apresentaram espectros similares, com maior absorção em torno de 330 nm, enquanto os sinais 6 e 7 apresentaram maior absorção a 360 nm (Figura 30).

Figura 30 – Espectros de absorção dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona, com detecção em UV_{340nm}



Legenda: A) Sinal 3 - tR = 13,02 min; B) Sinal 4 - tR = 13,38 min; C) Sinal 5 - tR = 13,71 min; D) Sinal 6 - tR = 14,37 min; E) Sinal 7 - tR = 14,81 min; F) Sinal 8 - tR = 15,29 min; G) Sinal 9 - tR = 15,68 min.

As três amostras analisadas apresentaram, como substância majoritária, o sinal 5 (tR = 13,71 minutos). Considerando a área total dos sinais a 340 nm, essa substância corresponde a cerca de 68% da composição do extrato de folhas de plantas mantidas *in vitro* e, aproximadamente, a 80% da composição dos extratos de folhas de plantas derivadas de ápices criopreservados, com ou sem o tratamento com glutathione (Tabela 1). Além disso, foi possível observar uma redução na intensidade de todos os sinais detectados nas amostras derivadas da criopreservação, quando comparados ao extrato de folhas de plantas mantidas *in vitro*, com exceção do sinal 2, que se manteve igual nas três amostras analisadas. Os sinais 2, 4, 6, 8 e 9 apresentaram áreas ainda menores nas amostras de folhas derivadas de ápices criopreservados tratados com glutathione (Tabela 2).

Tabela 1 – Áreas dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutathione, com detecção em UV_{340nm}

Sinais		Área em UV _{340 nm} (mAU*s) / Intensidade (% relativa)		
Nº	tR (min)	Folha <i>in vitro</i>	Folha crio	Folha crio + glutathione
1	3,38	26,91 (2,1%)	14,34 (1,7%)	16,21 (2,0%)
2	3,98	9,60 (0,7%)	10,05 (1,2%)	6,52 (0,8%)
3	13,02	55,68 (4,3%)	20,32 (2,4%)	20,73 (2,6%)
4	13,38	121,67 (9,3%)	68,71 (8,1%)	51,60 (6,4%)
5	13,71	886,64 (68,1%)	662,53 (78,2%)	658,78 (81,7%)
6	14,37	56,99 (4,4%)	10,72 (1,3%)	9,43 (1,2%)
7	14,81	24,35 (1,9%)	ND	ND
8	15,29	42,41 (3,3%)	14,84 (1,8%)	11,87 (1,5%)
9	15,68	69,93 (5,4%)	45,76 (5,4%)	31,57 (3,9%)
10	39,56	7,88 (0,6%)	ND	ND

Legenda: ND – não detectado.

Tabela 2 – Comparação das áreas dos sinais detectados por CLAE-DAD-UV, com detecção em UV_{340nm}, em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* e daquelas derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona

Sinais		Influência dos tratamentos (% relativa da área)		
Nº	tR (min)	Folha <i>in vitro</i>	Folha Crio	Folha glutatona
1	3,38	100	53,3	60,2
2	3,98	100	104,7	67,9
3	13,02	100	36,5	37,2
4	13,38	100	56,5	42,4
5	13,71	100	74,7	74,3
6	14,37	100	18,8	16,5
7	14,81	100	0,0	0,0
8	15,29	100	35,0	28,0
9	15,68	100	65,4	45,1
10	39,56	100	0,0	0,0

4.6 Avaliação da atividade antioxidante

4.6.1 Avaliação da capacidade de captura do radical DPPH

Extratos de folhas de *Passiflora suberosa* excisadas de plantas mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona, apresentaram elevada capacidade antioxidante, evidenciada pela redução do radical DPPH em até 90% (Figura 31).

Os valores de CE_{50} variaram de 2,58 a 2,72 mg/mL, sem diferenças significativas entre as amostras. Contudo, o potencial antioxidante observado correspondeu a, aproximadamente, 60 vezes menos do que o apresentado pela quercetina (0,042 mg/mL), utilizada como controle positivo para esse ensaio (Tabela 3).

Figura 31 – Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona

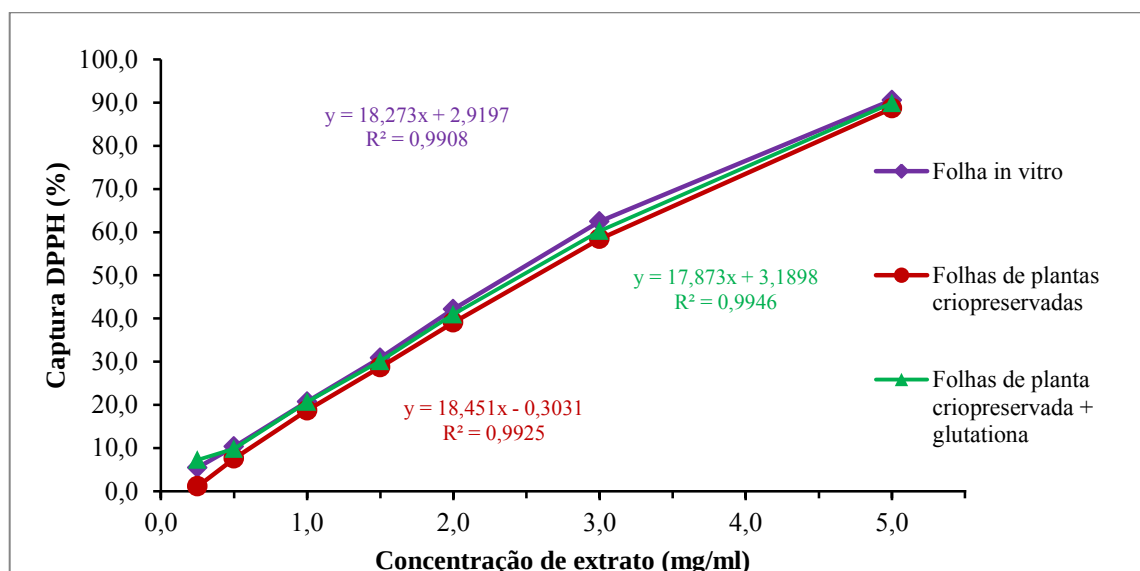


Tabela 3 – Capacidade de captura do radical DPPH por extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione

Amostras	Concentração (mg/mL)	Captura DPPH (%)	CE ₅₀ (mg/mL)
Quercetina	0,02 – 0,1	28,1 – 94,2	0,042 ± 0,0 ^a
Plantas <i>in vitro</i>	0,25 – 5,0	5,5 – 90,6	2,58 ± 0,0 ^b
Plantas criopreservadas	0,25 – 5,0	4,3 – 88,7	2,68 ± 0,047 ^b
Plantas criopreservadas + Glutathione	0,25 – 5,0	4,9 – 88,6	2,72 ± 0,044 ^b

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

4.6.2 Avaliação da capacidade quelante de íons ferrosos

Extratos de todas as amostras analisadas apresentaram elevado potencial antioxidante como quelantes de íons metálicos, com baixos valores de CE₅₀ (0,92 a 0,99 mg/mL), sem diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4 – Potencial antioxidante avaliado pela capacidade quelante de íons ferrosos em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione

Amostras	Concentração (mg/mL)	Atividade Quelante (%)	CE ₅₀ (mg/mL)
EDTA	0,005 -0,02	24,6– 96,2	0,098 ± 0,0 ^a
Plantas <i>in vitro</i>	0,25 – 2,0	23,3 – 79,2	0,92 ± 0,06 ^b
Plantas criopreservadas	0,25 – 2,0	15,5 – 83,0	0,98 ± 0,03 ^b
Plantas criopreservadas + Glutathione	0,25 – 2,0	16,1 – 84,4	0,99 ± 0,06 ^b

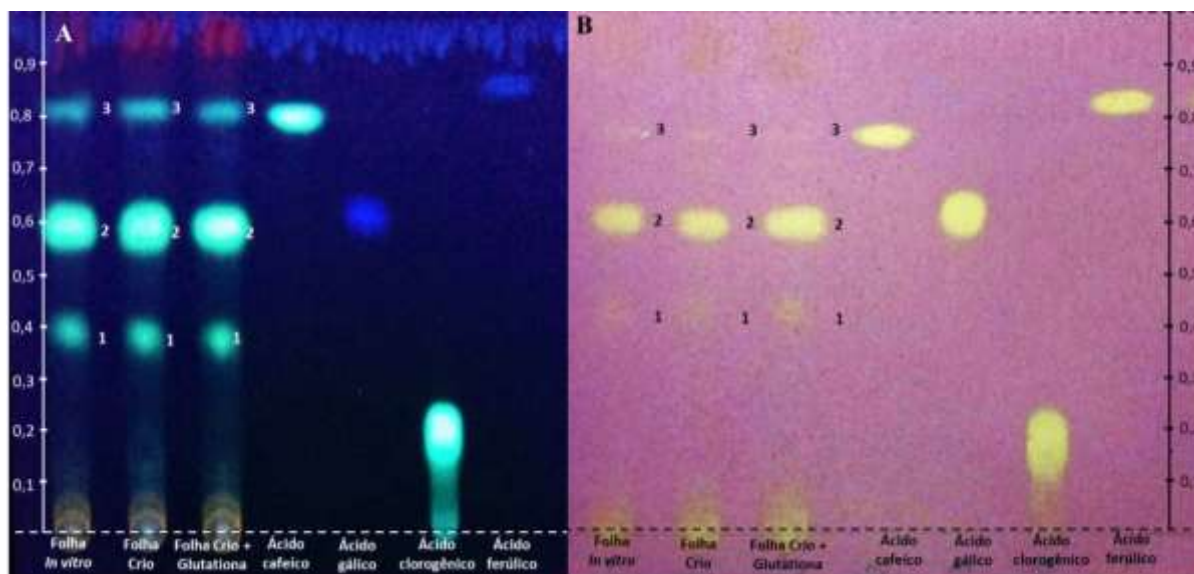
Os resultados expressam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

4.6.3 Análise qualitativa da atividade antioxidante CCD-DPPH

Para a análise qualitativa do potencial antioxidante dos extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione, foi realizada a separação das substâncias em placas de CCD utilizando fases móveis específicas para flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas, antes da determinação da capacidade de captura do radical DPPH *in situ*.

Na análise para ácidos fenólicos foram observadas manchas amarelas sobre o fundo arroxado, correspondentes à captura do radical DPPH, nas três substâncias previamente detectadas nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vitro* e daquelas derivadas de ápices caulinares criopreservados com ou sem tratamento com glutathione. As substâncias 1 e 3 ($R_f = 0,48$ e $R_f = 0,79$, respectivamente) apresentaram fraca atividade antioxidante, associada à suavidade na intensidade das manchas, enquanto a substância 2 ($R_f = 0,62$) apresentou uma mancha amarela de alta intensidade, indicando elevado potencial antioxidante. A ação antioxidante também foi evidente nas manchas referentes aos padrões de referência utilizados (Figura 32).

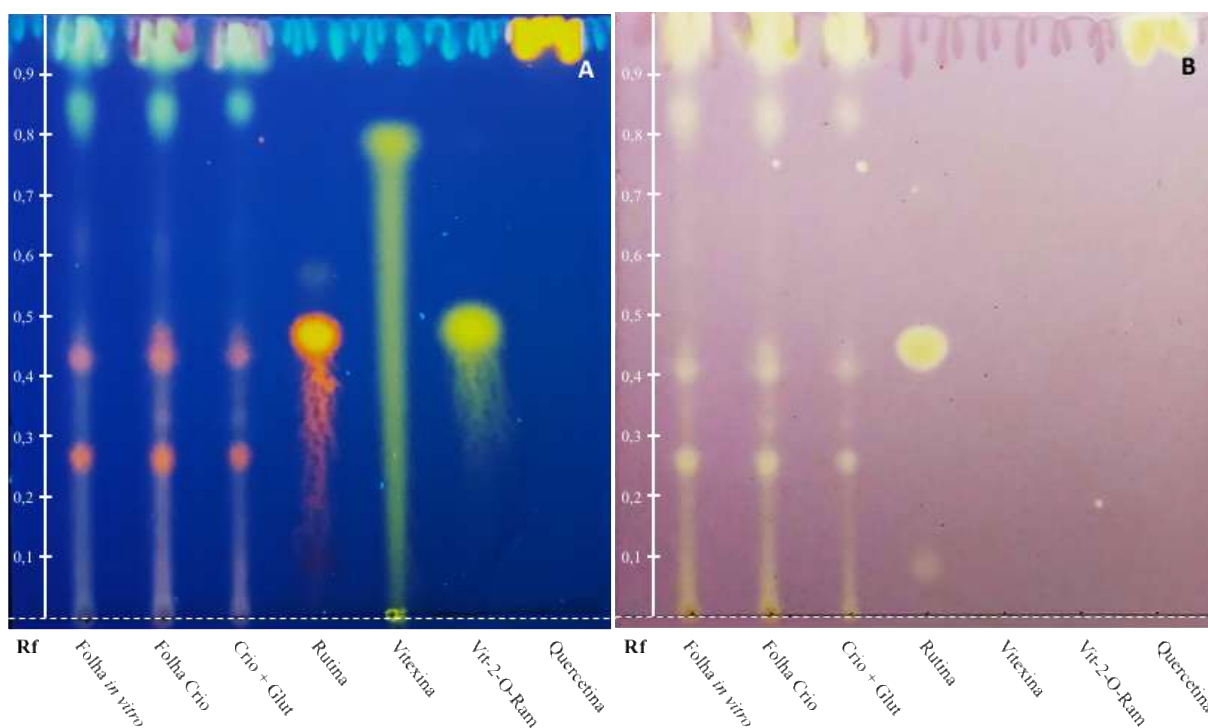
Figura 32 - Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione



Legenda: Fase móvel: clorofórmio:acetato de etila:acetona: ácido fórmico (40:30:20:10). Revelação: A) NP/PEG 4000 (visualização sob UV_{365nm}); B) Solução metanólica de DPPH a 0,02%.

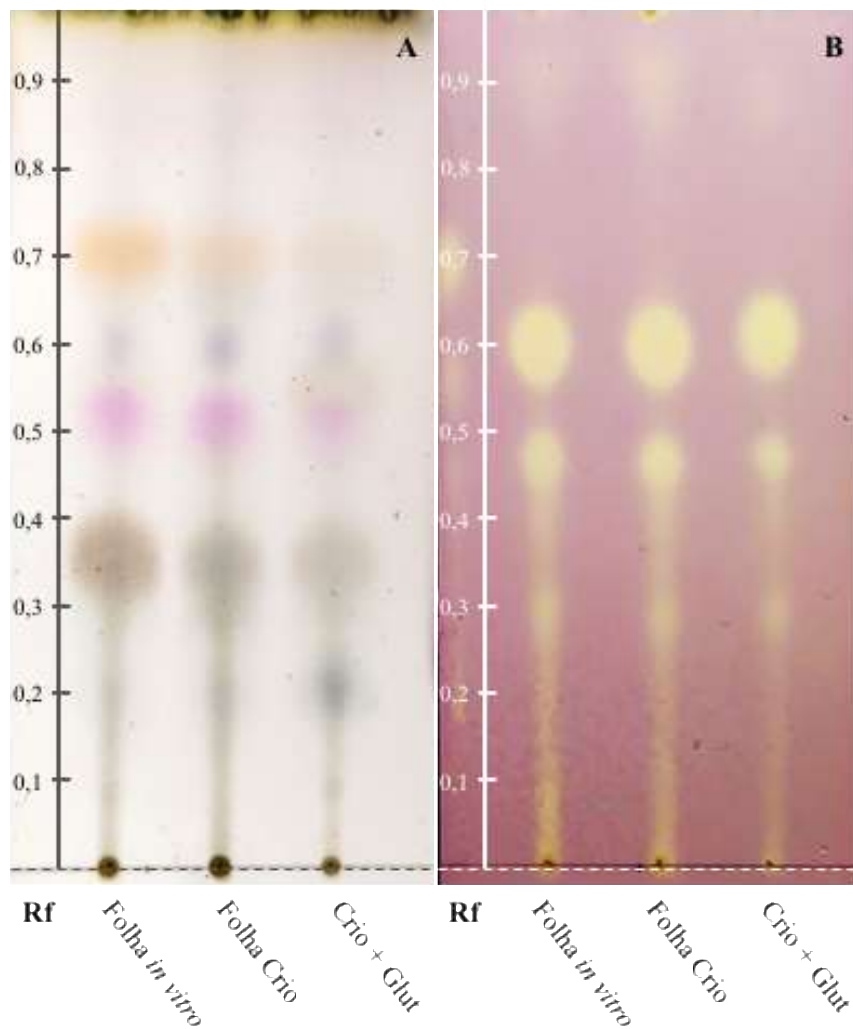
Na análise para flavonoides foi observado que todas as manchas previamente observadas nas três amostras analisadas apresentaram ação antioxidante, evidenciada por bandas amarelas sobre o fundo arroxado (Figura 33). Por outro lado, na análise para saponinas foram visualizadas três manchas amarelas com alta intensidade nas amostras analisadas, com $R_f = 0,56$ e $0,46$, indicando que a capacidade antioxidante apresentada por esses extratos também pode estar associada à presença dessas substâncias. Cabe destacar que uma dessas manchas ($R_f = 0,50$), não foi visualizada com a revelação por anisaldeído sulfúrico (Figura 34).

Figura 33 - Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutatona



Legenda: Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v).
Revelação: A) NP/PEG 4000 (Visualização: UV₃₆₅ nm); B) Solução metanólica de DPPH a 0,2%.

Figura 34 - Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de saponinas em extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathione

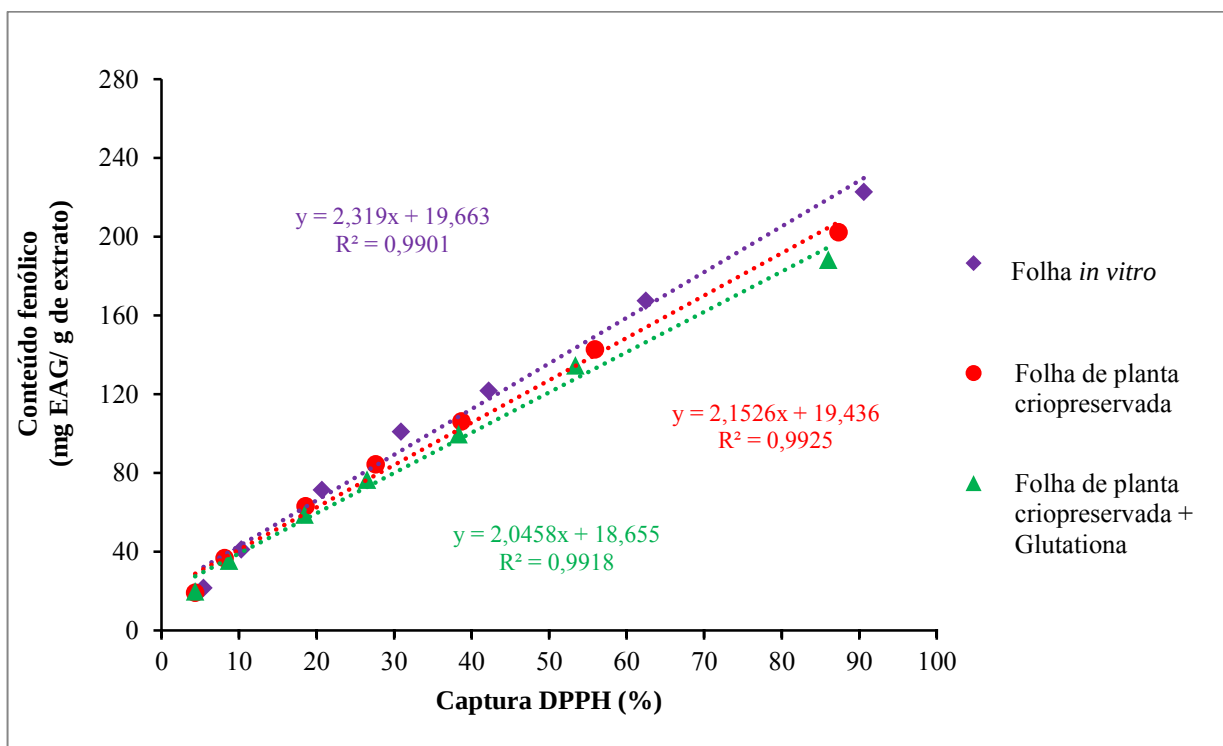


Legenda: Fase móvel: clorofórmio:ácidoacético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). Revelação: A) anialdeído sulfúrico; B) Solução metanólica de DPPH a 0,2%.

4.6.4 Determinação do conteúdo fenólico e correlação com a capacidade de captura do radical DPPH

Não foram observadas diferenças significativas na produção de substâncias fenólicas entre os materiais de *P. suberosa* analisados. Além disso, houve uma correlação positiva entre o teor de fenóis totais e o potencial antioxidante desses materiais, evidenciado pela capacidade de captura do radical DPPH (Figura 35).

Figura 35 - Correlação entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante de extratos de folhas de plantas de *Passiflora suberosa* L. mantidas *in vitro* ou criopreservadas pela técnica de V-Crioplaca, com ou sem tratamento com glutathiona



5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o sucesso e fracasso dos protocolos de criopreservação deixaram de ser relacionados apenas à formação de cristais de gelo. Estudos mais recentes têm mostrado que outros fatores, além das injúrias mecânicas, podem induzir e/ou amplificar os danos celulares durante as diferentes etapas dos protocolos, embora só possam ser constatados após o armazenamento, em função de baixas taxas de recuperação (JOHNSTON et al., 2007a; SKYBA et al., 2010; KACZMARCZYK et al., 2012).

O conhecimento dos mecanismos celulares de resposta à desidratação e a baixas temperaturas, assim como a caracterização das injúrias resultantes, são consideradas ferramentas importantes para a implementação de ações que minimizem os danos celulares, permitindo a obtenção de maiores taxas de recuperação após o armazenamento (JOHNSTON et al., 2007a; SKYBA et al., 2010; LYNCH et al., 2011). Contudo, embora as respostas fisiológicas sejam bem conhecidas para espécies de clima temperado, os impactos desse tipo de estresse em espécies tropicais ainda não são muito conhecidos (ZHANG et al., 2018).

As diferentes técnicas de criopreservação envolvem adaptações e ajustes específicos para atenuação de injúrias, embora as condições indutoras de criotolerância também sejam potencialmente geradoras de estresse. A técnica de V-Crioplaca vem sendo considerada bastante eficaz para o armazenamento de materiais vegetais em NL, por resultar em altas taxas de recuperação de plantas (NIINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2011; 2012; 2015; CORDEIRO et al., 2015; RAFIQUE et al., 2015; SIMÃO et al., 2018). Os resultados obtidos estão associados, principalmente, à diminuição da quantidade de solução crioprotetora e à velocidade de troca de temperatura na base de alumínio, o que resulta em menor toxicidade e reduz a probabilidade de danos físicos causados pela formação de cristais de gelo (NIINO et al., 2013).

Em *P. suberosa*, a utilização da técnica de V-Crioplaca se mostrou mais eficiente para a criopreservação de ápices caulinares, quando comparada às técnicas de vitrificação e encapsulamento-vitrificação. No estabelecimento do protocolo utilizando a técnica de V-Crioplaca foram avaliadas a influência da idade dos explantes e do tempo de exposição às soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3, sendo as maiores taxas de recuperação de plantas observadas em explantes de 40 dias expostos a PVS3 por 90 minutos (60%) (VIANNA et al., 2019). Esse resultado representou um aumento significativo em relação aos obtidos

anteriormente, quando foram observadas taxas de recuperação de 8 e 28% (GARCIA et al., 2011b). Além disso, o desenvolvimento de plantas após a criopreservação por V-Crioplaca ocorreu de forma mais rápida que nos outros protocolos, com uma redução do período de recuperação dos explantes cerca de 30 dias (VIANNA, 2016).

Como as principais injúrias observadas durante a criopreservação estão associadas a danos oxidativos provocados pelas baixas temperaturas e pelo desbalanço osmótico, a avaliação do estresse oxidativo é de grande relevância e deve ser realizada durante todo o protocolo, uma vez que cada tratamento pode contribuir de forma isolada e/ou em conjunto para o fracasso da técnica, levando ao acúmulo progressivo de injúrias (RAHMAH et al., 2015). Assim, neste trabalho, foram avaliados aspectos bioquímicos, como a peroxidação de lipídios e a atividade de enzimas antioxidantes, visando à identificação das etapas críticas do protocolo e o posterior direcionamento da aplicação de substâncias antioxidantes.

A osmoproteção e a desidratação são, no geral, consideradas as etapas mais determinantes dos estresses osmóticos e oxidativo, já que a remoção acentuada da água que provoca alterações na dinâmica dos fosfolipídios de membrana e aumento na concentração de eletrólitos, além de mudanças no pH e nas interações entre macromoléculas (REINHOUD et al., 2000). Adicionalmente, as etapas de resfriamento rápido e reaquecimento também estão associadas a ocorrência de injúrias, principalmente aquelas causadas pela cristalização intracelular da água, quando há distribuição desigual dos crioprotetores nas etapas anteriores (RAHMAH et al., 2015). Contudo, a quantificação desses danos nos materiais derivados de sistemas *in vitro* é dificultada, principalmente, pelo tamanho reduzido dos explantes, o que torna necessária a utilização de uma grande quantidade de material vegetal para as análises. Além disso, os tecidos vegetais possuem um elevado conteúdo de carboidratos e metabólitos secundários, que podem dificultar ainda mais a detecção de danos oxidativos (FANG et al., 2008).

As estruturas-chave nas respostas induzidas pelas baixas temperaturas são as membranas celulares, visto que as alterações em sua composição e propriedades físicas (redução da fluidez e aumento da rigidez) são desencadeadoras de mecanismos de sinalização de tolerância ao frio e atenuantes de danos (LISSARE et al. 2010; MIURA; FURUMOTO, 2013; RIHAN et al., 2017). No entanto, as baixas temperaturas e a utilização de agentes osmóticos (crioprotetores) podem afetá-las, não só pela formação de cristais de gelo, mas também pela peroxidação de fosfolipídios (FUNNEKOTTER et al., 2013). Essas lesões aumentam a permeabilidade, afetando os processos de osmose e difusão, alterando as trocas

iônicas e comprometendo sua função (GEORGIEVA et al., 2014). Portanto, o impacto de crioinjúrias nas membranas celulares tem recebido atenção especial nos últimos anos (FUNNEKOTTER et al., 2017).

Neste trabalho, a peroxidação de fosfolipídios foi avaliada nos materiais submetidos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca, por meio da quantificação de MDA. Esse ensaio foi escolhido, uma vez que o MDA é um produto da peroxidação de lipídios e tem sido bastante utilizado como biomarcador de danos oxidativos em diversos materiais criopreservados, como embriões zigóticos de milho e palmeira (WEN et al., 2010; 2012), embriões somáticos de *Olea europaea* (LYNCH et al., 2011), ápices caulinares de *Rubus* (UCHENDU et al. 2010b) e *Hypericum perforatum* (SKYBA et al., 2010; DANOVA et al., 2012; GEORGIEVA et al., 2014), calos embriogênicos de *Agapanthus praecox* (ZHANG et al., 2015; CHEN et al., 2016), protocormos de *Dendrobium* (POOBATHY et al., 2013), plântulas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (REN et al., 2015; HUANG et al., 2018) e gemas laterais de *Hancornia speciosa* (PRUDENTE et al., 2017).

Embora a quantificação espectrofotométrica do MDA seja considerada um ensaio sensível, o teste pode superestimar os níveis dessa substância, devido à alta reatividade do MDA com carboidratos e alguns metabólitos secundários, como as antocianinas (HODGES et al., 1999; WANG et al., 2014). Dessa forma, com o objetivo de eliminar essas interferências para uma estimativa mais adequada da taxa de peroxidação de lipídios nos tecidos estudados, optamos por utilizar a metodologia ajustada por Hodges e colaboradores (1999), a qual inclui a leitura em outros comprimentos de onda (440 e 600 nm). Altas taxas de MDA foram detectadas nos ápices caulinares de *P. suberosa* após a desidratação com PVS3 e imediatamente após a retirada do NL, mas não 10 dias após o reaquecimento. Esses resultados sugerem que, embora tenha ocorrido peroxidação lipídica durante o processo de criopreservação, houve também a ação do sistema antioxidante celular com a consequente redução dos danos às membranas celulares após o reaquecimento.

Resultados similares foram observados em calos embriogênicos de *Agapanthus praecox*, que apresentaram um aumento significativo na produção de MDA durante o processo de criopreservação, principalmente nas etapas de desidratação e reaquecimento, alcançando valores até 2,5 vezes maiores do que os observados nos materiais controle (ZHANG et al., 2015). Da mesma forma, picos de produção de MDA foram observados em plântulas de *Arabidopsis thaliana* após a desidratação e o reaquecimento (CHEN et al., 2015,

REN et al., 2015), enquanto para embriões de arroz, as maiores taxas de peroxidação de lipídios foram observadas após a desidratação (HUANG et al., 2018). No entanto, a elevação dos níveis de MDA pode também ocorrer em outras etapas dos protocolos, incluindo a osmoproteção, como demonstrado por Uchendu e colaboradores (2010b).

Alguns autores estabeleceram também uma relação positiva entre a produção de MDA e o aumento dos níveis de H_2O_2 e $OH^\bullet$ durante a criopreservação (ZHANG et al., 2015; CHEN et al., 2015; 2016), principalmente nas etapas de desidratação e reaquecimento (ZHANG et al., 2015; REN et al., 2015; HUANG et al., 2018). Dessa forma, outro aspecto abordado no presente trabalho foi a avaliação da ação do sistema antioxidante celular durante a criopreservação dos ápices caulinares de *P. suberosa*, por meio da quantificação de proteínas totais e da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX nas diferentes etapas do protocolo.

O teor de proteínas totais dos ápices caulinares de *P. suberosa* variou no decorrer do processo de criopreservação, tendo aumentado nas etapas de pré-cultura e osmoproteção. A influência dos tratamentos crioprotetores na produção de proteínas tem sido observada por diversos pesquisadores (FOLGADO et al., 2014, GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2018). Rahmah e colaboradores (2015) constataram um acúmulo de proteínas totais em explantes de *Brassidium*, com aumentos consideráveis nas etapas de osmoproteção e resfriamento em NL. Ápices caulinares de *Vanilla planifolia* também apresentaram mudanças no perfil proteico em resposta, principalmente, ao pré-cultivo em sacarose, à osmoproteção e à desidratação com PVS3, as quais foram associadas ao aumento da produção de enzimas do sistema antioxidante e à diminuição de proteínas de choque térmico (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2018).

O acúmulo progressivo de proteínas durante o processo de criopreservação tem sido apontado como uma das alterações fisiológicas de tolerância ao frio (LISSARE et al., 2010; MIURA; FURUMOTO, 2013; RAHMAH et al., 2015; RIHAN et al., 2017). Essa expressão diferencial de proteínas pode ocorrer na parede celular, no apoplasto e no citoplasma, como um mecanismo de crioproteção (HEIDARVAND; AMIRI, 2010). Estudos recentes de proteômica têm demonstrado que a resposta aos tratamentos crioprotetores envolve alterações no metabolismo proteico, abrangendo síntese, enovelamento e degradação de proteínas, principalmente aquelas participantes de vias de sinalização de estresse e do metabolismo de carboidratos, assim como enzimas antioxidantes, proteínas estruturais de membrana e proteínas de choque térmico (DI et al., 2018; GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2018). Dessa forma, as proteínas podem atuar na proteção e prevenção das crioinjúrias pela estabilização de

estruturas e membranas celulares, interagindo com fosfolipídios, açúcares e outros componentes durante o estresse osmótico e resfriamento, além de atuarem como omorreguladores e participarem da captura de radicais (HEIDARVAND; AMIRI, 2010; FOLGADO et al., 2014; GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2018). Além disso, o aporte de proteínas poderia ser uma fonte potencial de nitrogênio para a célula após condições de estresse (LISSARE et al., 2010; RAHMAH et al., 2015; RIHAN et al., 2017).

A avaliação da atividade de SOD revelou um aumento nos estágios iniciais do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca, principalmente após a pré-cultura e a osmoproteção, o que foi associado a ocorrência de estresse oxidativo em resposta às primeiras etapas de desidratação. Dessa forma, a SOD estaria participando da prevenção da cascata oxidativa, visto que o radical superóxido é o primeiro a ser formado e pode atuar como precursor de outras moléculas reativas (ALSCHER et al., 2002; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012; DEMIDCHIK, 2015). Por outro lado, o aumento na atividade de SOD também pode ocorrer após o resfriamento, conforme observado na criopreservação de *Agapanthus praecox* e *Oryza sativa*, tendo sido associado com a desintoxicação de ERO induzidas pelas condições criogênicas (ZHANG et al., 2015; HUANG et al., 2018).

Neste trabalho, a atividade de SOD também foi reduzida após a etapa de osmoproteção, mantendo-se constante nas etapas seguintes do protocolo. Esse comportamento poderia ter resultado no aumento dos níveis de MDA detectados após a desidratação e imediatamente após o reaquecimento, considerando que a atividade insuficiente de SOD gera um desbalanço dos níveis de $O_2^{\bullet-}$, os quais podem reagir com H_2O_2 dando origem ao $OH^{\bullet}$ (ŞEN, 2012; SHARMA et al., 2012, DEMIDCHIK, 2015), uma ERO altamente reativa que interage com fosfolipídios, afetando a integridade da membrana (FUNNEKOTTER et al., 2013; 2017). Dessa forma, considerando a possibilidade do acúmulo de moléculas H_2O_2 como uma condição potencialmente causadora de danos nas membranas, foram também quantificadas as atividades das enzimas CAT e APX.

Durante o processo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* foi observada uma redução da atividade de CAT, com a manutenção de elevada atividade de APX, após a etapa de osmoproteção. Apesar de a atividade de APX sugerir uma ação do sistema antioxidante contra os altos níveis de H_2O_2 , eles podem não ter sido totalmente reduzidos, devido à baixa atividade de CAT durante as etapas de desidratação em PVS3 e resfriamento em NL. Assim, é possível que o H_2O_2 possa estar induzindo, sozinho ou em associação com o $OH^{\bullet}$ gerado pela sua reação com o excesso de $O_2^{\bullet-}$, injúrias oxidativas nas

membranas celulares dos ápices caulinares de *P. suberosa*, o que corrobora a ideia da atividade insuficiente de SOD nas etapas após a pré-cultura.

Apesar de vários autores terem detectado variações nos níveis de enzimas antioxidantes para a neutralização do excesso de ERO durante a criopreservação (SKYBA et al., 2010; WEN et al., 2010; 2012; DANOVA et al., 2012; REN et al., 2013; 2015; POOBATHY et al., 2013; ZHANG et al., 2015; PRUDENTE et al., 2017; HUANG et al., 2018), não existe um padrão específico para essas alterações, uma vez que a produção de ERO é variável ao longo do processo (GEORGIEVA et al., 2014). Wen e colaboradores (2010, 2012) observaram que a baixa atividade de SOD, CAT e APX influenciaram negativamente a recuperação após as etapas de dessecação e imersão em NL em embriões de *Zea mays* e de *Livistona chinensis*. Em protocormos de orquídeas, a baixa taxa de recuperação de plantas (13%) foi atribuída a um expressivo estresse oxidativo associado, principalmente, ao decréscimo dos níveis de CAT nas etapas de reaquecimento e recuperação (POOBATHY et al., 2013). Zhang e colaboradores (2015) também observaram baixos níveis de SOD e CAT durante as etapas anteriores ao armazenamento em NL, apresentando aumento somente após a diluição (CAT) e a recuperação (CAT e SOD). Embora o estresse oxidativo tenha sido detectado, a atividade das enzimas ao longo do processo de criopreservação não exerceu forte influência na viabilidade celular, a qual foi associada à ação de componentes não enzimáticos do sistema antioxidante endógeno, como ácido ascórbico e GSH.

Com base na observação dos processos naturais de proteção ao estresse por substâncias antioxidantes, a aplicação exógena de ácido ascórbico e glutathione em diferentes etapas dos protocolos de criopreservação com o objetivo de complementar a ação do sistema antioxidante celular têm sido um mecanismo chave para a otimização do armazenamento em longo prazo de diversas espécies (UCHENDU et al., 2010a, b; ZHANG et al., 2015; CHEN et al., 2016; BI et al., 2018). Embora o uso dessas substâncias seja frequentemente associado à inibição da produção de H_2O_2 , redução das taxas de peroxidação de lipídios, aumento da atividade de enzimas antioxidantes e inibição de morte celular, os mecanismos de ação desses e de outros antioxidantes na recuperação de explantes ainda não foram completamente elucidados (CHEN et al., 2016).

Apesar de o uso de antioxidantes exógenos ser considerado importante para o sucesso de protocolos de criopreservação, no presente trabalho, a aplicação de substâncias antioxidantes não contribuiu para o aumento da taxa de recuperação dos brotos a partir de ápices caulinares de *P. suberosa*. Embora o uso de glutathione não tenha afetado as taxas de formação de brotos

pós-resfriamento, a aplicação de ácido ascórbico induziu uma redução significativa na recuperação de plantas. Resultados similares foram descritos após o uso de antioxidantes na criopreservação de ápices caulinares de *Nephelium ramboutan-ake* (CHUA; NORMAH, 2011) e de *Mentha× piperita* L. (GONZÁLEZ-BENITO et al., 2016), assim como para protocormos de orquídea (KHOR et al., 2020). Em contrapartida, Zhang e colaboradores (2015) observaram um efeito positivo na criopreservação de calos embrionários de *Agapanthus praecox*, após tratamentos com ácido ascórbico ou glutathione na etapa de desidratação por PVS2. Nestas condições, o uso de glutathione a 0,08 mM foi mais eficiente para o aumento da viabilidade dos calos, enquanto concentrações superiores não promoveram aumento ou reduziram drasticamente a recuperação do material vegetal (0,16 mM ou 0,32 mM, respectivamente) (CHEN et al., 2016).

A implementação de sistemas de monitoramento é considerada essencial para o sucesso dos protocolos de armazenamento em longo prazo de materiais biotecnológicos. Para plantas com potencial medicinal, a avaliação da capacidade biossintética após a criopreservação é fundamental para avaliar a preservação de suas características metabólicas e o não comprometimento das vias de produção de substâncias bioativas, assim como de suas propriedades terapêuticas. Contudo, poucos estudos relatam a análise da estabilidade metabólica de materiais vegetais após a criopreservação (MARCO-MEDINA; CASAS, 2013)

Neste trabalho, duas técnicas cromatográficas (CCD e CLAE-DAD-UV) foram utilizadas para avaliar a manutenção do perfil biossintético de plantas de *P. suberosa* derivadas de ápices caulinares submetidos a criopreservação, com ou sem tratamento com glutathione nas etapas prévias ao armazenamento em NL.

A técnica de CCD foi selecionada, uma vez que permite a obtenção de resultados mais rápidos, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução e interpretação (BIRK; PROVENSI; GOSMANN, 2005). Considerando as substâncias já detectadas em *P. suberosa* e em outras espécies do gênero, foram selecionados sistemas de CCD para a detecção de flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas. Foram observadas manchas indicativas dos três grupos de substâncias analisadas, porém sem diferenças entre os perfis cromatográficos das amostras submetidas ou não à criopreservação, independente do tratamento com glutathione, indicando a manutenção das características biossintéticas dos materiais criopreservados.

A análise de flavonoides revelou a presença de três substâncias nos extratos foliares estudados, identificadas por manchas de coloração laranja, as quais não puderam ser correlacionadas aos padrões utilizados nas análises por CCD. No entanto, é possível sugerir

que essas substâncias sejam flavonas de luteolina, como a orientina e a isoorientina, uma vez que apresentam a fluorescência alaranjada característica dessas substâncias, quando visualizadas a 365nm (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). Foi observada ainda uma mancha de coloração azulada, provavelmente associada a um ácido fenólico presente nas amostras. Estes resultados estão de acordo com os descritos anteriormente para a espécie (BIRK et al., 2005; GOSMANN et al., 2011; SIMÃO et al., 2018).

A investigação por CCD revelou ainda a presença de saponinas e de ácidos fenólicos nos extratos foliares de *P. suberosa*. Nas análises de ácidos fenólicos foram detectadas três substâncias, sendo uma delas associada ao padrão de ácido cafeico. De um modo geral, os maracujás apresentam uma variedade de ácidos fenólicos, principalmente ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido trans-cinâmico e ácido hidrobênzoico (GADIOLI et al., 2018; SHANMUGAM et al., 2018; ROTTA et al., 2018; SANTOS et al., 2021). Essas substâncias são conhecidas, principalmente, por sua ação antioxidante (GOLENIOWSKI et al., 2013; TANASE et al., 2019).

Análises mais específicas dos extratos foliares de *P. suberosa* foram realizadas por CLAE-DAD-UV. Essa técnica é uma importante ferramenta para a separação analítica de substâncias em extratos de *Passiflora*, devido à sua sensibilidade e ampla aplicação para grupos de metabólitos de interesse (SILVA; BOTTOLI, 2015; GADIOLI et al., 2018; OZAROWSKI et al., 2018; ALVES et al., 2020).

Neste trabalho, a análise por CLAE evidenciou a presença de substâncias caracterizadas como ácidos fenólicos e flavonoides, com base em seus espectros de absorção a UV (ABAD-GARCÍA et al., 2009; SIMÕES et al., 2017). Além disso, foi também observado que o armazenamento em NL não afetou, qualitativamente, a composição fitoquímica das plantas derivadas de ápices caulinares criopreservados, corroborando os dados obtidos nas análises por CCD. Entretanto, ocorreu uma redução na intensidade de alguns sinais nas amostras criopreservadas, quando comparadas ao grupo controle, sugerindo que o processo de criopreservação pode ter influenciado quantitativamente a produção das substâncias detectadas.

Análises por CLAE têm sido utilizadas em estudos de criopreservação com o intuito de avaliar a manutenção das características fitoquímicas após o processo criogênico. Bi e colaboradores (2016) observaram que o armazenamento em NL de ápices caulinares *Chrysanthemum morifolium* pela técnica de vitrificação em gota não afetou a composição fitoquímicos regenerantes. O mesmo foi observado para a produção de diosgenina em

plantas derivadas de ápices caulinares de *Dioscorea floribunda* criopreservados por vitrificação (AHUJA et al., 2002), assim como para a produção de flavonóis em ápices caulinares *Allium* sp. (WANG et al., 2021) e sinigrina em ápices de *Wasabia japonica* (MATSUMOTO et al., 2013), ambos criopreservados pela técnica de vitrificação. Por outro lado, as condições de estresse durante o armazenamento podem modular a produção e a resposta bioquímica de materiais criopreservados, como observado por alguns autores. Bruňáková e Cellárová (2017), por exemplo, observaram um aumento de três vezes na produção de hipericina e de 38 vezes nos níveis de floroglucinol em plantas derivadas de ápices criopreservados de *Hypericum perforatum* e *H. tetrapterum*, respectivamente.

Metabólitos secundários, como os detectados nas análises cromatográficas realizadas neste trabalho, podem participar do sistema antioxidante celular capturando diretamente radicais livres, ou impedindo processos potencialmente indutores de moléculas oxidativas, como a remoção de íons metálicos e a inibição de sistemas enzimáticos produtores de radicais livres (SOOBRAATTEE et al., 2005). Essas substâncias podem ainda aumentar a eficiência de processos antioxidantes celulares pela indução da expressão de genes relacionados à síntese de enzimas antioxidantes (TAN et al., 2018; KAURINOVIC; VASTANG, 2019). Dessa forma, a avaliação do potencial antioxidante de extratos foliares de plantas de *P. suberosa* derivadas da criopreservação foi um outro aspecto estudado neste trabalho.

Duas diferentes abordagens foram utilizadas neste trabalho para a análise quantitativa da capacidade antioxidante dos diferentes extratos. O ensaio de captura do radical DPPH avalia o potencial redutor tendo como base o sequestro de radicais livres, e tem sido amplamente utilizado para determinar o potencial antioxidante em *Passiflora* (ANTOIGNONI et al. 2007; ZERAIK et al., 2012; COLOMEU et al., 2014; LUGATO et al., 2014; SIMÃO et al., 2016). Por outro lado, a avaliação da capacidade quelante de íons metálicos, que evidencia o potencial de inibição das reações de Fenton e de Haber Weiss, nas quais esses íons estão envolvidos (HARB et al., 2016), ainda é pouco descrita em espécies do gênero (DA SILVA, 2021; SANTOS-TIERNO et al., 2021).

Os extratos de folhas de *P. suberosa* excisadas de plantas mantidas *in vitro* ou derivadas de ápices caulinares criopreservados, com ou sem tratamento com glutatona, apresentaram elevado potencial antioxidante, evidenciado pela redução do radical DPPH e pela capacidade de quelar íons metálicos. Esses dados, somados às respostas obtidas a partir dos ensaios de CCD-DDPH e da correlação entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante, também realizados neste trabalho, sugerem que o potencial antioxidante dos extratos pode

estar associado à presença de substâncias fenólicas, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, conforme já observado para outras espécies do gênero (LUGATO et al., 2014; SIMÃO, 2019).

Substâncias fenólicas são, frequentemente, associadas à atividade antioxidante devido às suas propriedades redutoras, que as tornam eficientes na captura de radicais livres. Além disso, essas substâncias podem também quelar metais, especialmente ferro e cobre, inibindo a formação de radicais livres (VUOLO et al., 2019). No entanto, sua eficiência antioxidante pode variar, dependendo do número e disposição de grupos hidroxilas na sua estrutura (SROKA; CISOWSKI, 2003).

Cabe ressaltar que as análises por CCD-DPPH realizadas neste trabalho também indicaram que a capacidade antioxidante apresentada pelos extratos foliares de *P. suberosa* também podem estar associadas à presença de saponinas. Resultados similares já foram descritos para diversas espécies (FRANCIS et al., 2002; ASHRAF et al., 2013; CHEN et al., 2014), incluindo para materiais biotecnológicos de *Passiflora*, como culturas de raízes adventícias de *P. pohlii* (SIMÃO et al., 2016) e calos friáveis de *P. alata* (DA SILVA, 2021).

O conjunto dos resultados descritos neste trabalho confirma a eficiência do uso da criopreservação como uma estratégia de conservação em longo prazo para *P. suberosa*. As alterações bioquímicas induzidas pela criopreservação, descritas pela primeira vez em uma espécie do gênero *Passiflora*, contribuem para uma maior compreensão das respostas celulares de plantas tropicais ao estresse induzido pelo frio e pela desidratação. Ademais, a manutenção da capacidade biossintética em plantas derivadas de ápices criopreservados, principalmente do ponto de vista qualitativo, agrega informações relevantes para o estudo do funcionamento e modulação do metabolismo secundário durante e após a criopreservação.

CONCLUSÕES

A partir dos diferentes estudos desenvolvidos neste trabalho com a espécie *Passiflora suberosa* L., podemos concluir que:

- A detecção de altas taxas de MDA nos ápices caulinares de *P. suberosa* submetidos à desidratação com PVS3 e imediatamente após a retirada do NL indica que o MDA pode ser considerado um eficiente biomarcador de danos oxidativos nas membranas celulares induzidos pelo processo de criopreservação;
- Os danos oxidativos nas membranas celulares observados nos ápices caulinares de *P. suberosa* podem estar associados ao decréscimo das atividades de SOD e CAT após as etapas de osmoproteção, desidratação e imersão em NL;
- As análises do teor de MDA e das atividades das enzimas antioxidantes ao longo do protocolo de criopreservação de ápices de *P. suberosa* utilizando a técnica de V-Crioplacas, permitiram a identificação das etapas de osmoproteção e desidratação em PVS3 como as mais críticas do processo;
- As ações direcionadas para o aperfeiçoamento do protocolo de criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* por V-Crioplaca destacam a necessidade de maior investigação na aplicação de outras substâncias antioxidantes e/ou atenuantes de processos indutores de morte celular;
- Análises por CCD e CLAE-DAD-UV não apontaram diferenças entre os perfis cromatográficos dos extratos de folhas derivadas de plantas submetidas ou não à criopreservação;
- Extratos foliares de *P. suberosa* apresentaram alto potencial antioxidante, tanto por mecanismos diretos, de captura de radicais, quanto mecanismos indiretos, de capacidade quelante de íons ferrosos;
- O protocolo de V-Crioplaca previamente estabelecido para ápices caulinares de *P. suberosa* não afetou a capacidade biossintética do material criopreservado, preservando as características do material original.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a influência de outras substâncias com ação antioxidante, isoladamente e/ou em combinação, nas etapas críticas do protocolo de criopreservação;
- Monitorar a estabilidade genética e epigenética dos materiais criopreservados, por meio dos marcadores RAPD, ISSR e MSAP.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; GARMÓN-LOBATO, S.; GALLO, B.; VICENTE, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1216 (28), p. 5398–5415, 2009.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-41, 2002.
- 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.
- ARAÚJO, D.S.; LUZ, P.B.; NEVES, L.G.; SOBRINHO, S.P. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 3, p. 248-253, 2016.
- ARAÚJO, D. S.; SOARES, F. S.; SOBRINHO, S. P.; LUZ, P. B. Crioprotetores na criopreservação de sementes de *Passiflora mucronata* Lam. **Iheringia, Série Botânica**, v. 74: e2019008, 2019.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. et al. 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.
- BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, v. 165, p. 1221-1227, 2003.
- BAEK, K. H.; SKINNER, D. Z. Production of reactive oxygen species by freezing stress and protective roles of antioxidant enzymes in plant. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 1, n. 1, p. 34-40, 2012.
- 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: e4804; DOI 10.7717/peerj.4804
- 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. Effect of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rats offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n. 12, p. 1490-1495, 2011.
- BARP, E. A.; SOARES, G. L. G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A. M.; VECCHI, C.; MOREIRA, G. R. P. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 3, p. 853-862, 2006.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e

comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BENSON, E. E. Cryopreserved Germoplasm: The biochemical basis of freezing injury. In: BENSON, E. E. **Free radical damage in stored plant germoplasm**. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p. 75-86, 1990.

BENSON, E. Cryopreservation Theory. In: Reed, B. M. (Ed.) **Cryopreservation plant: A practical Guide**. New York, USA: Springer, p. 15-32, 2008.

BENZIE, I. F.F. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12564>>. Acesso: 30 de julho de 2015.

BI, W.L.; HAO, X. Y.; CUI, Z. H.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Droplet-vitrification cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 54, n. 6, p. 590–599, 2018.

BIRK, C.D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2285-2291, 2005.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179 - 194, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CANTRELL, C.L.; DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231-1242, 2012.

CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, n. 2, p. 145-157, 2001.

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 of Molecular Sciences**, v. 15, p. 14122-14152, 2014.

CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, p. 1-92, 1997.

- CERVIL, A. C.; LINSINGEN, L. Sinopse taxonômica das Passifloraceae no complexo de cerrado (savana) no estado do Paraná – Brasil. **Iheringia - Série Botânica**, v. 63, n. 1, p. 145-157, 2008.
- CHEN, G.; REN, L.; ZHANG, J.; REED, B. M.; ZHANG, D.; SHEN, X. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, p. 38-47, 2015.
- CHEW, Y.L.; CHAN, E.W.L.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, v. 116, p.13-18, 2009.
- CHIAVAROLI, A.; DI SIMONE, S. C.; SINAN, K. I.; CIFERRI, M. C.; FLORES, G. A.; ZENGİN, G.; ETIENNE, O. K.; AK, G.; MAHOMOODALLY, M. F.; JUGREET, S.; CZIÁKY, Z.; JEKÒ, J.; RECINELLA, L.; BRUNETTI, L.; LEONE, S.; ANGELINI, P.; VENANZONI, R.; MENGHINI, L.; FERRANTE, C.; ORLANDO, G. Pharmacological Properties and Chemical Profiles of *Passiflora foetida* L. Extracts: Novel Insights for Pharmaceuticals and Nutraceuticals. **Processes**, v. 8, n.1034, p. 1-23, 2020.
- CHUA, S.P.; NORMAH, M.N. Effect of preculture, PVS2 and Vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan-akeshoot* tips after cryopreservation by vitrification. **CryoLetters**, v. 32, n. 6, p. 506-515, 2011.
- COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C.B.B.; SCHUMACHER, N.S.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata*, Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v.18, p. 106-115, 2014.
- CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 6, p. 668-695, 2015.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. Review. **Resources**, v. 2, p. 73-95, 2013.
- CRUZ, T.V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 875-879, 2008.
- DANOVA, K.; NIKOLOVA-DAMIANOVA, B.; DENEV, R.; MARKOVSKA, Y. Impact of pre-culture on short- and long-term *in vitro* recovery of the biosynthetic potential and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense of *Hypericum rumeliacum* Boiss. after cryostorage. **Plant Growth Regulation**, v. 68, p. 447-457, 2012.
- DAVIES, K.M.; DEROLLES, S.C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Current Opinions on Biotechnology**, v. 26, p. 133-140, 2014.
- DEL RÍO, L.A.; CORPAS, F.J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; PALMA J.M. (2018) Plant Superoxide Dismutases: Function Under Abiotic Stress Conditions. In: Gupta D., Palma J., Corpas F. (eds) Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer, Cham. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_1 pp 1-26 2017
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

- DEWICK, P. M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. **John Wiley & Sons**, 507p, 2002.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1–23, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.
- ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odoratum* using aluminium cryo-plates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.51, p. 185-191, 2015.
- ESCOBAR, L. K. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 76, p. 877-885, 1989.
- ESPINOSA- LEAL, C. A.; PUENTE- GARZA, C. A.; GARCÍA- LARA, S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, p. 1–18, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p. 197-203, 1989.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. **CryoLetters**, v. 11, p. 413-426, 1990.
- FALCÃO, E. **Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 2011. 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.; COSTA, A. M. JESUS, O. N. de; MACHADO, C. de F. Maracujá. In: BURLE, M. L.; FALEIRO, F. G. (ed). **Maracujá: Passiflora spp.** Argentina: IICA; PROCISUR, 31 p., 2017.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, TG.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 2: (e-155), 2019.
- FANG, J. Y.; WETTEN, A.; JOHNSTON, J. Headspace volatile markers for sensitivity of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos to cryopreservation. **Plant Cell Report**, v. 27, p. 453-461, 2008.
- FARIA, A.; LUZ, P. B.; SOBRINO, S. P.; MEDEIROS, C. M.; TAVARES, A. R.; SOARES, F. S. Efficacy of passion fruit cryopreservation using cryoprotectant agents. **International Journal of Fruit Science**, 2020. DOI: 10.1080/15538362.2020.1753139
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA 6ª ed. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução da diretoria colegiada RDC nº 298, de 12 de agosto de 2019. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeia-brasileira> > Acesso: janeiro de 2020
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003.

FLORA DO BRASIL. *Passiflora* (Flora do Brasil 2020 em construção). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 03 de setembro de 2018.

FOLGADO, R.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; SWENNEN, R.; HAUSMAN, J. F.; PANIS, B. Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation. **Journal of Proteomics**, v. 98, p. 99 – 111, 2014.

FONSECA, K. G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BARTH, M.; FELDBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.10, p.849-860, 2017.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002.

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, PAGINAS, 2007.

FULDA, S.; EFFERTH, T. Selected secondary plant metabolites for cancer therapy. **Modern Research on Chinese Materia Medica**, v. 1, n. 1, p. 24-28, 2014.

FUNNEKOTTER, B.; KACZMARCZYK, A.; TURNER, S. R.; BUNN, E.; ZHOU, W.; SMITH, S.; FLEMATTI, G.; MANCERA, R. L. Acclimation-induced changes in cell membrane composition and influence on cryotolerance of *in vitro* shoots of native plant species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.114, p. 83–96, 2013.

FUNNEKOTTER, B.; MANCERA, R. L.; BUNN, E. Advances in understanding the fundamental aspects required for successful cryopreservation of Australian flora. **In Vitro Cellular & Developmental Biology —Plant**, v. 53, p. 289–298, 2017.

GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; FALCAO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 47-54, 2011a.

GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; VIANNA, M. G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L. – slow growth storage and cryopreservation. **Cryo Letters**, v. 32, n. 5, p. 377-882, 2011b.

GARDNER, D. E. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to Banana Poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. **Plant Disease**, v. 73, p. 476-478, 1989.

GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bio Essays**, v. 28, p. 1091–1101, 2006.

GEORGIEVA, E.; PETROVA, D.; YORDANOVA, Z.; KAPCHINA-TOTEVA, V. CELLAROVA, E.; CHANEVA, G. Influence of cryopreservation on the antioxidative activity of *in vitro* cultivated *Hypericum* species. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, p. 863-870, 2014.

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

- GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D. K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 204-12, 2013.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 48, p. 909 – 930, 2010.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 1-13, 2008.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; LAZARO-VALLEJO, C. E.; ENGELMANN, F.; GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ, O.; CAMPO, Y. M.; PASTELIN-SOLANO, M. C.; DIAZ-RAMOS, C. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* ‘Andrews’). **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 45, p. 574–582, 2009.
- GONZALEZ-ARNAO, M. T.; GUERRERO-RANGEL, A.; MARTINEZ, O.; VALDÉS-RODRÍGUEZ, S. Protein changes in the shoot-tips of vanilla (*Vanilla planifolia*) in response to osmoprotective treatments. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p.331 - 341, 2018.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; AVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seed post-cryopreservation. **CryoLetters**, v. 30, p. 142-147, 2009.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; KREMER, C.; IBÁÑEZ, M. A.; MARTÍN, C. Effect of antioxidants on the genetic stability of cryopreserved mint shoot tips by encapsulation–dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, p. 359–368, 2016.
- GOSMANN, G.; PROVENSI, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.
- HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacological**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.
- HARB, T.B; TORRES, P.B.; PIRES, J.S.; DOS SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 978-85-85658-63-2, 2016.
- HARDING, K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. **CryoLetters**, v. 25, p. 3-22, 2004.
- HARDING, K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 31-38, 1994.
- HARDING, K.; JOHNSTON, J. W.; BENSON, E. E. Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated *in vitro* crop plant germplasm. **Agricultural and Food Science**, v.18, p. 103-116, 2009.
- 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.

- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments - A review. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456–1466, 2012.
- HE, X.; LUAN, F.; YANG, Y.; WANG, Z.; ZHAO, Z.; FANG, J.; WANG, M.; ZUO, M.; LI, Y. *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n.617, p. 1-16, 2020.
- HEALTH, R. L.; PAKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.
- HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, p. 604-611, 1999.
- HOLLAND, K.W.; BALOTA, M.; EIGEL, W.N.; MALLIKARJUNAN, P.; TANKO, J.M.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. ORAChromatography and total phenolics content of peanut root extracts. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. 380-384, 2011.
- HUANG, B.; ZHANG, J. M.; CHEN, X. L.; XIN, X.; YIN, G. K.; HE, J. J.; LU, X. X. ZHOU, Y. C. Oxidative damage and antioxidative indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification–cryopreservation procedure. <<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2315-4>>
- HUGHES, Z. E.; MANCERA, R. L. Molecular Mechanism of the Synergistic Effects of Vitrification Solutions on the Stability of Phospholipid Bilayers. **Biophysical Journal**, v. 106, p. 2617–2624, 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal de Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, 2019.
- IMAHORI, Y. (2014) Role of Ascorbate Peroxidase in Postharvest Treatments of Horticultural Crops. In: P. Ahmad (Ed): Oxidative Damage to Plants, pp 425-450, 2014 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00014-9>
- JAN, N.; HUSSAIN, M.; ANDRABI, K. I. Cold resistance in plants: A mystery unresolved. **ElectronicJournalofBiotechnology**, v.12, n. 3, 2009.
- JESUS, O. N.; MACHADO, C. F.; JUNGHANS, T. G.; OLIVEIRA, E. J.; GIRARDI, E. A.; FALEIRO, F. G.; ROSA, R. C. C.; SOARES, T. L.; LIMA, L. K. S.; SANTOS, I. S.; SAMPAIO, S. R.; AGUIAR, F. S.; GONÇALVES, Z. S. Recursos Genéticos de *Passiflora* na Embrapa: pré-melhoramento e melhoramento genético In: MOREIRA et al., (Ed). **Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico**. Brasília, DF: ProImpress, 233 p., 2018.
- JIA, M. X.; JIANG, X. R.; XU, J.; DI, W.; SHI, Y.; LIU, Y. CAT and MDH improve the germination and alleviate the oxidative stress of cryopreserved *Paeonia* and *Magnolia* pollen. **Acta PhysiologiaePlantarum**, v. 40, n. 37, 2018.
- JOHNSTON, J. W.; HARDING, K.; BENSON, E. E. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. **Plant Science**, v. 172, p. 524–534, 2007a.
- JOHNSTON, J. W., HORNE, S., HARDING, K.; BENSON, E. E. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Plant PhysiologyandBiochemistry**, v. 45, p. 108-112, 2007b.

- JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Empresa Brasileira de Agropecuária – EMBRAPA. **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF:Embrapa Cerrados, 670 p., 2005.
- KACZMARCZYK, A.; FUNNEKOTTER, B.; MENON, A.; PHANG, P. Y.; AL-HANBALI, A.; BUNN, E.; MANCERA, R. L. (2012). **Current Issues in Plant Cryopreservation, Current Frontiers in Cryobiology**, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/currentfrontiers-in-cryobiology/current-issues-in-plant-cryopreservation>>. Acesso em: junho de 2014.
- KESSLER, A.; KALSKE, A. Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115–38, 2018.
- KIDØY, L.; NYGA' A. M.; ANDERSEN, Ø. M.; PEDERSEN, A. T.; AKSNES, D. W.; KIREMIRE, B. T. Anthocyanins in Fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 10, p. 49-54, 1997.
- KILLIP, E. P. 1938. The American Species of Passifloraceae. **Publication of Field Museum of Natural History, Botanical Series**, v. 19, p. 1-613, 1938.
- KIM, H. H.; LEE, Y. G.; SHIN, D. J.; KO, H. C.; GWAG, J. G.; CHO, E. G.; ENGELMANN, F. Development of alternative plant vitrification solution in droplet-vitrification procedures. **CryoLetters**, v. 30, n. 5, p. 320-334, 2009.
- KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n.2, p. 119-126, 1997.
- KROSNICK, S. E.; FORD, A. J.; FREUDENSTEIN, J. V. Taxonomic Revision of *Passiflora* Subgenus *Tetrapathea* Including the Monotypic Genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a New Species of *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 34, n. 2, p. 375-385, 2009.
- KROSNICK, S. E.; PORTER-UTLEY, K. E.; MACDOUGAL, J. M.; JØRGENSEN, P. M.; MCDADE, L. A. New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, n.3, p. 692-713, 2013.
- KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88-107, 2014.
- KUNDU, S.; SALMA, U.; GANTAIT, S. (2018) Cryopreservation of Medicinal Herbs: major breakthroughs, hurdles and future. In: Kumar N. (ed) Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants. Springer, Singapore. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0535-1_16> Acesso em: setembro 2020.
- KWAK, J. M.; NGUYEN, V.; SHROEDER, J. I. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. **Plant Physiology**, v. 141, p. 323-329, 2006.
- LANGIS, R. B.; SCHNEIBEL, B. S. P.; EARLE, E. D.; STEPONKUS, P. L. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. **CryoLetters**, v. 10, p. 421-428, 1989.
- LUGATO, D.; SIMÃO, M. J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* material of *Passiflora alata* Curtis. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 339-346, 2014.

- LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some hardy raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.
- LYNCH, P. T.; SIDDIK, A.; JOHNSTON, J. W.; TRIGWELLA, S. M.; MEHRA, A. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. **Plant Science**, v. 181, p. 47-56, 2011.
- MARCO-MEDINA, A.; CASAS, J. L. RAPD and phytochemical analysis OF *Thymus moroderi* plantlets after cryopreservation. **CryoLetters**, v. 34, n. 2, p. 119-127, 2013.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and quantification of flavonoids. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R., Eds. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press-Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2006. p. 1-36.
- MARTINEZ-MONTERO M.E., HARDING K. (2015) Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation. In: Barh D., Khan M., Davies E. (eds) *Plant Omics: The Omics of Plant Science*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2172-2_23
- MATSUMOTO T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, p. 13-20, 2017.
- MATSUMOTO, T.; TANAKA, D.; YOSHIMATSU, K.; KAWANO, N.; KAWAHARA, N.; MAKI, S.; YAMAMOTO, S.; NIINO, T. Application of cryobanking for *Platycodon grandiflorum* in vitro axillary buds using cryo-plate methods. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10119-3>
- MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of vitrification method. In: NIINO, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, S.I.; MAKI, S.; TANAKA, D.; ENGELMANN, F. *Manual of Cryopreservation Methods Using Cryo-Plate*. Impresso, Jalisco. 175p, 2017.
- 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.
- MELETTI, L. M. M. Maracujá-Roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 194-348, 2005.
- MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 6, n. 1-2, p. 13-20, 2007.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Volume Especial, E. 083-091, 2011.
- MERHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation and assessment of genetic stability and ISSR of *Passiflora pohlii*. **Cryoletters**, v. 35, n. 3, p. 204-215, 2014.
- MIKOVSKI, A. I.; SILVA, N. T.; SOUZA, C. S.; MACHADO, M. D.; OTONI, W. C.; CARVALHO, I. F.; ROCHA, D. I.; SILVA, M. L. Tissue culture and biotechnological techniques applied to passion fruit with ornamental potential: an overview. **Ornamental Horticulture**, v. 25, n. 2, p. 189-199, 2019.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405 - 410, 2002.

- MIURA, K.; FURUMOTO, T. Cold signaling and cold response in plants. **International Journal Molecular Sciences**, v.14, p. 5312-5337, 2013.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p.459-81, 2007.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **ScientiaAgricola**, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000a.
- 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, 2000b.
- MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NADARAJAN, J.; PRITCHARD, H. W. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. **Plos one**, v. 9, n.5 e96169, 2014.
- 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.
- NIINO, T.; YAMAMOTO, S. I.; FUKUI, K.; CASTILLO MARTÍNEZ, C. R.; VALLE ARIZAGA, M. V.; MATSUMOTO, T.; ENGELMANN, F. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. **CryoLetters**, v. 34, n. 6, p. 549-560, 2013.
- NISHISZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.
- OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v. 43, n. 246, p. 157-164, 1996.
- OZAROWSKI, M.; PIASECKA, A.; PASZEL-JAWORSKA, A.; CHAVES, D. S. A.; ROMANIUK, A.; RYBCZYNSKA, M.; Gryszczynska, A.; Sawikowska, A.; Kachlicki, P.; Mikolajczak, P. L.; Seremak-Mrozikiewicz, A.; Klejewski, A.; Thiem, B. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and *in vitro* cytotoxic potential on leukemia cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 2, p. 179-191, 2018.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**. v. 168, p. 45-55, 2005.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**. Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005. Disponível: <www.fao.org/doc/panis.pdf>. Acesso em: abril de 2015.

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

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Empresa Brasileira de Agropecuária – (EMBRAPA). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 670 p., 2005.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Retrieval of Spermatozoa After Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. **Nature**, v. 164, n. 949, p. 666-667, 1949.

POPOVA, E. V.; PAEK K.Y.; KIM, H. H. (2011) Cryopreservation of medicinal plants: the case of *in vitro* cultures. In: Kumar A, Roy S (eds) Plant tissue culture and applied plant biotechnology. Pointer publishers, Jaipur, p. 153–196.

PORTER-UTLEY, K. A revision of *Passiflora* L. subgenus *Decaloba* (DC.) Rchb. supersection *Cieca* (Medik.) J. M. MacDougal & Feuillet (Passifloraceae). **PhytoKeys**, v. 43, p. 1-224, 2014.

Progress and Applications. Rome: **JIRCAS, Tsukuba/IPGRI**, p. 1–7, 2000.

PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R.; DOMICIANO, D.; SOUZA, L. B.; CARPENTIER, S.; SWENNEN, R.; SILVA, L. C.; NERY, F. C.; MÁXIMO, W. P. F.; PANIS, B. The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, p. 71–82, 2019

PRUDENTE, D. O.; PAIVA, R.; NERY, F. C.; PAIVA, P. D. O.; ALVES, J. D.; MÁXIMO, W. P. F.; SILVA, L. C. Compatible solutes improve regrowth, ameliorate enzymatic antioxidant systems, and reduce lipid peroxidation of cryopreserved *Hancornia speciosa* Gomes lateral buds. **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 53, p. 352–362, 2017.

RAFIQUE, T.; YAMAMOTO, S.; FUKUI, K.; MAHMOOD, Z.; NIINO, T. Cryopreservation of sugarcane using the V-Cryo-plate technique. **CryoLetters**, v. 36, n. 1, p. 51-59, 2015.

RAHMAH, S.; MUBBARAKH, S.A.; PING, K.S.; SUBRAMANINAM, S. Effects of Droplet-Vitrification Cryopreservation Based on Physiological and Antioxidant Enzyme Activities of *Brassidium* Shooting Star Orchid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p 1-10, 2015.

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.

REINHOUD, P. J.; VAN IREN, F.; KIJNE, J. W. **Cryopreservation of undifferentiated plant cells** (2000) In: Engelmann F, Takagi H (eds.). Cryopreservation of tropical plant germplasm Current research progress and applications. IPGRI, Rome, pp 91-102.

REN, L.; ZHANG, D.; JIANG, X.; GAI, Y.; WANG, W.; REED, B. M.; SHEN, X.; Peroxidation due to cryoprotectant treatment is a vital factor for cell survival in *Arabidopsis* cryopreservation. **Plant Science**, v. 212, p. 37- 47, 2013.

- REN, L.; ZHANG, D.; CHEN, G.; REED, B. M.; SHEN, X.; CHEN, H. Transcriptomic profiling revealed the regulatory mechanism of *Arabidopsis* seedlings response to oxidative stress from cryopreservation. **Plant Cell Report**, v. 34, p. 2161–2178, 2015.
- REN, R., JIANG, X.; DI, W.; LI, Z.; LI, B.; XU, J.; LIU, Y. HSP70 improves the viability of cryopreserved *Paeonia lactiflorapollen* by regulating oxidative stress and apoptosis- like programmed cell death events. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 139, n. 1, p. 53–64, 2019.
- RIHAN, H. Z.; AL-ISSAWI, M; FULLER, M. P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p.143-157, 2017.
- ROSA, Y. B. C. J.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology —Plant**, v.52, p. 64–71, 2016.
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. *In*: ENGELMANN, F.;
- SAKAI, A. Survival of plant tissue at super-low temperatures III.Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness.**Plant Physiology**, v. 40, p. 882-887, 1965.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucelar cells of navel Orange (*Citrus sinensis*Os. var brasiliensis Tanaka) by vitrification.**Plant Cell Report**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.
- 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.
- ŞEN, A. Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. El-Missiry, M. A.(Ed.) **Antioxidant Enzyme**, p. 59 - 88, (2012)., ISBN: 978-953-51-0789-7 DOI: 10.5772/48292. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/oxidative-stress-studies-in-plant-tissue-culture>>. Acesso em: agosto de 2018
- SERSHEN VARGHESE, B.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Cryo-tolerance of zygotic embryos from recalcitrant seeds in relation to oxidative stress-A case study on two amaryllid species. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 999– 1011, 2012.
- 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: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>>. Acesso em: janeiro de 2015.
- SIMÃO, M.J.; FONSECA, E.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Effects of auxins and diferente culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 419-430, 2016.
- SIMÃO, M. J.; BARBOZA, T.J.S.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; IGNACIO, C.P.R.I; PACHECO, G. A comparative study of phytoconstituents and

antibacterial activity of *in vitro* derived materials of four *Passiflora* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. AHEAD, 2018a.

SIMÃO, M. J.; COLLIN, M.; GARCIA, R. O.; MANSUR, E.; PACHECO, G.; ENGELMANN, F. Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique. **Protoplasma**, v. 255, n. 3, p. 741-750, 2018b.

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, S.; TRIPATHI, K. D.; CHAUHAN, D. K.; DUBEY, N. K. Glutathione and phytochelatins mediated redox homeostasis and stress signal transduction in plants: an integrated overview (In) Plant Metal Interaction Emerging Remediation Techniques 2016, Pages 285-310

SKYBA, M.; URBANOVÁ, M.; KAPCHINA-TOTEVA, V.; ČELLÁROVÁ, E. Physiological, biochemical and molecular characteristics of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. shoot tips. **CryoLetters**, v. 31, n. 3, p. 249-260, 2010.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. **Piracicaba**. Esalq/USP. 179p. 1997.

SPENCER, K. C.; SEGLER, D. S. Passisuberosin and depipassisuberosin: two cyclopentenoid cyanogenic glycosides from *Passiflora suberosa*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1665-1667, 1987.

STEPONKUS, P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 543-584, 1984.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 19-38, 2004.

SUDASINGHE, H.P.; PEIRIS, D. C. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. DOI 10.7717/peerj.4389.

SUZUKI, M.; TANDON, P.; ISHIKAWA, M.; TOYOMASU, T. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 123-131, 2008.

SYLVESTRE-ENGELMANN, I.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Clinopodium odoratum* using aluminium cryo-plates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 51, p. 185-191, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAYLOR, M. J.; SONG Y.C.; BROCKBANK, K. G. M. Vitrification in tissue preservation: New developments (2004). In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds) **Life in the Frozen State**. New York: CRC Press, London, p. 603-644, 2004.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Quantitative analysis of all types of β -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 5, p. 247-253, 1999.

UCHENDU, E. E.; MUMINOVA, M.; GUPTA, S.; REED B. M. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 46, p. 386-393, 2010a.

- UCHENDU, E. E.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G.; REED, B. M. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Report**, v. 29, p. 25-35, 2010b.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora passionflowers of the world**. Timber Press, Portland Timber Press, p. 430, 2004.
- URAGAMI, A., SAKAI, A.; NAGAI, M. 1990. Cryopreservation of dried axially buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 328-321, 1990.
- VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.
- VANDERPLANK, J. A revision of *Passiflora* SECTION DYSOSMIA Passifloraceae. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 30, n. 4, p. 318-387, 2013.
- VEIGA-BARBOSA, L., MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; SOUZA, M. M.; MELETTI, L. M. M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science & Technology**, v. 41, 89-97, 2013.
- VIANNA, Marcela Gomes. Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em **crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- VOLK, G.M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, p. 48-61, 2006.
- VRANOVÁ, E.; VAN BREUSEGEM, I. D. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227–1236, 2002
- VUJOVIC, T.; CHATELET, P.; RUZIC, Đ.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *Prunus* spp. using aluminium cryo-plates. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 173–182, 2015.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 2001. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. **Springer**. 2^a ed.
- 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, R.; GAO, X.; CHEN, L.; HUO, L.; LI, M.; WANG, Q. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. **Scientia Horticulturae**, v. 176, p. 330-339, 2014.
- WANG, M. R.; LAMBARDI, M.; ENGELMANN, F.; PATHIRANA, R.; PANIS, B.; VOLK, G. M.; WANG, Q. C. Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2020.
- WANG, Z. C.; DENG, X. X. Cryopreservation of shoot-tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. **CryoLetters**, v. 25, p. 43-50, 2004.
- WASICKY, A.; HERNANDES, L.S.; VETORE-NETO, A.; MORENO, P.R.H.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M.; YOSHIDA, M. Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25(4), p. 407-412, 2015.

- WATANABE, F.; HASHIZUME, E.; CHAN, G. P.; KAMIMURA, A. Skin-whitening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: a double blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 267-74, 2014
- WEN, B.; WANG, R.; CHENG, H.; SONG, S. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 239, p. 57-67, 2010.
- WEN, B.; CAI, C.; WANG, R.; SONG, S.; SONG, J. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, p. 323-335, 2012.
- XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Review. **Plant Cell and Environment**, v. 23, p. 893-902, 2000.
- XU, J.; LIU, Q.; JIA, M.; LIU, Y.; LI, B.; SHI, Y. Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium×siberia* pollen viability. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, p. 369 – 375, 2014.
- YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W. S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **CryoLetters**, v. 32, v. 3, p. 256-265, 2011.
- YAMAMOTO, S.; FUNIAK, K.; RAFIQUE, T.; KHAN, N. I.; CASTILHO MARTINEZ, C. R.; SEKIZAWA, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminum cryoplates. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2012.
- YAMAMOTO, S.; WUNNA; RAFIQUE, T.; ARIZAGA, M. V.; FUKUI, K.; GUTIERREZ, E. J. C.; MARTINEZ, C. R. C.; WATANABE, K.; NIINO, T. The Aluminum Cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips. **American Journal of Potato Research**, v. 92, p. 250-257, 2015.
- YOCKTENG, R.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; SOUZA-CHIES, T. T. **Passiflora**. In: C. KOLE (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits*, p. 129-171. DOI 10.1007/978-3-642-20447-0_7, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. FourCycloartaneTriterpenoids and SixRelatedSaponinsfrom*Passifloraedulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000.
- ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. M. A.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.
- ZERAIK; M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.
- ZHANG, D.; REN, L.; CHEN, G.; ZHANG, J.; REED, B. M.; SHEN, X. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. **Plant Cell Report**, v. 34, p. 1499-1513, 2015.
- ZHANG, X.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; NIU, M.; LI, M.; HE, C.; ZHAO, J.; ZENG, S.; DUAN, J.; MA, G. Physiological and transcriptomic analyses reveal a response mechanism to cold stress in *Santalum album* L. leaves. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42165, p. 1-18, 2018 | DOI: 10.1038/srep42165

ZHANG, H.; YANG, Y; ZHOU, Z. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 256-263, 2018.

ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from south american *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 232-329, 2012.