



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

Mariela Justiniano Simão

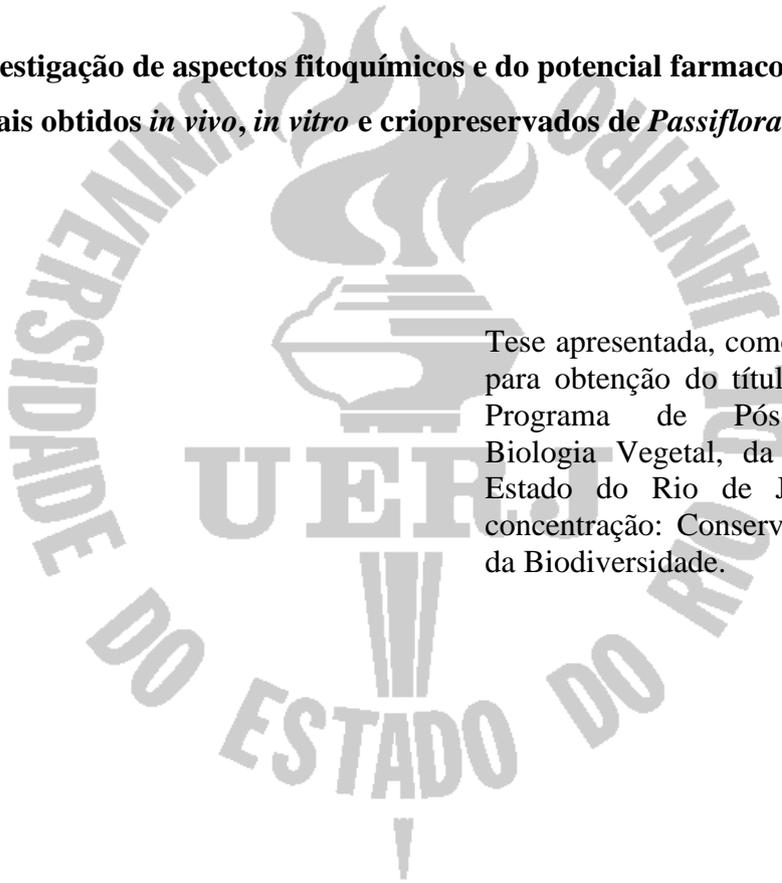
**Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico
de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados
de *Passiflora pohlii* Mast.**

Rio de Janeiro

2019

Mariela Justiniano Simão

**Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico
de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast.**



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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Coorientadora: Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira

Rio de Janeiro

2019

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

S588 Simão, Mariela Justiniano.
Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast / Mariela Justiniano Simão. – 2019.
123 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 - Propagação *in vitro* - Teses. 3. Maracujá - Uso terapêutico - Teses. 4. Química vegetal - Teses. 5. Criopreservação - 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

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

Assinatura

Data

Mariela Justiniano Simão

**Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico
de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast.**

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

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof.^a Dra. Nina Claudia Barboza da Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Maria Carolina Anholeti da Silva Virginio
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Celso Salgueiro Lage
Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI

Rio de Janeiro

2019

Aos meus pais,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais pelo eterno apoio e amor, sem os quais não conseguiria chegar até aqui.

À minha tia Zezé, por ter me abrigado com todo o carinho durante esses anos.

À Profa. Dra. Georgia Pacheco, pela orientação, disponibilidade, incentivo, apoio e acima de tudo, por ser um porto seguro e uma grande amiga, sempre presente nos momentos mais difíceis. Obrigada por ter acreditado em mim e me ajudado a ser melhor.

À Profa. Dra. Elisabeth Mansur, a quem sou eternamente grata pela oportunidade de conhecer e trabalhar no Labmit, pela co-orientação. Obrigada pela confiança, pelos conselhos e pelas discussões enriquecedoras.

À Renatinha, pelas conversas e risadas no laboratório e também pela enorme boa vontade em sempre ajudar e aconselhar, tanto profissionalmente como na vida pessoal.

Ao prof. Dr. Davyson Moreira e ao Dr. Marco Rocha, pela colaboração, conselhos, discussões e direcionamentos para as análises fitoquímicas deste trabalho.

À profa. Dra. Ana Claudia Rosa, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, e ao Dr. Thiago Barboza, pela colaboração nos estudos de atividade antibacteriana.

Je remercie Dr. Florent Engelmann de les précieux enseignements, les discussions et le soutien pendant mon séjour à Montpellier.

Je remercie aussi Myriam Collin de l'amitié, l'aide et les enseignements sur les analyses histologiques.

À Marcela Vianna, pela amizade, por toda a ajuda, conselhos sobre trabalho e vida, artigos trocados, discussões sobre criopreservação e por ter sido meu braço direito e esquerdo durante esses quatro anos.

À Isabela Sousa-Machado, minha afilhada, pela amizade e companhia nos altos e baixos ao longo desses seis anos de pós-graduação.

Aos amigos do LABMIT, em especial Tielen, Ana Carolina, Amanda, Isabela Batista, Igor, Vitória, Jamine, Raphaela, Gilson e Teresa, por toda a ajuda, amizade, apoio e risadas no laboratório.

À toda equipe do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, pela ajuda nos experimentos e pelo convívio tão agradável durante todos esses anos.

Aos meus grandes amigos espalhados por todo o Brasil, que mesmo distantes, sempre estiveram do meu lado me dando força e coragem para seguir em frente.

À secretaria do PGBV, pela boa vontade com que sempre me atenderam.

À Excelentíssima Presidenta Dilma Rousseff, pela implementação do programa Ciências Sem Fronteiras, que me permitiu realizar um sonho e adquirir novos conhecimentos e experiências que jamais imaginei que viveria.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que
a liberdade seja nossa própria substância

Simone de Beauvoir

RESUMO

SIMÃO, Mariela Justiniano. **Investigação de aspectos fitoquímicos e do potencial farmacológico de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast.** 2019. 123f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Passiflora pohlii Mast. é uma espécie nativa do Brasil que apresenta características de interesse agrônomo, principalmente em relação à tolerância a patógenos do solo que provocam grandes prejuízos à cultura de maracujá. Embora existam poucos trabalhos sobre esta espécie, estudos biotecnológicos recentes resultaram no desenvolvimento de sistemas para a produção *in vitro* de plantas e de cultura de raízes adventícias. Além disso, o perfil fitoquímico e potencial antioxidante de diferentes materiais *in vitro* foi comparado com o de plantas mantidas em condições naturais, sendo observada a presença de flavonoides em extratos de folhas, e de saponinas, com alta atividade antioxidante, em extratos de raízes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o aprofundamento dos estudos já realizados, com o estabelecimento de novos sistemas de cultura e de criopreservação para *P. pohlii*, com a investigação de aspectos fitoquímicos e histológicos, e do potencial farmacológico de materiais obtidos *in vivo* e produzidos e conservados *in vitro*. Para isso, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear foi utilizada visando à elucidação estrutural dos flavonoides presentes nos extratos de folhas da espécie estudada. Foram identificados dois isômeros, denominados iso-spinosina, a substância majoritária, e spinosina. Posteriormente, segmentos foliares foram excisados de plantas propagadas *in vitro* e cultivados na presença de auxinas e elevadas concentrações de sacarose visando ao estabelecimento de culturas de calos para a produção em larga escala de substâncias bioativas. Apesar da indução de calos friáveis ter ocorrido em resposta a ANA e PIC, calos obtidos na presença de PIC a 20,7 μM e sacarose a 0,3 ou 0,5 M apresentaram intensa proliferação celular e a produção de substâncias fenólicas com potencial antioxidante. No entanto, não foi observada a produção dos flavonoides nestes materiais. Considerando a recente descrição da presença de saponinas em extratos de raízes de *P. pohlii*, foi também estabelecida uma metodologia para a criopreservação de ápices radiculares de plantas *in vitro* pela técnica de V-Crioplaca, utilizando PVS2 como solução crioprotetora. Foi obtida uma alta taxa de recuperação, indicando a eficiência da metodologia para o armazenamento em longo prazo desses materiais biotecnológicos. Análises histológicas realizadas durante as diferentes etapas do protocolo evidenciaram danos estruturais nos materiais criopreservados, incluindo altas taxas de plasmólise, os quais foram revertidos após transferência para meio de recuperação. Não foram observadas alterações na capacidade biossintética das raízes criopreservadas, quando comparadas aos materiais não-criopreservados. O potencial antibacteriano de folhas e raízes de plantas *in vitro* de *P. pohlii* também foi investigado e comparado com os de outras espécies do gênero. No entanto, extratos de *P. pohlii* promoveram um aumento no crescimento das cepas bacterianas testadas, ao contrário do observado nos materiais das outras espécies, principalmente daquelas pertencentes ao subgênero *Passiflora*, o que sugere uma influência genotípica na produção de substâncias com ação antibacteriana. As estratégias biotecnológicas descritas neste trabalho foram aplicadas com sucesso para a produção e a conservação *in vitro* de substâncias fenólicas com ação antioxidante de *P. pohlii*. Além disso, a identificação dos flavonoides presentes em extratos de folhas foi realizada pela primeira vez para a espécie.

Palavras-chave: Maracujá. Calogênese. Cromatografia. Criopreservação. Flavonoides. Saponinas.

ABSTRACT

SIMÃO, Mariela Justiniano. **Investigation of phytochemical aspects and pharmacological potential of *in vivo*, *in vitro* and cryopreserved materials of *Passiflora pohlii* Mast.** 2019. 123f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Passiflora pohlii Mast. is a native species of Brazil that presents characteristics of agronomic interest, especially regarding to the tolerance to soil pathogens that cause great damage to passion fruit culture. Although there are few studies on this species, recent biotechnological studies have resulted in the development of systems for *in vitro* plant production and adventitious root culture. In addition, the phytochemical profile and antioxidant potential of different *in vitro* materials were compared with plants kept under natural conditions, with the presence of flavonoids in leaf extracts and saponins with high antioxidant activity in root extracts. Thus, the aim of this work was to provide further studies with the establishment of new culture and cryopreservation systems for *P. pohlii*, with the investigation of phytochemical and histological aspects, and the pharmacological potential of materials obtained *in vivo* and produced and preserved *in vitro*. For this, the technique of Nuclear Magnetic Resonance was used for the structural elucidation of the flavonoids present in the leaf extracts of the studied species. Two isomers, called iso-spinosyn, the major compound, and spinosyn were identified. Subsequently, leaf segments were excised from *in vitro*-propagated and cultivated in the presence of auxins and high concentrations of sucrose, aiming at the establishment of callus cultures for the large scale production of bioactive compounds. Although the induction of friable calli had occurred in response to NAA and PIC, callus obtained in the presence of PIC at 20.7 μM and sucrose at 0.3 or 0.5 M showed intense cellular proliferation and the production of phenolic substances with antioxidant potential. However, the production of flavonoids in these materials was not observed. Considering the recent description of the presence of saponins in *P. pohlii* root extracts, a methodology was also established for the cryopreservation of root apices of *in vitro* plants with the V-Cryoplate technique, using PVS2 as a cryoprotectant solution. A high recovery rate was obtained indicating the efficiency of the methodology for the long-term storage of these biotechnological materials. Histological analyzes performed during the different stages of the protocol showed structural damages in the cryopreserved materials, including high plasmolysis rates, which were reverted after transfer to recovery medium. No changes were observed in biosynthetic capacity of cryopreserved roots when compared to non-cryopreserved materials. The antibacterial potential of leaves and roots of *in vitro* plants of *P. pohlii* was also investigated and compared with those of other species of the genus. However, extracts of *P. pohlii* promoted an increase in the growth of the tested bacterial strains, unlike that observed in the materials of other species, especially those belonging to the *Passiflora* subgenus, which suggests a genotypic influence in the production of substances with antibacterial activity. The biotechnological strategies described in this work were successfully applied to the production and *in vitro* conservation of phenolic compounds with antioxidant activity of *P. pohlii*. In addition, the identification of the flavonoids present in leaf extracts was achieved for the first time for this species.

Keywords: Passionfruit. Callogenesis. Cromatography, Criopreservation, Flavonoids, Saponins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição geográfica de <i>Passiflora pohlii</i> Mast.....	30
Figura 2 –	<i>Passiflora pohlii</i> Mast.....	31
Figura 3 –	Via biossintética de flavonoides em células vegetais.....	35
Figura 4 –	Estrutura básica dos subgrupos de flavonoides.....	36
Figura 5 –	Flavonoides C-glicosilados encontrados em espécies de <i>Passiflora</i>	37
Figura 6 –	Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD da fração metanólica do extrato de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas em condições naturais, com detecção em UV _{340nm}	42
Figura 7 –	Flavonoides encontrados nos extratos de folhas de <i>Passiflora pohlii</i> Mast.	45
Figura 8 –	Reação de redução do radical livre DPPH.....	50
Figura 9 –	Curva padrão de ácido gálico.....	55
Figura 10 –	Formação de calos friáveis e raízes adventícias a partir de segmentos foliares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> e cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA ou PIC, por 60 dias, na presença de luz.....	58
Figura 11 –	Biomassa (g) de calos friáveis derivados de segmentos foliares de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA e PIC, por 60 dias, na presença de luz.....	59
Figura 12 –	Biomassa (g) de calos obtidos a partir de segmentos foliares de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vitro</i> em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 µM, contendo diferentes concentrações de sacarose.....	60
Figura 13 –	Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de calos derivados de segmentos foliares de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 µM, contendo diferentes concentrações de sacarose.....	61
Figura 14 –	Cromatogramas dos extratos de calos derivados de segmentos foliares de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 µM, contendo diferentes concentrações de sacarose.....	62
Figura 15 –	Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de calos friáveis derivados de segmentos foliares de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM	

	suplementado com PIC a 20,7 μ M, contendo diferentes concentrações de sacarose.....	63
Figura 16 –	Relação entre conteúdo de fenóis totais e potencial antioxidante de extratos de calos friáveis derivados de segmentos foliares de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vitro</i> cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μ M, contendo diferentes concentrações de sacarose.....	64
Figura 17 –	Crioplacas desenvolvidas para a criopreservação de explantes radiculares.....	74
Figura 18 –	Segmentos radiculares de <i>P. pohlii</i> criopreservados utilizando o protocolo de V-Crioplaca, após tratamento com PVS2 por 45 minutos e cultivo em meio de recuperação MSM sólido suplementado com AIA a 5,7 μ M, por 30 dias, na ausência de luz.....	78
Figura 19 –	Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> após diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca.....	81
Figura 20 –	Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> após tratamento com PVS3.....	82
Figura 21 –	Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> submetidos às diferentes etapas dos protocolos de criopreservação por V-Crioplaca após 2 e 5 dias de cultura em meio de recuperação (MSM + AIA a 5,7 μ M).....	83
Figura 22 –	Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> submetidos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca, após 7, 15 e 30 dias de cultura em meio de recuperação (MSM + AIA a 5,7 μ M).....	84
Figura 23 –	Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de raízes de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vitro</i> e raízes criopreservadas...	87
Figura 24 –	<i>Passiflora alata</i> Curtis.....	93
Figura 25 –	<i>Passiflora foetida</i> L.....	94
Figura 26 –	<i>Passiflora suberosa</i> L.....	95

Figura 27 – Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em extratos de folhas e raízes excisadas de plantas <i>in vitro</i> de quatro espécies de <i>Passiflora</i>	98
Figura 28 – Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de folhas e raízes excisadas de plantas <i>in vitro</i> de quatro espécies de <i>Passiflora</i>	99

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	Atividades biológicas descritas em espécies do gênero <i>Passiflora</i> nos últimos 15 anos.....	27
Quadro 2 –	Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a análise por CLAE-UV-DAD.....	41
Tabela 1 –	Deslocamentos de RMN 13C (ppm) das substâncias presentes na fração metanólica de extratos de folhas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> e diluídas em DMSO-d6.....	44
Quadro 3 –	Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a análise por CLAE-UV-DAD.....	54
Tabela 2 –	Morfogênese a partir de explantes foliares excisados de plantas mantidas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> e cultivados em meio MSM suplementado com diferentes tipos e concentrações de auxinas.....	57
Quadro 4 –	Principais soluções de vitrificação utilizadas na criopreservação de plantas.....	69
Quadro 5 –	Protocolos de criopreservação desenvolvidos para espécies de <i>Passiflora</i> nos últimos 15 anos.....	73
Tabela 3 –	Sobrevivência e recuperação de segmentos radiculares de <i>P. pohlii</i> criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após 60 dias de cultura em MSM sólido suplementado com AIA a 5,7 µM, na ausência de luz.....	79
Tabela 4 –	Taxas de plasmólise nas células da região do córtex, da endoderme e do periciclo de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. pohlii</i> e submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca	86
Quadro 6 –	Cepas bacterianas utilizadas para a avaliação da atividade antibacteriana de extratos de materiais <i>in vitro</i> das espécies de <i>Passiflora</i>	97

Tabela 5 -	Avaliação da atividade antibacteriana de extratos ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de materiais obtidos <i>in vitro</i> de quatro espécies de <i>Passiflora</i> utilizando o método de macrodiluição.....	100
Tabela 6 -	Avaliação das concentrações inibitória de 50 % do crescimento bacteriano (CI_{50}), inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos de folhas e raízes obtidas de plantas mantidas <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> e <i>P. foetida</i>	101

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – ácido 3-indolacético

AIB – ácido 3-indolbutírico

ANA – ácido α -naftalenoacético

BAP – 6-benzilaminopurina

CBM – Concentração bactericida mínima

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CI50 – Concentração inibitória de 50% do crescimento

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EM – Espectrometria de Massas

ERO – Espécies reativas de oxigênio

MS – Meio de Murashige & Skoog (1962)

MSM – Meio MS modificado por Monteiro et al., 2000b

NP/PEG – Reagente Produtos Naturais/Polietilenoglicol

PF – Peso Fresco

PIC – Picloram

PS – Peso Seco

PVS2 – *Plant Vitriification Solution 2*

PVS3 – *Plant Vitriification Solution 3*

R_F – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

t_R – Tempo de Retenção

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	OBJETIVOS	33
1.1	Objetivos Específicos	33
2	IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>Passiflora pohlii</i> MAST	34
2.1	Material e Métodos	40
2.1.1	<u>Material Vegetal</u>	40
2.1.2	<u>Preparo e purificação de extratos vegetais</u>	40
2.1.3	<u>Análise por CLAE-UV-DAD</u>	40
2.1.4	<u>Análise por RMN</u>	41
2.2	Resultados	42
2.2.1	<u>Análise cromatográfica</u>	42
2.2.2	<u>Análise por RMN</u>	43
2.3	Discussão	45
3	INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS FRIÁVEIS DE <i>Passiflora pohlii</i> MAST	48
3.1	Material e Métodos	51
3.1.1	<u>Material vegetal e condições de cultura</u>	51
3.1.2	<u>Indução de calos a partir de explantes foliares</u>	51
3.1.3	<u>Indução da produção de substâncias bioativas em calos derivados de explantes foliares</u>	52
3.1.4	<u>Análise Fitoquímica</u>	52
3.1.4.1	Preparo de extratos vegetais.....	52
3.1.4.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	52
3.1.4.3	Análise de CLAE-UV-DAD.....	53
3.1.5	<u>Determinação do conteúdo fenólico</u>	54
3.1.6	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	55
3.1.7	<u>Análise estatística</u>	56

3.2	Resultados	56
3.2.1	<u>Indução de calos a partir de explantes foliares</u>	56
3.2.2	<u>Indução da produção de substâncias bioativas em calos derivados de explantes foliares</u>	60
3.2.3	<u>Análise fitoquímica</u>	61
3.2.3.1	Análise por CCD.....	61
3.2.3.2	Análise por CLAE-UV-DAD.....	62
3.2.4	<u>Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante</u>	63
3.3	Discussão	64
4	CRIOPRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOSINTÉTICA DE RAÍZES DE <i>Passiflora pohlii</i> MAST	68
4.1	Material e Métodos	74
4.1.1	<u>Criopreservação de segmentos radiculares utilizando a técnica de V-Crioplaca</u>	74
4.1.2	<u>Caracterização histológica dos segmentos radiculares submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca</u>	75
4.1.3	<u>Preparo de extratos vegetais</u>	76
4.1.4	<u>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u>	76
4.1.5	<u>Análise estatística</u>	77
4.2	Resultados	77
4.2.1	<u>Criopreservação de segmentos radiculares utilizando a técnica de V-Crioplaca</u>	77
4.2.2	<u>Caracterização histológica dos segmentos radiculares submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca</u>	80
4.2.2.1	Análise qualitativa.....	80
4.2.2.2	Análise quantitativa.....	84
4.2.3	<u>Avaliação da capacidade biossintética</u>	87
4.3	Discussão	88
5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE <i>Passiflora pohlii</i> MAST.: COMPARAÇÃO COM ESPÉCIES DOS SUBGÊNEROS <i>DECALOBA</i> E <i>PASSIFLORA</i>	92
5.1	Material e Métodos	95
5.1.1	<u>Preparo de extratos vegetais</u>	95
5.1.2	<u>Cromatografia em Camada Delgada (CDD)</u>	95

5.1.3	<u>Atividade antibacteriana</u>	96
5.2	Resultados	98
5.2.1	<u>Análises cromatográficas</u>	98
5.2.2	<u>Avaliação da atividade antibacteriana</u>	99
5.3	Discussão	101
	CONCLUSÕES	104
	PERSPECTIVAS	105
	REFERÊNCIAS	106

INTRODUÇÃO

Produção e conservação *in vitro* aplicadas a plantas com potencial medicinal

A constante interação das plantas com o seu ambiente resultou em complexos processos bioquímicos durante a evolução, tornando-as importantes fontes de substâncias classificadas como metabólitos secundários ou especiais. Essas substâncias desempenham um papel importante para a sobrevivência das plantas, estando envolvidas diretamente na atração de polinizadores, na defesa contra predadores e doenças, assim como na proteção contra raios UV e perda excessiva de água (DEWICK, 2002; HARTMANN, 2007). Além disso, por serem biologicamente ativas, são também potencialmente úteis como fármacos, agroquímicos, cosméticos, pigmentos, biopesticidas, aditivos alimentares e nutracêuticos (CANTRELL et al., 2012; DAVIES; DEROLE, 2014; FULDA; EFFERTH, 2014; MASSON et al., 2014).

O reconhecimento e a comprovação científica da eficácia terapêutica de muitos desses metabólitos, associados à demanda por terapias com menor risco à saúde humana e o menor custo envolvido nos tratamentos, aumentou significativamente o uso das plantas para fins medicinais nos últimos anos. Contudo, a obtenção de metabólitos secundários utilizando métodos tradicionais de cultivo nem sempre é satisfatória. Fatores externos, como disponibilidade de nutrientes, clima, condições de luz e concentração de gás carbônico atmosférico, assim como a fase de crescimento e desenvolvimento das plantas, podem limitar a produção das substâncias de interesse, elevando o custo para a sua extração (FINE et al., 2006; VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002). Além disso, a coleta indiscriminada das plantas diretamente da natureza, associada à destruição de habitats por ações antrópicas, ameaçam cada vez mais a flora medicinal.

Nesse sentido, a produção de metabólitos *in vitro* por meio de métodos de cultura de tecidos e células vegetais é considerada uma alternativa ao cultivo tradicional, devido à possibilidade de produção constante e em larga escala de material uniforme, sob condições controladas, independente de fatores externos ou fases de crescimento. Adicionalmente, os sistemas *in vitro* permitem a modulação da produção de metabólitos de interesse pelas condições de cultura, e podem ser utilizados para a compreensão das vias biossintéticas.

Os métodos de cultura de tecidos são baseados na totipotência das células vegetais, que são capazes de voltar a um estágio similar ao meristemático e redefinir seus padrões de diferenciação e, assim, dar origem a novos órgãos ou a uma planta completa, em resposta a

estímulos adequados (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). No entanto, apesar de totipotentes, algumas células vegetais podem não ser competentes, ou seja, podem não ter a capacidade de reagir a esses sinais específicos de desenvolvimento.

A produção de plantas *in vitro* ocorre por diferentes vias morfogênicas, incluindo multiplicação de brotos a partir de meristemas pré-existent, embriogênese somática e organogênese (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Tecidos meristemáticos, como os ápices caulinares e radiculares e gemas axilares, são formados por células indiferenciadas em constante processo de divisão, sendo naturalmente competentes para a formação de novos órgãos ou plantas inteiras. Assim, a cultura de tecidos meristemáticos é frequentemente utilizada para a propagação clonal *in vitro* de plantas livres de vírus e também indicada para a conservação de germoplasma, já que envolve menores riscos de surgimento de variação somaclonal, por reproduzir o processo natural de proliferação, sem passar pelos processos de desdiferenciação e rediferenciação (HITMI; BARTHOMEUF; SALLANON, 2000; KATOH et al., 2004).

A embriogênese somática é um processo pelo qual as células somáticas dão origem a embriões, que passam pelos mesmos estádios de desenvolvimento observados na embriogênese zigótica (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). A estrutura bipolar dos embriões somáticos constitui uma vantagem desse sistema, permitindo, em geral, a obtenção de plantas completas sem necessidade de uma etapa de enraizamento (VON ARNOLD, 2008). A embriogênese somática pode ser direta, quando a formação de embriões ocorre diretamente a partir dos tecidos, ou indireta, quando a regeneração é precedida pela formação de calos, que são massas de células com multiplicação desordenada. Embora a grande maioria dos sistemas embriogênicos ocorra pela via indireta, a passagem por uma fase intermediária de calo pode levar a uma maior variabilidade genética entre os clones obtidos (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na organogênese *in vitro*, novos órgãos, como brotos ou raízes adventícias, podem ser formados a partir de tecidos já diferenciados. Dessa forma, a regeneração de plantas via organogênese inclui a desdiferenciação do tecido de origem, a aquisição de novas competências, a determinação da nova via de desenvolvimento e a rediferenciação. Assim como a embriogênese somática, a organogênese pode ocorrer de forma direta ou indireta (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Muitos sistemas *in vitro* utilizados para a síntese de metabólitos secundários baseiam-se no crescimento organizado de tecidos e órgãos, tais como brotos e raízes, uma vez que as culturas organizadas geralmente apresentam perfis metabólicos comparáveis aos da planta na

natureza. As culturas de raízes adventícias *in vitro* são consideradas sistemas potenciais para a produção de substâncias bioativas, uma vez que estes órgãos são naturalmente capazes de sintetizar e armazenar diversos metabólitos secundários. Essas raízes podem ser obtidas por meio da transformação genética com *Agrobacterium rhizogenes*, ou pela simples manipulação do meio e das condições de cultura. Diversos trabalhos relatam o desenvolvimento de culturas de raízes adventícias a partir de explantes radiculares (BETSUI; TANAKA-NISHIKAWA; SHIMOMURA, 2004; SIMÃO et al., 2016; SUBOTIĆ et al., 2009; YIN et al., 2013), brotos, folhas e segmentos caulinares (AMISSAH et al., 2008; LEE et al., 2011; HASAN; HUSSEIN, 2013; MARTIN et al., 2008), assim como de calos (LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK; TOWN, 2005).

Culturas desorganizadas, como calos e suspensões celulares, também constituem técnicas bastante utilizadas para a produção *in vitro* de metabólitos secundários (ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013; CAI; KNORR; SMETANSKA, 2012; GADZOVSKA-SIMIC, et al., 2012; GONÇALVES; ROMANO, 2013; GUPTA et al., 2012; NAGELLA; MURTHY, 2010). Entretanto, esses sistemas podem sofrer perdas na capacidade de produção e acúmulo de metabólitos, considerando que o metabolismo pode ser controlado de maneira tecido-específica.

Independente do sistema de cultura adotado, os mecanismos genéticos, fisiológicos e morfológicos de controle da morfogênese e de acúmulo de substâncias bioativas devem ser observados durante o estabelecimento de sistemas *in vitro* para a produção de metabólitos de interesse (FRANÇA, 2010). Outro importante aspecto a ser considerado é a manutenção desses sistemas, que requerem subculturas periódicas, tornando o processo dispendioso, suscetível a erros e contaminações. Além disso, existe ainda a possibilidade de perda do potencial morfogênico e biossintético, e de ocorrência de alterações genéticas e/ou epigenéticas. Desta forma, metodologias de conservação *in vitro*, como o crescimento lento e a criopreservação, são consideradas fundamentais para a manutenção, em médio e longo prazo, de materiais biotecnológicos produtores de substâncias de interesse (ENGELMANN, 2011; MATSUMOTO; NIINO, 2017).

Conservação *in vitro*

Sistemas de crescimento lento caracterizam-se pelo aumento dos intervalos entre as subculturas, como consequência da redução do desenvolvimento e do metabolismo das

plantas (ASHMORE, 1997). A redução da atividade metabólica e da taxa de crescimento das culturas pode ser obtida pela manipulação das condições ambientais, incluindo a redução de temperatura, luminosidade e oxigênio (LEMOS et al., 2002; ROMANO; MARTINS-LOUÇÃO, 1999), modificações na constituição do meio de cultura, como a adição de substâncias com propriedades osmorreguladoras (BORGES et al., 2004; GOPAL et al., 2002) e a utilização de reguladores de crescimento, como o ácido abscísico (ABA) (LEMOS et al., 2002; WATT et al., 2000).

A criopreservação baseia-se no resfriamento a temperaturas ultrabaixas, com o uso de nitrogênio líquido (NL, -196°C) ou sua fase vapor (-150°C), condição que interrompe os processos metabólicos e divisões celulares, reduzindo os riscos de alterações genéticas. Dessa forma, o material pode ser estocado por períodos teoricamente indeterminados, requerendo um mínimo de espaço e manutenção. A importância da criopreservação de espécies vegetais tem crescido nos últimos anos e seu uso prioritário em programas de conservação é recomendado, por assegurar o armazenamento de forma segura e eficaz de espécies propagadas vegetativamente, raras, ameaçadas, ou que produzem sementes não-ortodoxas, além de produtos biotecnológicos, especialmente aqueles produtores de substâncias de interesse (ENGELMANN, 2011).

Um importante aspecto que deve ser considerado na criopreservação é a formação de cristais de gelo, que podem afetar a integridade celular (KACZMARCZYK et al., 2012). Assim, a desidratação é considerada uma das etapas críticas do processo, visando à remoção parcial da água e à redução das injúrias causadas pela cristalização. Nas técnicas clássicas ou convencionais de criopreservação de plantas, a desidratação é obtida durante o resfriamento, pela redução gradual da temperatura. Esse processo provoca, inicialmente, o congelamento do meio extracelular, criando uma diferença de pressão de vapor entre os dois lados da membrana, o que induz a saída da água do meio interno para atingir o equilíbrio osmótico, reduzindo a possibilidade de formação de cristais. Contudo, essa técnica não é indicada para tecidos multicelulares complexos, que requerem condições específicas para desidratação, e para espécies tropicais que não possuem mecanismos fisiológicos específicos de tolerância ao frio. Para esses materiais, a tolerância ao resfriamento pode ser induzida pela utilização de substâncias capazes de desidratar e proteger, simultaneamente, os sistemas celulares.

As técnicas contemporâneas, desenvolvidas após a década de 1990, são baseadas no processo de vitrificação, que consiste na solidificação amorfa do meio intracelular, sem cristalização (ENGELMANN, 2011). Nessas técnicas, a remoção da água é obtida antes do resfriamento, pela exposição dos tecidos a soluções altamente concentradas ou pela

desidratação evaporativa (BENSON, 2008). Diferentes técnicas baseadas no processo de vitrificação já foram desenvolvidas, incluindo dessecação, vitrificação, encapsulamento, vitrificação em gota e, mais recentemente, a vitrificação e a desidratação em placas de alumínio (ENGELMANN, 2011; MATSUMOTO; NINO, 2017).

Apesar da ampla utilização das metodologias de conservação *in vitro* para o armazenamento em médio e longo prazo de materiais vegetais, possíveis danos estruturais, como plasmólise, injúrias de membrana e mudanças genéticas e epigenéticas, além de alterações da capacidade biossintética, têm sido associados às condições de estresse promovidas pela manipulação *in vitro*. Portanto, a avaliação da estabilidade morfológica, molecular e biossintética dos materiais conservados *in vitro* é também de grande relevância e deve ser considerada.

Gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae possui aproximadamente 700 espécies, distribuídas em 25 gêneros, sendo o gênero *Passiflora* L. o mais representativo, com cerca de 560 espécies descritas (FEUILLET; MACDOUGAL, 2007), conhecidas popularmente como maracujás. O Brasil é considerado um importante centro de origem do gênero com 150 espécies descritas, das quais 87 são consideradas endêmicas, concentradas principalmente nas regiões Sudeste e Norte, com 72 e 68 espécies identificadas, respectivamente (BERNACCI et al., 2015).

Inicialmente, as espécies do gênero foram classificadas em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast, *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb e *Passiflora* L. (FEUILLET; MACDOUGAL, 2003). O subgênero *Astrophea* possui 57 espécies de lianas e arbustos, com grande diversidade na América do Sul, enquanto que *Deidamioides* apresenta somente 13 espécies conhecidas, encontradas na América Central e América do Sul. Cerca de 230 espécies foram descritas para o subgênero *Decaloba*, distribuídas por toda a América, Ásia e Oceania, enquanto que *Passiflora* inclui cerca de 250 espécies, sendo considerado o subgênero com o maior número de espécies conhecidas e estudadas. Sua distribuição é ampla, sendo a América do Sul considerada o maior centro de diversidade (ULMER; MACDOUGAL, 2004; KROSNICK et al., 2013). Há cerca de 10 anos, Krosnick, Ford e Freudenstein (2009), reconheceram um novo subgênero, *Tetrapathea* (DC.) P. S. Green, contendo apenas três espécies de lianas encontradas na Austrália, Papua-Nova Guiné e Nova Zelândia, aumentando o número de subgêneros para cinco.

Os maracujás são plantas trepadeiras, com hábito lenhoso ou herbáceo, apresentando folhas inteiras ou lobadas, simples, podendo variar nas formas dentro de uma mesma espécie. A maioria das espécies apresenta flores grandes, actinomorfas, com formas e cores variadas, o que justifica a sua utilização ornamental crescente. Os frutos são indeiscentes, geralmente globosos ou ovoides, com casca espessa, contendo em seu interior sementes envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997).

A cultura do maracujá é amplamente difundida devido à qualidade de seus frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou processados industrialmente para a fabricação de sucos, doces e sorvetes. A valorização destes produtos está associada ao seu sabor e conteúdo de ácido ascórbico, açúcar, caroteno, riboflavinonas e minerais (ULMER; MACDOUGAL, 2004), sendo considerado também um importante alimento funcional.

A produção brasileira de maracujá ganhou importância econômica há cerca de 30 anos, pelo incentivo da agroindústria e pela crescente demanda no mercado de frutas frescas. Embora exista uma grande diversidade de espécies de maracujá, apenas cerca de 30 espécies nativas apresentam frutos comestíveis, sendo poucas cultivadas comercialmente. Entre estas, destacam-se o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), o maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) e o maracujá-doce (*P. alata* Curtis). Embora a expansão da produção de maracujá tenha sido significativa nos últimos anos, sendo cultivado em quase todo o território nacional, cerca de 95 % dos pomares são constituídos por uma única espécie, o maracujá-amarelo (JANZANTTI; MONTEIRO, 2014; MALACRIDA; JORGE, 2012). O Brasil é considerado o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, com aproximadamente 700,000 toneladas produzidas em uma área aproximada de 50,000 hectares, principalmente na região Nordeste (IBGE, 2015).

O maracujá-doce, apesar de ter origem local, ainda é pouco comercializado no Brasil, com preços relativamente altos para o consumidor, e é utilizado principalmente como fruta fresca. Sua área cultivada no país é cerca de 3% em relação ao total ocupado pela cultura do maracujá-amarelo (MACIEL et al., 2009). Por outro lado, o maracujá-roxo, assim chamado devido à coloração púrpura da casca do fruto maduro, é muito utilizado na Austrália e África do Sul, possuindo maior porcentagem de açúcares que o maracujá-amarelo, com rendimento e qualidade de suco semelhantes. Além disso, apresenta potencial de produção de até 30 - 40 toneladas por hectare, podendo ser destinado para indústria, consumo *in natura* e exportação.

Além do potencial agrônomico e ornamental, algumas espécies de *Passiflora* despertam também interesse do ponto de vista medicinal, com base no seu uso popular, sendo utilizadas desde o século XIX para o tratamento de insônia, ansiedade e irritabilidade, por

meio de chás e infusões de folhas, frutos e raízes (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; MIRODDI et al., 2013). Tendo em vista a grande diversidade de atividades biológicas já descritas para o gênero, algumas espécies de *Passiflora*, como *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis* são consideradas drogas oficiais nas Farmacopeias de diversos países e indicadas, no Brasil, como fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde. Nos últimos 10 anos, estudos farmacológicos realizados com diversas espécies do gênero comprovaram diferentes atividades biológicas, incluindo atividades ansiolítica, anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (Quadro 1).

O potencial medicinal das espécies de *Passiflora* está associado à presença de diversas substâncias nos diferentes materiais vegetais. Estudos sobre a composição química destes materiais vêm sendo realizados há décadas, descrevendo principalmente a presença de alcaloides (FRYE; HAUSTEIN, 2007; LUTOMSKI; MALEK, 1975; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; TSUCHIYA et al., 1999), flavonoides (BARBALHO et al., 2011; FERRERES et al., 2007; MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; MÜLLER et al., 2005; RAFFAELLI et al., 1997; ZERAIK; YARIWAKE, 2010) e saponinas (BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005; DOYAMA et al., 2005; REGINATTO et al., 2004; WANG et al., 2013; YOSHIKAWA et al., 2000a; 2000b). Contudo, outros constituintes foram também isolados de espécies de *Passiflora*, como glicosídeos cianogênicos, carotenoides, aminoácidos, carboidratos e óleos essenciais, além de vitaminas, fibras e minerais (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; STRASSER, 2011; ZIBADI et al., 2007).

Quadro 1 - Atividades biológicas descritas em espécies do gênero *Passiflora* nos últimos 15 anos.

Atividade Biológica	Espécie	Material Vegetal	Referência
Analgésica	<i>P. foetida</i>	Folhas	SASIKALA et al., 2011
	<i>P. incarnata</i>	Folhas	INGALE; KASTURE, 2012
	<i>P. foetida</i>	Planta Inteira	ASADUJJAMAN et al., 2014
	<i>P. subpeltata</i>	Folhas	SHANMUGAM et al., 2014
	<i>P. leschenaultii</i>	Folhas	SHANMUGAM et al., 2016
Antioxidante	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Fruto	JANZANTTI et al., 2012
	<i>P. edulis</i>	Fruto	ROTILI et al., 2013
	<i>P. manicata</i>	Folhas	MORRONE et al., 2013
	<i>P. edulis</i>	Folhas	SILVA et al., 2013
	<i>P. edulis</i> , <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> , <i>P. maliformis</i> , <i>P. quadrangularis</i>	Fruto	RAMAIYA et al., 2013
	<i>P. alata</i>	Folhas	COLOMEU et al., 2014
	<i>P. alata</i>	Folhas	LUGATO et al., 2014
	<i>P. pohlii</i>	Raízes	SIMÃO et al., 2016
	<i>P. alata</i>	Folha	FIGUEREDO et al., 2016
<i>P. mollissima</i>	Fruto	GARCÍA-RUIZ et al., 2017	
Antibacteriana	<i>P. foetida</i>	Folhas e Frutos	MOHANASUNDARI et al., 2007
	<i>P. incarnata</i>	Parte Aérea	PATIL, 2010
	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Frutos e Sementes	LOPES-VARGAS et al., 2013
	<i>P. edulis</i> , <i>P. quadrangularis</i> , <i>P. maliformis</i>	Folhas e Caule	RAMAIYA et al., 2014
Antiviral	<i>P. edulis</i>	Raízes	MULLER et al., 2007

Atividade Biológica	Espécie	Material Vegetal	Referência
Ansiolítica	<i>P. actinia</i>	Folhas	LOLLI et al., 2007
	<i>P. quadrangularis</i>	Folhas	CASTRO et al., 2007
	<i>P. incarnata</i>	-	MOVAFEGH et al., 2008
	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Parte Aérea	DENG et al., 2010
	<i>P. incarnata</i>	Parte Aérea	SAMPATH et al., 2011
	<i>P. edulis, P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Parte Aérea	LI; GAO; LI, 2011
	<i>P. incarnata</i>	Parte Aérea	ASLANARGUN et al., 2012
Antidepressiva	<i>P. edulis</i>	Folhas e Caule	WANG et al., 2013
Anticonvulsivante	<i>P. incarnata</i>	Parte Aérea	NASSIRI-ASL, SHARIATIRAD, ZAMANSOLTANI, 2007
Anti-inflamatória	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Folhas	MONTANHER et al., 2007
	<i>P. edulis, P. alata</i>	Folhas	VARGAS et al., 2007
	<i>P. edulis</i>	Folhas	ZUCOLOTTO et al., 2009
	<i>P. foetida</i>	Folhas	SASIKALA et al., 2011
	<i>P. nitida</i>	Folhas	MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013
	<i>P. alata</i>	Folha	FIGUEREDO et al., 2016
	<i>P. edulis</i>	Sementes	MIZUSAKI et al., 2017
Antihiperlipidêmica	<i>P. edulis</i>	Frutos	SALGADO et al., 2010
	<i>P. edulis</i>	Frutos	BARBALHO et al., 2011
	<i>P. incarnata</i>	Folhas	GUPTA et al., 2012
	<i>P. nitida</i>	Folhas	MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013
	<i>P. alata</i>	Folhas	COLOMEU et al., 2014
Antipirética	<i>P. subpeltata</i>	Folhas	SHANMUGAM et al., 2014
	<i>P. leschenaultii</i>	Folhas	SHANMUGAM et al., 2016
Atividade	Espécie	Material	Referência

Biológica		Vegetal	
Anti-hipertensiva	<i>P. nepalensis</i>	Planta inteira	PATEL et al., 2011
Antifúngica	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Sementes	RIBEIRO et al., 2012
Anti-osteoporose	<i>P. foetida</i>	Planta Inteira	AHMAD et al., 2017
Antidiarreica	<i>P. foetida</i>	Planta Inteira	ASADUJJAMAN et al., 2014
Imunoestimulante	<i>P. alata</i>	Folhas	SILVEIRA et al., 2011

Os flavonoides já descritos em *Passiflora* estão presentes principalmente nas folhas e nos frutos e são, em sua maioria, C-glicosídeos, nos quais os açúcares estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono, embora já tenham sido encontrados também flavonoides O-glicosilados (DOYAMA et al., 2005). Já foi relatada a ocorrência de cerca de 50 diferentes flavonoides em espécies de *Passiflora*, sendo os principais vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosídeo e swertisina (ZUCOLOTTO et al., 2012). A atividade antioxidante de extratos de algumas espécies de maracujás é associada à presença desses flavonoides C-glicosilados. Estes antioxidantes naturais, que apresentam uma grande diversidade estrutural, vêm sendo amplamente utilizados nos últimos anos pelos seus efeitos benéficos para a saúde, especialmente na prevenção de doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (KRIS-ETHERTON et al., 2002; NILSSON et al., 2005). Além disso, também vêm sendo explorados pela indústria de cosméticos (GESZTESI; DA LUZ, 2007).

Alguns trabalhos descrevem também a presença de alcaloides do tipo indólico, derivados do sistema β -carbolina, como harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol, encontrados principalmente em extratos de folhas e caules de *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (FRYE; HAUSTEIN, 2007; LUTOMSKI; MALEK, 1975; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; TSUCHIYA et al., 1999). Os alcaloides do tipo indólico constituem um dos grandes grupos dessa classe e muitos possuem atividade biológica comprovada, podendo ser utilizados no tratamento de distúrbios de ansiedade e hipertensão, além de possuir propriedades sedativas e tranquilizantes (MÜLLER, 2006; PEREIRA; VILEGAS, 2000).

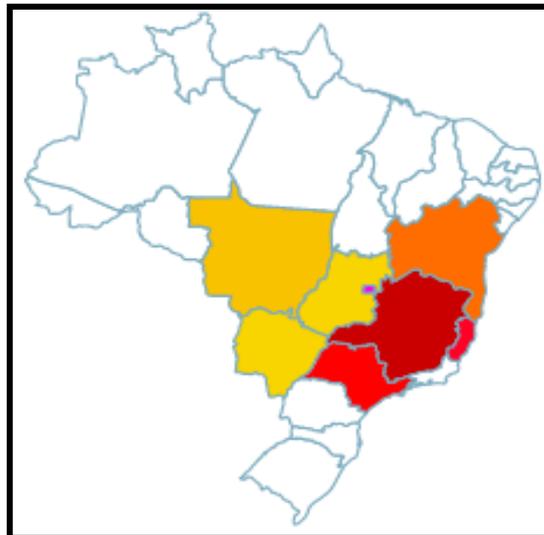
As saponinas, um grande grupo de glicosídeos amplamente distribuídos em plantas superiores, com vasta diversidade estrutural e funcional, são também frequentemente

encontradas em espécies de *Passifloras*. A primeira saponina descrita no gênero foi uma substância derivada de lanostato e foi detectada em extratos de folhas de *P. edulis*, sendo denominada passiflorina (BOMBARDELLI et al., 1975). Posteriormente, outras saponinas esteroidais e triterpênicas foram isoladas de folhas e de caules da mesma espécie (REGINATTO et al. 2001; YOSHIKAWA et al., 2000b) e também encontradas em *P. alata* e *P. pohlii* (GOSMANN et al., 2011; REGINATTO et al., 2001; SIMÃO et al., 2016).

Passiflora pohlii Mast.

Passiflora pohlii Mast., a espécie estudada neste trabalho, pertence ao subgênero *Decaloba* e é conhecida como maracujá-do-campo, maracujá-do-mato, maracujá-pintado, maracujá-silvestre ou maracujazinho. É uma espécie nativa do Brasil, sendo encontrada no Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Figura 1), biomas sob forte impacto antrópico (BERNACCI et al., 2015).

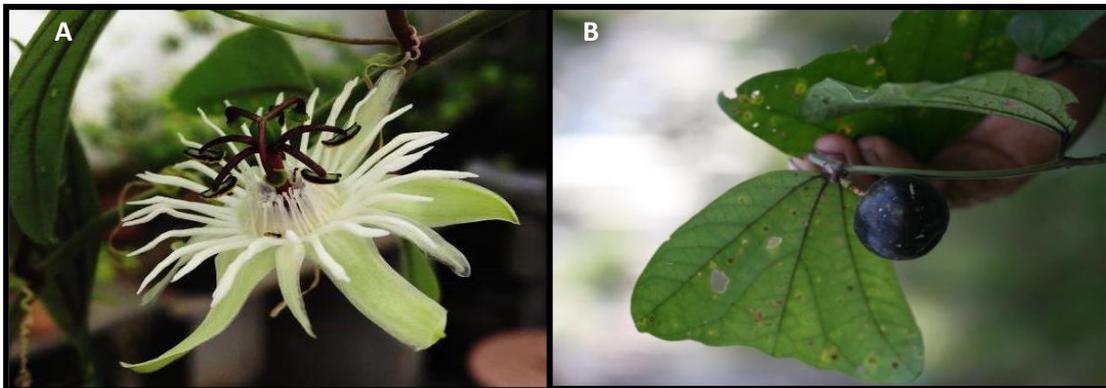
Figura 1 - Distribuição geográfica de *Passiflora*



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

As plantas são trepadeiras de caule herbáceo, com folhas cuneiformes. Suas flores possuem de 2,5 a 4,5 cm de diâmetro, com sépalas lanceoladas, oblongas e de coloração esverdeada, enquanto as pétalas são linear-lanceoladas e brancas (Figura 2A). A coroa é branca, com duas séries de filamentos, enquanto o androginóforo é de coloração arroxeada, com base anular. O fruto é uma baga globosa púrpura-escuro, com até dois centímetros de diâmetro (Figura 2B), e as sementes são oblongiformes e sulcadas transversalmente (FARIA; STEHMANN, 2010).

Figura 2 - *Passiflora pohlii* Mast.



Legenda: **A)** Flor; **B)** Fruto (<http://www.traium.andesamazon.org>).

Passiflora pohlii floresce ao longo de todo o ano, com o pico da floração ocorrendo entre os meses de setembro e outubro. As flores se desenvolvem aos pares, duram apenas um dia e apresentam estrutura semelhante à uma plataforma para os visitantes, com peças florais resistentes, odor agradável, néctar protegido e em quantidades moderadas. Estudos sobre a biologia reprodutiva classificaram a espécie como xenógama obrigatória, auto-incompatível, sendo dependente de polinizadores para sua reprodução sexuada. Entre os seus polinizadores estão as abelhas do gênero *Ptiloglossa*, moscas (*Drosophila melanogaster*) e formigas do gênero *Acromyrmex* (FARIA; STEHMANN, 2010).

Segundo Junqueira e colaboradores (2005), *P. pohlii* apresenta tolerância a patógenos do solo pertencentes ao gênero *Phytophthora*, que provocam grandes prejuízos à cultura de maracujá. Essa característica confere à espécie grande potencial agrônômico, podendo servir

como base para estudos visando à sua utilização como porta-enxerto e no controle de patógenos do solo.

Passiflora pohlii tem sido objeto de estudos biotecnológicos no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ) nos últimos 13 anos. Esses estudos resultaram no estabelecimento de estratégias eficientes de micropropagação a partir de explantes caulinares, com a formação de brotos por organogênese direta e indireta (MERHY, 2014). Os sistemas de regeneração de plantas desenvolvidos foram ainda utilizados como base para metodologias de criopreservação de segmentos nodais utilizando a técnica de vitrificação (MERHY et al., 2014).

Mais recentemente, foram também estabelecidas condições para a obtenção de culturas de raízes adventícias a partir de segmentos caulinares e radiculares excisados de plantas propagadas *in vitro*, utilizando diferentes tipos de auxinas e sistemas de cultura. Além disso, foi avaliado o perfil fitoquímico e potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de diferentes materiais obtidos *in vitro*, em comparação com plantas mantidas em condições naturais, sendo observada a presença de flavonoides em extratos de folhas, e de saponinas, com alta atividade antioxidante, em extratos de raízes (SIMÃO, 2015; SIMÃO et al., 2016).

Diante do exposto, dando continuidade aos estudos já realizados com *P. pohlii*, este trabalho é integrado por abordagens que visam ao estabelecimento de novos sistemas de cultura e de protocolos de criopreservação, assim como o aprofundamento dos estudos já realizados, investigando aspectos fitoquímicos e histológicos, e o potencial farmacológico dos materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, o trabalho será apresentado em forma de ítems, dentro dos objetivos propostos, conforme a seguir.

1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar aspectos fitoquímicos e o potencial farmacológico de materiais obtidos *in vivo*, *in vitro* e criopreservados de *Passiflora pohlii* Mast.

1.1 Objetivos específicos:

- Identificar os flavonoides presentes nos extratos de folhas de plantas mantidas em condições naturais, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-UV-IES-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Estabelecer culturas de calos a partir de segmentos foliares excisados de plantas *in vitro*, visando à produção em larga escala de metabólitos de interesse;
- Estabelecer um protocolo de criopreservação para segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* utilizando a técnica de V-Crioplaca;
- Caracterizar as alterações celulares e avaliar a capacidade biossintética de segmentos radiculares submetidos à criopreservação;
- Comparar o perfil fitoquímico de extratos dos diferentes materiais vegetais obtidos e conservados *in vitro*, por meio de análises cromatográficas;
- Avaliar os potenciais antioxidante e antibacteriano de extratos dos diferentes materiais vegetais obtidos *in vitro*.

2 IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Passiflora pohlii* Mast.

Introdução

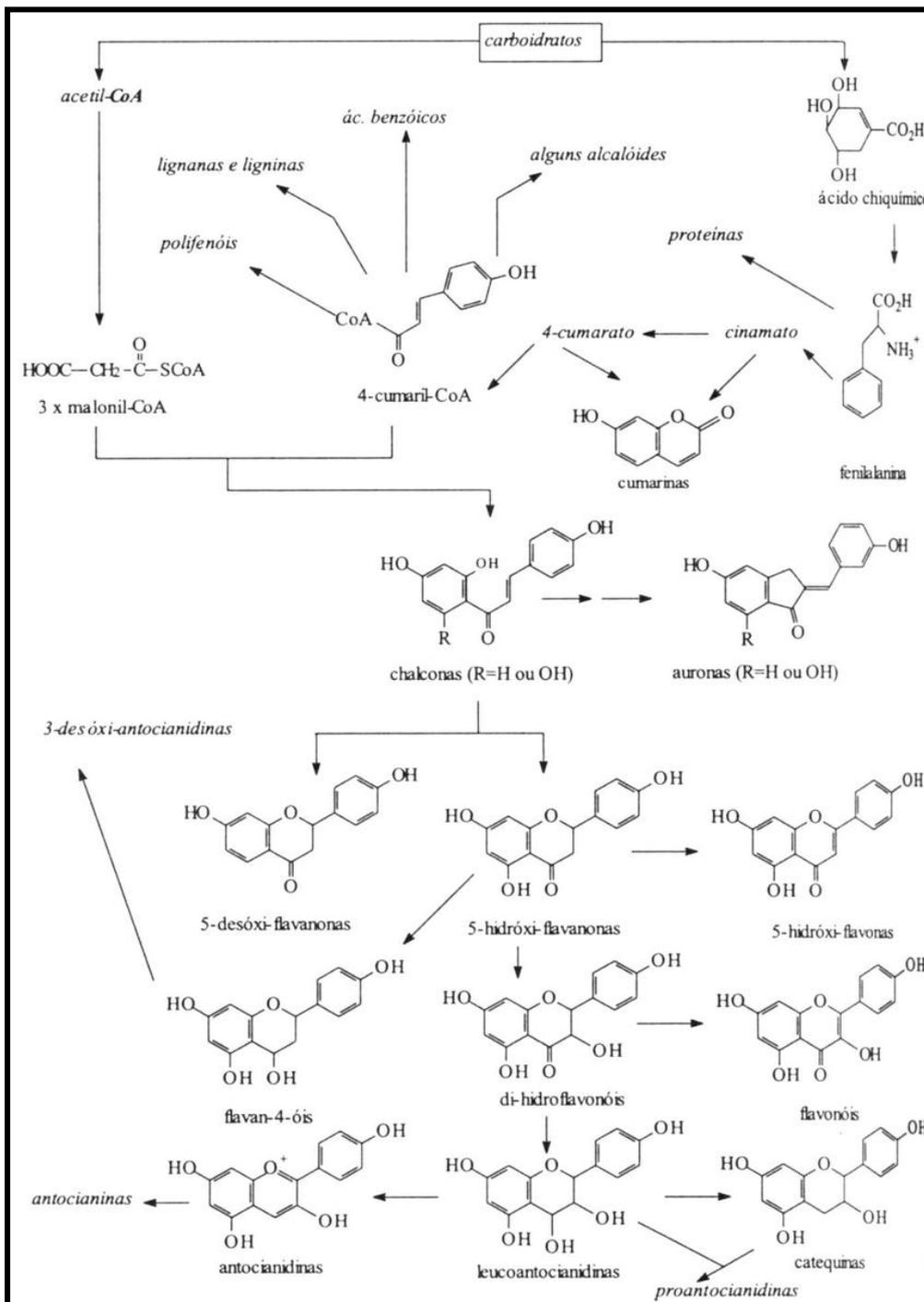
Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes de substâncias polifenólicas, sendo amplamente encontrados no reino vegetal. Sua presença já foi descrita em algumas espécies de briófitas e pteridófitas, mas sua maior distribuição ocorre nas angiospermas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Derivados da via dos fenilpropanoides, os flavonoides são formados a partir da junção de três moléculas de malonil-CoA com uma molécula 4-cumaril-CoA. Sua estrutura básica inclui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de dois radicais fenilas, denominados anéis A e B, ligados por uma cadeia de carbonos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010) (Figura 3).

Grande parte dos flavonoides ocorre conjugada com moléculas de açúcares, sendo conhecidos como glicosídeos ou heterosídeos. São denominados de O-glicosilados (ou O-heterosídeos) quando essa ligação ocorre por meio de um átomo de oxigênio, e de C-glicosilados quando a ligação é feita com um átomo de carbono. Flavonoides não conjugados a açúcares são denominados agliconas ou, mais frequentemente, flavonoides de forma livre (PANCHE; DIWAN, CHANDRA, 2016).

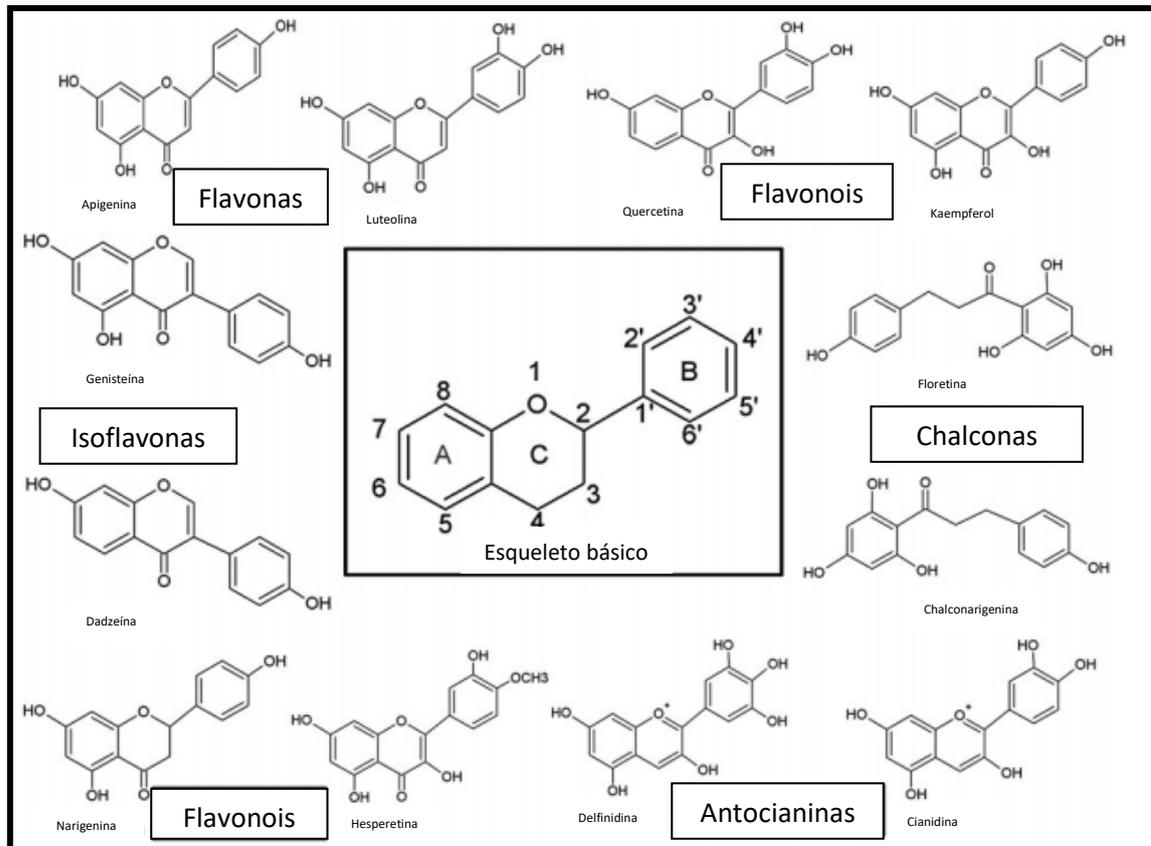
Devido à sua grande diversidade estrutural, os flavonoides foram distribuídos em diferentes subgrupos. Aqueles que possuem o anel B ligado à posição 3 do anel C são chamados de isoflavonas, enquanto os que possuem o anel B ligado na posição 4 são classificados como neoflavonoides. Os flavonoides que apresentam o anel B ligado na posição 2 são divididos em outros subgrupos, com base nas características estruturais do anel C: flavonas, flavonois, flavanonas, catequinas, antocianinas e chalconas (PANCHE; DIWAN, CHANDRA, 2016; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010) (Figura 4).

Figura 3 - Via biossintética de flavonoides em células vegetais



Fonte: ZUANAZZI e MONTANHA (2010)

Figura 4 - Estrutura básica dos subgrupos de flavonoides



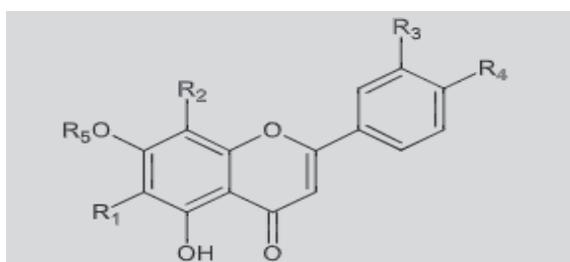
Fonte: adaptado de PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016.

Nos vegetais, os flavonoides são responsáveis pela coloração e aroma das flores, pela atração de polinizadores e, conseqüentemente, na dispersão dos frutos para auxiliar na germinação de sementes e esporos, e no crescimento e desenvolvimento de brotos. Também auxiliam na proteção das plantas contra diferentes estresses bióticos e abióticos, principalmente contra a radiação UV. Flavonoides também funcionam como moléculas sinalizadoras, substâncias alelopáticas, fitoalexinas, agentes detoxificantes, além de atuarem na defesa contra microrganismos (PANCHE; DIWAN, CHANDRA, 2016). Devido às suas propriedades bioativas, os flavonoides também estão associados à redução do risco de doenças em humanos, sendo amplamente conhecidos pelo seu grande potencial antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, antibacteriano e antitumoral (KUMAR; PANDEY, 2013).

No gênero *Passiflora*, os flavonoides constituem uma das principais classes de substâncias bioativas. Os mais comumente encontrados são os flavonoides C-glicosilados,

classificados como C-glicosilflavonas derivadas das agliconas apigenina e luteolina (LANÇAS, 1997; MORAES; VILEGAS; OGA et al., 1984; PETRY et al., 2001), ocorrendo frequentemente como isômeros (PEREIRA; VILEGAS, 2000) (Figura 5). Devido à grande diversidade estrutural e estabilidade química são consideradas substâncias essenciais para serem utilizadas como marcadores químicos no gênero (GOSMANN et al., 2011).

Figura 5 - Flavonoides C-glicosilados encontrados em espécies de *Passiflora*



Flavonoides C-glicosilados	Peso molecular	[M-H] m/z	Aglicona	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
2-vicenina	594	593	Apigenina	Gli	Gli	H	OH	H
6,8-di-glicosilcrisina	578	577	Crisina	Gli	Gli	H	H	H
Spinosina	608	607	Apigenina	Gli-O-Gli	H	H	OH	CH ₃
Isoorientina	448	447	Luteolina	Gli	H	OH	OH	H
Svertisina	446	445	Apigenina	Gli	H	H	OH	CH ₃
Isovitexina	432	431	Apigenina	Gli	H	H	OH	H
Vitexina-2''-O-raminosídeo	578	577	Apigenina	H	Gli-O-Ram	H	OH	H
Orientina	448	447	Luteolina	H	Gli	OH	OH	H
Vitexina	432	431	Apigenina	H	Gli	H	OH	H

Legenda: Gli = Glicose; Ram = Ramnose. Adaptado de ZUCOLOTTO et al., 2011.

A detecção e identificação dessas substâncias em espécies de *Passiflora* têm sido amplamente realizadas por meio de análises cromatográficas, incluindo a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM).

A técnica de CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial, sobre uma camada delgada de um adsorvente retido em uma superfície plana, geralmente placas de vidro ou folhas de alumínio revestidas com sílica gel. A identificação das substâncias de interesse pode ser realizada pela comparação do fator de retenção (R_F) com um padrão. Esta técnica permite a análise simultânea de várias amostras de forma fácil, rápida e barata, em um curto espaço de tempo, sendo considerada uma estratégia valiosa para a identificação e avaliação qualitativa de substâncias vegetais (BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005; WAGNER; BLADT, 2001).

A CLAE é um método físico-químico bastante utilizado para separação de substâncias encontradas em misturas simples ou complexas, devido à sua grande versatilidade, reprodutibilidade, estabilidade e precisão, permitindo a análise de uma grande variedade de substâncias (ZERAÍK, 2010). Além disso, é mais específica e, portanto, mais precisa, que a técnica de CCD. Nas análises por CLAE, a separação de substâncias é baseada no deslocamento seletivo em consequência das interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, podendo variar, de acordo com o tipo da interação. Na cromatografia em fase normal, por exemplo, a polaridade da fase estacionária é maior que a da fase móvel, enquanto na cromatografia em fase reversa, a fase móvel é a mais polar (RODRIGUES, 2013; ZERAÍK, 2010).

Na técnica de CLAE, a fase estacionária, geralmente composta por sílica, encontra-se na coluna cromatográfica, enquanto a fase móvel é constituída pelos solventes utilizados para a análise. A fase móvel pode ser utilizada em condição isocrática, sem a variação das proporções dos solventes, ou em gradiente, com dois ou mais sistemas de solventes variando durante o tempo da análise. O método de CLAE permite ainda a detecção das substâncias separadas, por meio de detectores acoplados ao sistema (RODRIGUES, 2013), incluindo os de UV, o de índice de refração, de fluorescência, de condutividade elétrica e eletroquímico (ZERAÍK, 2010).

Apesar de a CLAE possuir alta sensibilidade e exatidão, a determinação da estrutura química de uma substância requer ainda a utilização de uma técnica confirmatória. Dessa forma, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (CLAE-EM) constitui uma ferramenta analítica de grande interesse para análises qualitativas e quantitativas, uma vez que fornece informações estruturais de substâncias presentes em extratos, utilizando pequenas quantidades de material (LANÇAS, 2009).

O espectrômetro de massas é um detector universal, que fornece informações sobre a massa molecular e características estruturais de amostras simples ou complexas. Inicialmente,

a espectrometria de massas era utilizada apenas para a determinação de massas moleculares. Além disso, os modos de ionização mais antigos, como a ionização por impacto de elétrons, limitavam o seu uso para análise de substâncias não polares, voláteis e termoestáveis. Posteriormente, no entanto, a utilização de técnicas de ionização suave, como por *electrospray* (ESI), possibilitou a análise de substâncias polares, não voláteis e termolábeis, permitindo também a análise de suas propriedades físicas e/ou químicas por EM (CABRERA, 2006). Além disso, é possível ainda obter informações estruturais mais detalhadas utilizando a espectrometria de massas sequencial (EM/EM), em combinação com a dissociação induzida por colisão (DIC) (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

A elucidação estrutural de substâncias orgânicas não conhecidas também pode ser realizada pela associação da espectrometria de massas à Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Nessa técnica, os espectros de ressonância são obtidos a partir da exposição da amostra a um campo magnético, de forma que os núcleos que apresentem um momento magnético nuclear (núcleos com número de massa ímpar, como ^1H e ^{13}C , por exemplo) possam entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em frequências características, conforme sua vizinhança química (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são os mais utilizados e sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de hidrogênio e carbono de uma determinada substância, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à sua absorção de energia eletromagnética (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Em um recente trabalho com folhas de *P. pohlii*, Simão e colaboradores (2016) descreveram a presença de saponinas com atividade antioxidante nas raízes de plantas mantidas *in vivo* e cultivadas *in vitro*. Também foram observadas duas outras substâncias nos extratos brutos de folhas de plantas *in vivo* e *in vitro*, consideradas majoritárias nesses materiais. Essas substâncias foram preliminarmente caracterizadas como flavonoides, por apresentarem padrões característicos de absorção em UV. Análises por CLAE-EM revelaram ainda que elas apresentavam a mesma massa experimental $[M-1] = 607,1738$, compatível com a de flavonoides ligados a dois açúcares, podendo ser considerados isômeros. Entretanto, não foi possível associá-las aos principais flavonoides descritos para espécies do gênero *Passiflora* (SIMÃO, 2015).

Dessa forma, o objetivo desta parte do trabalho foi identificar os flavonoides presentes em folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas em condições naturais, utilizando a técnica de RMN.

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Material vegetal

Plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* no telado do Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas do NBV/UERJ foram utilizadas como fontes de materiais botânicos para este trabalho. Um exemplar representativo dessas plantas encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ 12198.

2.1.2 Preparo e purificação de extratos vegetais

Para as análises cromatográficas, foram preparados extratos brutos de folhas de plantas mantidas em condições naturais, de acordo com a metodologia descrita por Birk e colaboradores (2005). Foram utilizados 5 g de material seco em estufa a 45°C, por 24 horas.

Os extratos foram preparados utilizando-se etanol a 40% por 1 hora, em refluxo e posteriormente foram secos em banho-maria a 90°C. Em seguida, aproximadamente 10 mg do extrato bruto foi purificado utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (acetato de etila, hexano e metanol - Tedia®, Brasil).

A fração metanólica do extrato foi utilizada para as análises de CLAE-UV-DAD e RMN. Para isso, o extrato foi ressuspenso em 1 a 2 mL de metanol (PA, Tedia®, Brasil), com auxílio de ultrassom, por cerca de 5 minutos.

2.1.3 Análise por CLAE-UV-DAD

A detecção e a quantificação do flavonoide presente na fração metanólica do extrato de folhas foi realizada por CLAE-UV-DAD, de acordo com Costa e colaboradores (2011), com modificações. Foi utilizado o aparelho (Dionex Ultimate 3000) acoplado a uma coluna C18 (Dionex Bonded Silica Products, 4,6 x 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída de um gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1%, pH ajustado para 3) e B (acetonitrila), como descrito no quadro 2.

Quadro 2 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1%, com pH 3,0) e B (acetoneitrila) para a análise por CLAE-UV-DAD

Gradiente (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
30	80	20
40	80	20
47	95	5

A taxa de fluxo do efluente foi mantida a 1mL/min, em temperatura ambiente, e o volume de injeção foi de 10 µL.

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.

2.1.4 Análise por RMN

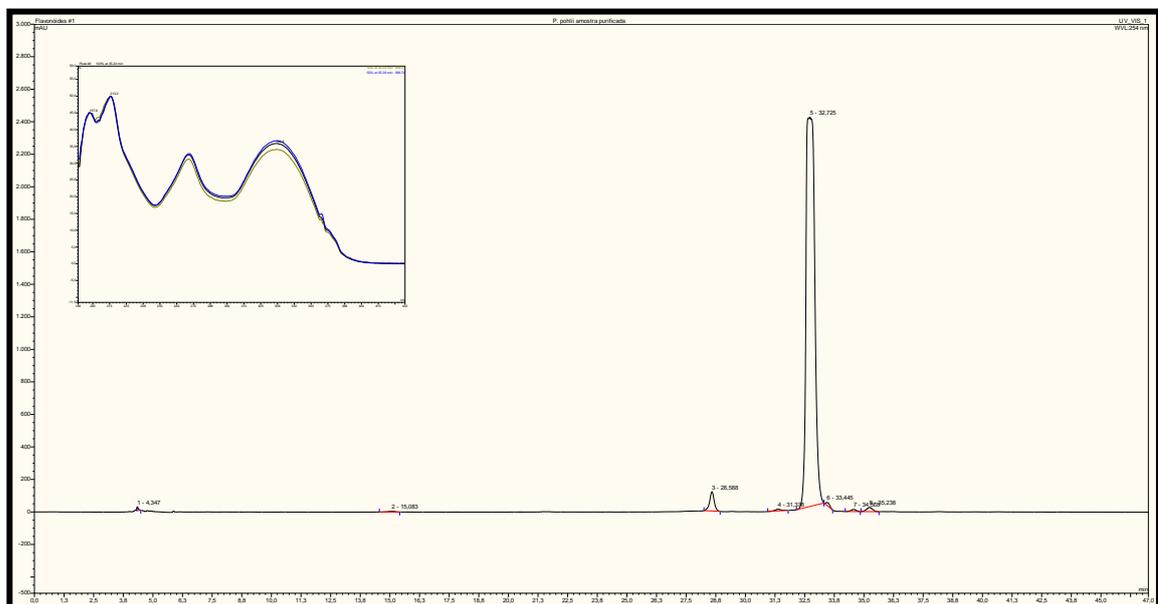
As análises por RMN ¹H (400 MHz) e ¹³C (125 MHz) foram realizadas utilizando o equipamento Bruker Avance II-400, na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, localizada na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em colaboração com o Prof. Dr. Davyson Moreira do Laboratório de Toxicologia. As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) (Tedia[®], Brasil), e a substância trimetilsilano (TMS) (Tedia[®], Brasil) foi utilizada como padrão interno. As constantes de deslocamento foram apresentadas ppm e as constantes de acoplamento, em Hertz (J).

2.2 Resultados

2.2.1. Análise cromatográfica

A análise cromatográfica por CLAE-UV-DAD da fração metanólica do extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas em condições naturais detectou um sinal correspondente aos flavonoides ($t_R = 32,7$ minutos), com absorção a 340 nm (Figura 6). Devido à sua alta concentração em relação aos demais sinais observados, foi constatado que o método utilizado para a purificação dos flavonoides permitiu a separação da substância com um grau de pureza de 95%, o suficiente para realizar a análise por RMN.

Figura 6 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-UV-DAD da fração metanólica do extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas em condições naturais, com detecção em UV_{340nm}



Legenda: No detalhe, espectro de absorção UV do sinal observado.

2.2.2 Análise por RMN

O espectro de RMN ^1H da substância presente na fração metanólica do extrato de folhas de *P. pohlii* demonstrou a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos entre 6,9 e 8,01 ppm e sinal de hidrogênios alifáticos na região entre 2,9 e 5,9 ppm. Foi observada também a presença de um simpleto com integração para três hidrogênios em 3,9 ppm, compatível com sinal de hidrogênios metoxílicos (-O-CH₃). A presença de dois sinais em 5,45 ppm e em 5,6 ppm com integração para um hidrogênio cada e constante de acoplamento de 2,0 Hz, denota a presença de dois açúcares na molécula. No entanto, a ausência de sinais de hidrogênios de grupo metila (-CH₃) entre 1,0 e 2,0 ppm descarta a possibilidade de um desses flavonoides ser a rutina. O espectro de RMN ^{13}C demonstrou a presença de sinais na região de açúcares entre 60,0 e 103,0 ppm e sinais de carbonos aromáticos entre 100,00 e 182,00 (Tabela 1).

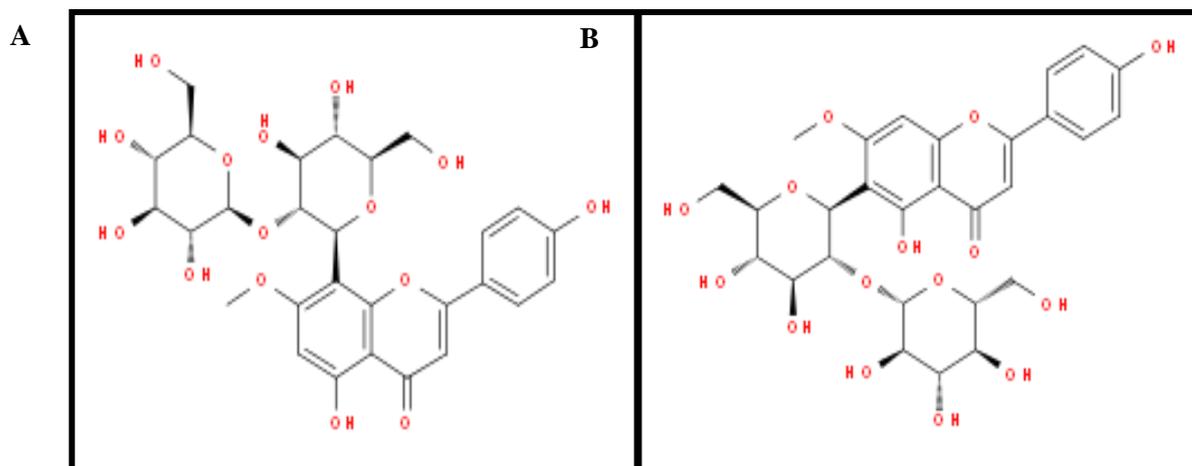
Considerando o peso molecular obtido anteriormente por CLAE-EM (aproximadamente 608) (SIMÃO, 2015) e os dados de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 1), foi possível concluir que as substâncias analisadas são flavonas O-metoxiladas e C-glicosiladas, com dois resíduos de glicose. Além disso, foram observados, no espectro de RMN ^1H e ^{13}C , alguns sinais dobrados em menor intensidade, o que confirma se tratar de uma mistura de dois isômeros. Os sinais referentes ao grupo carbonila (C=O) no espectro de RMN ^{13}C (dois sinais em 181,86 ppm e 182,18 ppm, respectivamente) respalda fortemente essa conclusão.

A busca na literatura e a comparação dos dados de CLAE-EM e RMN ^1H e ^{13}C permitiram ainda identificar a substância majoritária presente na fração metanólica do extrato de folhas de *P. pohlii* como iso-spinosina (Figura 7A) e a minoritária, com proporção aproximada de 3:1, com base na intensidade do sinal do grupo carbonila, como spinosina (Figura 7B).

Tabela 1 – Deslocamentos de RMN ^{13}C (ppm) das substâncias presentes na fração metanólica de extratos de folhas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e diluídas em DMSO-d6

	Posição	Substância 1	Substância 2
Aglicona	2	164,93	164,93
	3	102,94	102,84
	4	181,86	181,18
	5	161,24	161,24
	6	102,84	163,74
	7	160,42	160,42
	8	163,59	90,33
	9	156,84	156,95
	10	105,17	105,36
	1'	120,83	120,83
	2'/6'	128,40	128,40
	3'/5'	115,89	115,89
	4'	159,55	159,55
Açúcares	1''	102,90	102,90
	2''	74,40	74,40
	3''	76,60	76,60
	4''	70,30	70,30
	5''	76,30	76,30
	6''	60,40	60,40
	1'''	102,80	102,80
	2'''	92,60	92,60
	3'''	76,20	76,20
	4'''	74,60	74,60
	5'''	76,20	76,20
	6'''	61,30	61,30

Figura 7 - Flavonoides encontrados nos extratos de folhas de *Passiflora pohlii* Mast



Legenda: A) Iso-spinosina; B) Spinosina.

2.3 Discussão

Em um estudo anterior (SIMÃO, 2015) visando à caracterização do perfil fitoquímico de *Passiflora pohlii* utilizando as técnicas de CCD, CLAE-UV e CLAE-EM, foi evidenciada a presença de dois flavonoides nos extratos de folhas excisadas de plantas mantidas sob condições naturais e de plantas obtidas *in vitro*, com padrões característicos de absorção em UV. As análises por CCD indicaram ainda que essas substâncias eram derivadas de apigenina, uma vez que apresentaram coloração amarelo-esverdeada quando reveladas com NP/PEG e visualizadas em UV $_{365\text{nm}}$. Além disso, foi também observado que os dois flavonoides apresentaram a mesma massa molecular e padrões de fragmentação semelhantes por CLAE-EM, indicando se tratar de isômeros, presentes em ambos os extratos analisados. Dessa forma, neste trabalho, foram realizadas análises por RMN visando à identificação e elucidação estrutural dos flavonoides presentes nas folhas dessa espécie.

A técnica de CLAE-EM tem sido bastante utilizada para a análise de substâncias polifenólicas, como os flavonoides, em extratos de plantas, uma vez que permite determinar a massa molecular, além de fornecer outras informações sobre a molécula, como a estrutura da aglicona e os tipos de carboidratos presentes (mono, di, tri ou oligossacarídeos, e hexoses, deoxihexoses ou pentoses). Essa técnica possibilita ainda a detecção de outros substituintes,

de ligações interglicosídicas e dos pontos de ligação dos substituintes na aglicona (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). No gênero *Passiflora*, por exemplo, a técnica de CLAE-EM e suas variações já foram amplamente utilizadas para a descrição e identificação de diversos flavonoides (ICHMURA et al., 2006; PEREIRA; YARIWAKE; MCCULLAGH, 2005; SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012; SIMIGIOTIS et al., 2013; WOHLMUTH et al., 2010; ZUCOLOTTO et al., 2011). No entanto, apesar da grande sensibilidade e precisão, os métodos de EM muitas vezes não permitem a identificação das amostras analisadas.

A RMN é considerada uma importante metodologia para a elucidação estrutural de substâncias complexas em extratos vegetais e tem sido utilizada de forma eficiente em associação com as técnicas de CLAE-UV e CLAE-EM para a identificação de flavonoides glicosilados (BUENO et al., 2016; CHANG; LEE, 2012; CUYCKENS; CLAEYS, 2004; MANEECHAI et al., 2012; KIM et al., 2015; PAVIA et al., 2010; RAUTER et al., 2005).

Os dados obtidos neste trabalho pela análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , quando observados em conjunto com os obtidos anteriormente pelas análises por CLAE-UV e CLAE-EM (SIMÃO, 2015), permitem sugerir que os flavonoides encontrados nas folhas de *P. pohlii* são os isômeros C-glicosilados spinosina e iso-spinosina, sendo este último considerado a substância majoritária presente nos extratos.

Embora a iso-spinosina ainda não tenha sido descrita em espécies de *Passiflora*, reforçando o caráter inédito do presente trabalho, a presença de spinosina já foi relatada por Langassner (2009) e Zucolotto e colaboradores (2011), em extratos de folhas e pericarpo de *P. edulis* var. *flavicarpa*. Nesses estudos, o valor da massa molecular do flavonoide (aproximadamente 608) foi a mesma daquela observada nas análises por CLAE-EM de folhas de *P. pohlii* (SIMÃO, 2015).

A presença de isômeros de flavonoides C-glicosilados é bastante comum no gênero *Passiflora*, sendo os mais frequentes vitexina e isovitexina, orientina e isoorientina (PEREIRA; VILEGAS, 2000). Apesar de possuírem a mesma massa molecular, essas substâncias apresentam pequenas diferenças estruturais, como mudanças nas posições de glicosilação e hidroxilação, as quais podem acarretar diferenças nas suas atividades biológicas (PIKULSKI; BRODBELT, 2003).

Além das espécies de *Passiflora*, os flavonoides spinosina e iso-spinosina já foram descritos em sementes de *Zizyphus jujuba* var. *spinosa*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa (LEE et al., 2016; LIU et al., 2015; WANG et al., 2008, 2012). A presença de spinosina também já foi relatada em partes aéreas de *Desmodium tortuosum* (LEWIS et al., 2000), e em extratos de folhas e raízes de *Wilbrandia ebracteata*, planta utilizada na medicina

popular chinesa para o tratamento de gastrites, úlceras, constipações, febre e reumatismos, devido à sua ação analgésica, anti-inflamatória e antioxidante. Cabe destacar que essa mesma espécie apresenta ainda outros flavonoides C-glicosilados bastante comuns em espécies de *Passiflora*, como swertisina, isoswertisina, vitexina, isovitexina, vicensina-2, orientina e isoorientina (SGROTT, 2016).

No trabalho anterior realizado com *P. pohlii*, além da caracterização fitoquímica preliminar, foi avaliado o potencial antioxidante de extratos de folhas e raízes de plantas mantidas sob condições naturais e de materiais obtidos *in vitro*. Contudo, apenas os extratos de raízes apresentaram atividade antioxidante, o que foi associado à presença de saponinas nesses materiais (SIMÃO, 2015). Além disso, testes preliminares mostraram que a fração metanólica do extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas em condições naturais também não apresentaram atividade antibacteriana, antifúngica e antimoluscicida (dados não mostrados). Apesar de não terem sido relatados, até o momento, efeitos biológicos associados especificamente ao flavonoide iso-spinosina, o potencial farmacológico do flavonoide spinosina parece estar associado, principalmente, a seus efeitos tranquilizantes, sendo utilizado em tratamentos contra ansiedade (LIU et al., 2014; WANG et al., 2010, 2012). Mais recentemente, Lee e colaboradores (2016) apontaram que a spinosina possui também potencial neuroprotetor, podendo ser utilizada no tratamento de distúrbios neurológicos (LEE et al., 2016).

Os dados obtidos nesta etapa do trabalho indicam que a RMN se mostrou uma técnica eficiente para a elucidação estrutural dos flavonoides presentes nos extratos de folhas de *P. pohlii*, os quais foram identificados, pela primeira vez, como iso-spinosina e spinosina. No entanto, ainda são necessários mais estudos acerca do potencial farmacológico destas substâncias, principalmente da iso-spinosina, pouco relatada na literatura.

3 INDUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CALOS FRIÁVEIS DE *Passiflora pohlii* Mast.

Introdução

Técnicas biotecnológicas baseadas na cultura de células, tecidos e órgãos vegetais constituem ferramentas importantes para a produção de metabólitos secundários de interesse (BAQUE et al., 2012). Entre essas técnicas, as culturas de calos são bastante utilizadas, uma vez que permitem altas taxas de multiplicação celular e, portanto, podem ser empregadas para a produção contínua e em larga escala de substâncias bioativas (FRANÇA, 2010; MARTIN et al., 2008).

As culturas de calos podem ser muito diversas, e são classificadas em subgrupos com base nas suas características macroscópicas. Linhagens que diferem em aparência, cor, grau de compactação e potencial morfogenético podem surgir de um mesmo explante. O tipo de calo obtido, seu grau de diferenciação celular e sua capacidade de regenerar novas plantas dependem, no geral, da origem e da idade do tecido escolhido como explante, assim como dos estímulos externos (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

Calos que apresentam regeneração de órgãos, como raízes e brotos, ou de embriões somáticos, são chamados organogênicos ou embriogênicos, respectivamente. Por outro lado, aqueles que não apresentam vias de regeneração são denominados não-morfogênicos. Além disso, os calos podem ser considerados friáveis ou compactos, de acordo com o grau de coesão de suas células (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013). Existem ainda os calos mistos, que apresentam regiões com diferentes características morfogênicas, de acordo com seu perfil de expressão gênica (IWASE et al., 2011).

As características morfológicas, a capacidade morfogênica, assim como os tipos e concentrações das substâncias de interesse produzidas em culturas de calos, podem ser influenciadas por fatores como genótipo, estado fisiológico dos explantes, disponibilidade de nutrientes no meio de cultura, luz, temperatura e o tipo de regulador de crescimento. Também é importante considerar a relação entre a multiplicação e o desenvolvimento celular com a síntese dos metabólitos, uma vez que, na maioria dos casos, a multiplicação celular e a

biossíntese dessas substâncias são fenômenos distintos e que possuem condições favoráveis específicas (FRANÇA, 2010; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

A composição dos meios de cultura utilizados para a indução e a manutenção das culturas de calos *in vitro* é considerada um dos principais fatores que podem influenciar a proliferação celular e a síntese de metabólitos, com destaque para o tipo e a concentração de reguladores de crescimento, de açúcares e da proporção amônia/nitrato (FRANÇA, 2010; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Entre esses, os açúcares constituem importantes fontes de carbono para o desenvolvimento *in vitro* e, dessa forma, possuem um papel essencial no metabolismo celular, podendo atuar também como hormônios, moléculas sinalizadoras e/ou como reguladores da expressão gênica no processo de desenvolvimento vegetal (EVELAND; JACKSON, 2012; ROLLAND; MOORE; SHEEN, 2002).

No entanto, quando presentes em excesso nos meios de cultura, os açúcares podem também induzir estresse osmótico e levar à produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-). Como consequência, induzem a ativação do sistema antioxidante celular, com o aumento da expressão das enzimas específicas que atuam na neutralização das moléculas reativas, assim como estimulam a biossíntese de substâncias com ação antioxidante, como os polifenóis, em diferentes órgãos vegetais (HARA et al., 2003; KILAYRI; BAHRANY, 2002; ROLLAND; MOORE; SHEEN, 2002; SHENG et al., 2005).

A capacidade antioxidante dos diferentes materiais vegetais pode ser analisada por diversos ensaios *in vitro*, como os de captura dos radicais 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e peroxila (ORAC), além da avaliação do poder de redução do íon ferro (FRAP) e da quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Entre esses, o mais comumente utilizado é a determinação da capacidade de captura do radical livre DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; LUGATO et al., 2014; NSIMBA; ZERAIK et al., 2011; ZHANG, YANG, ZHOU, 2018), caracterizado como um radical livre estável devido à deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula, impedindo sua dimerização. Essa deslocalização também é responsável pela cor violeta das soluções etanólica ou metanólica de DPPH, com absorção a 515 ou 517 nm. Ao entrar em contato com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio, o DPPH é reduzido, provocando a mudança da coloração da solução para amarelo, o que possibilita a mensuração da capacidade de captura do radical pela

substância e, portanto, do seu potencial antioxidante, através de espectrofotometria (Figura 8) (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER; BERSET, 1995; KEDARE; SINGH, 2011).

Figura 8 - Reação de redução do radical livre DPPH



Legenda: A) Representação estrutural da reação de redução do radical livre DPPH. A letra **A** representa a molécula doadora de elétrons; B) Representação da diferença colorimétrica de amostras em diferentes concentrações após reação com a solução de DPPH. Fontes: A) Adaptado de Behrendorff e colaboradores (2013)
Foto: A autora.

Na etapa anterior deste trabalho, foi descrita a presença dos flavonoides spinosina e iso-spinosina, com elevado grau de pureza, em frações metanólicas de extratos de folhas de *P. pohlii*. Dessa forma, o objetivo deste item foi desenvolver um protocolo para a indução e multiplicação de calos friáveis a partir de segmentos foliares excisados de plantas *in vitro*, em resposta a diferentes auxinas e concentrações de açúcares, visando à produção em larga escala dos flavonoides. Além disso, considerando a reconhecida capacidade antioxidante apresentada pelas espécies do gênero *Passiflora*, foi também avaliado o potencial antioxidante dos calos obtidos *in vitro*.

3.1 Material e Métodos

3.1.1 Material vegetal e condições de cultura

Plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro* por seis anos no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas do NBV/UERJ foram utilizadas como fontes de materiais botânicos para este trabalho (MERHY, 2014).

Foi utilizado o meio basal MSM (MONTEIRO et al., 2000) contendo vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sacarose a 3%, gelificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados em diferentes concentrações, antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm).

As plantas de *P. pohlii* foram mantidas em meio MSM ½ (meio MSM com metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose a 1,5%) e utilizadas quatro semanas após a subcultura de segmentos caulinares contendo de dois a quatro nós.

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

3.1.2 Indução de calos a partir de explantes foliares

Segmentos foliares (1,0 cm²), contendo a nervura central, foram excisados de plantas mantidas *in vitro* e inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de picloram (PIC) (12,4; 20,7; 28,9 μM), ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) (13,5; 22,6; 31,6 μM) ou ácido α -naftalenoacético (ANA) (16,2; 26,9; 37,8 μM), com a face abaxial em contato com o meio de cultura. Os explantes foram cultivados na presença de luz, por 60 dias. Para cada tratamento foram utilizados cinco frascos de vidro (10 cm x 6 cm), vedados com tampa de polipropileno, contendo 30 mL de meio de cultura, com três explantes cada.

O acúmulo de biomassa dos calos obtidos foi avaliado após 60 dias de cultura, por meio da aferição dos pesos de matéria fresca e seca. O peso seco foi aferido após secagem a 60°C em estufa por 24 h.

3.1.3 Indução da produção de substâncias bioativas em calos derivados de explantes foliares

Visando avaliar o efeito da sacarose na produção de substâncias bioativas, calos friáveis cultivados por 30 dias em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μM foram transferidos para meio fresco de igual composição, mas suplementado com sacarose a 0,09; 0,3 ou 0,5 M. Simultaneamente, segmentos foliares excisados de plantas *in vitro* foram inoculados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μM e diferentes concentrações de sacarose (0,09; 0,3 ou 0,5 M), para avaliar o efeito do açúcar durante o processo de indução da calogênese. Para cada tratamento, foram utilizados cinco frascos de vidro (10 cm x 6 cm), vedados com tampas de polipropileno contendo 30 ml de meio de cultura, com três explantes cada.

O acúmulo de biomassa dos calos foi avaliado após 60 dias de cultura, conforme descrito no item 4.2.2.

3.1.4 Análise fitoquímica

3.1.4.1 Preparo de extratos vegetais

Para as análises cromatográficas, foram preparados extratos brutos de calos obtidos a partir de explantes foliares de *P. pohlii*, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.2.2). Os extratos foram ressuspensos em metanol (Tedia[®], Brasil), com auxílio de ultrassom.

3.1.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a caracterização fitoquímica dos extratos, foram selecionados diferentes sistemas de CCD, utilizando placas de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} (Marcherey-Nagel).

Para a análise de flavonoides, foi usada fase móvel constituída de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v) (WAGNER; BLADT, 2001). A revelação foi realizada com NP/PEG 4000 (Natural Products – polietilenoglicol), revelador indicado para a identificação de flavonoides (WAGNER; BLADT, 2001). A solução foi preparada utilizando solução metanólica de 2-aminoetil difenilborinato (NP) (Sigma

Aldrich®) a 1%, seguida de solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (PEG) a 5%, com visualização em câmara de UV_{365nm}.

Para a análise de saponinas, a fase móvel foi constituída por uma solução contendo clorofórmio:ácidoacético:metanol:água (60:32:12:8 v/v), como descrito por Wagner e Bladt (2001). A placa de cromatografia foi revelada com solução composta por 0,5 mL de anisaldeído sulfúrico, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a exposição à solução reveladora, a placa foi aquecida a 100°C por 5 a 10 minutos, para visualização das bandas.

O R_F dos padrões e das amostras foi calculado conforme a equação abaixo:

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

3.1.4.3 Análise por CLAE-UV-DAD

A detecção das substâncias presentes nos extratos foi realizada por CLAE-UV-DAD, de acordo com metodologia descrita por Costa e colaboradores (2011), com modificações. Os extratos foram filtrados (Millipore de 0,45 µm, Merck®, Alemanha) e analisados utilizando cromatógrafo líquido (Agilent© 1260 Infinity), acoplado a uma coluna RP18 (Thermo-Scientific© Hypersil Gold (4,6 x 250 mm, 5 µm), e detector de UV com arranjo de diodos (DAD-UV).

A fase móvel foi constituída de um gradiente composto por soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1%, com pH 3,0) e B (acetonitrila, Tedia®), como descrito no quadro a seguir:

A taxa de fluxo do efluente foi mantida a 1mL/min, em temperatura ambiente e o volume de injeção foi de 10 µL. Os espectros de UV foram obtidos nos comprimentos de onda 200, 220, 240, 280, 300 e 340 nm.

Quadro 3 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1%, com pH 3,0) e B (acetoneitrila) para a análise por CLAE-UV-DAD

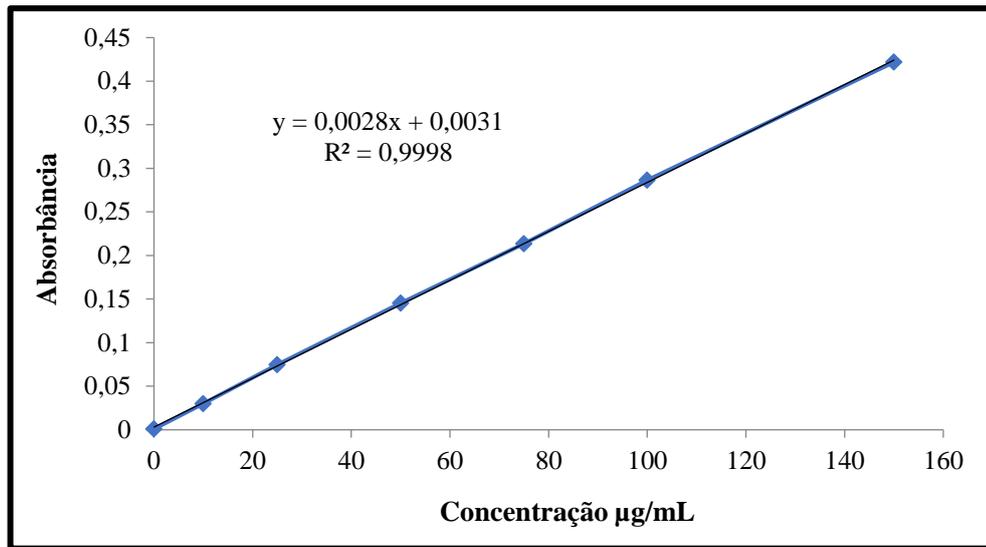
Gradiente (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
2	95	5
45	0	100
55	0	100
61	95	5

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.

3.1.5 Determinação do conteúdo fenólico

O conteúdo fenólico total dos extratos foi avaliado utilizando-se o ensaio de Folin-Ciocalteu (HOLLAND et al., 2011). Amostras dos extratos (90 µL), em três diferentes concentrações (12,5; 25 e 50 mg/mL) foram misturadas 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 160 mg/L (Figura 9). O conteúdo fenólico total dos extratos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), em mg/g de extrato seco. A curva padrão de ácido gálico foi representada pela equação: $y = 0,0028x + 0,0031$, onde x = concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y = absorbância.

Figura 9 - Curva padrão de ácido gálico

3.1.6 Avaliação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado através da capacidade de captura do radical DPPH (Sigma-Aldrich®), utilizando-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

Os extratos foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em, no mínimo, três concentrações. As soluções obtidas (25 µL) foram adicionadas a 975 µL de solução metanólica de DPPH a 60 µM e incubadas no escuro por 1 h. A solução de DPPH a 60 µM (975 µL) acrescida de metanol (25 µL) foi utilizada como controle negativo. As leituras de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro a 515 nm (Shimadzu UV- B382), sendo a porcentagem de captura do radical determinada conforme a equação abaixo:

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

Onde: Ac = absorbância do controle negativo

Aa = absorbância da amostra.

3.1.7 Análise estatística

Nas análises de indução de calogênese foram realizadas três repetições de cada experimento e os dados experimentais obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). As médias obtidas foram diferenciadas por meio do teste de Tukey a um nível de significância de $p \leq 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad© Software Inc). O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para testar a correlação entre potencial antioxidante e conteúdo de fenóis totais, com o auxílio do programa Graphpad InStat, sendo considerada significativa as diferenças com valores de $p \leq 0,05$.

3.2 **Resultados**

3.2.1 Indução de calos a partir de explantes foliares

Os segmentos foliares cultivados na presença de PIC apresentaram as maiores taxas de formação de calos friáveis, em resposta a todas as concentrações testadas, com a maior taxa (100%) observada a partir dos explantes cultivados em meio suplementado com PIC a 28,9 μM (Tabela 2). Esses calos apresentaram coloração amarelada (Figura 10A-C) e começaram a se desenvolver a partir do 10º dia de cultura, a partir da nervura central.

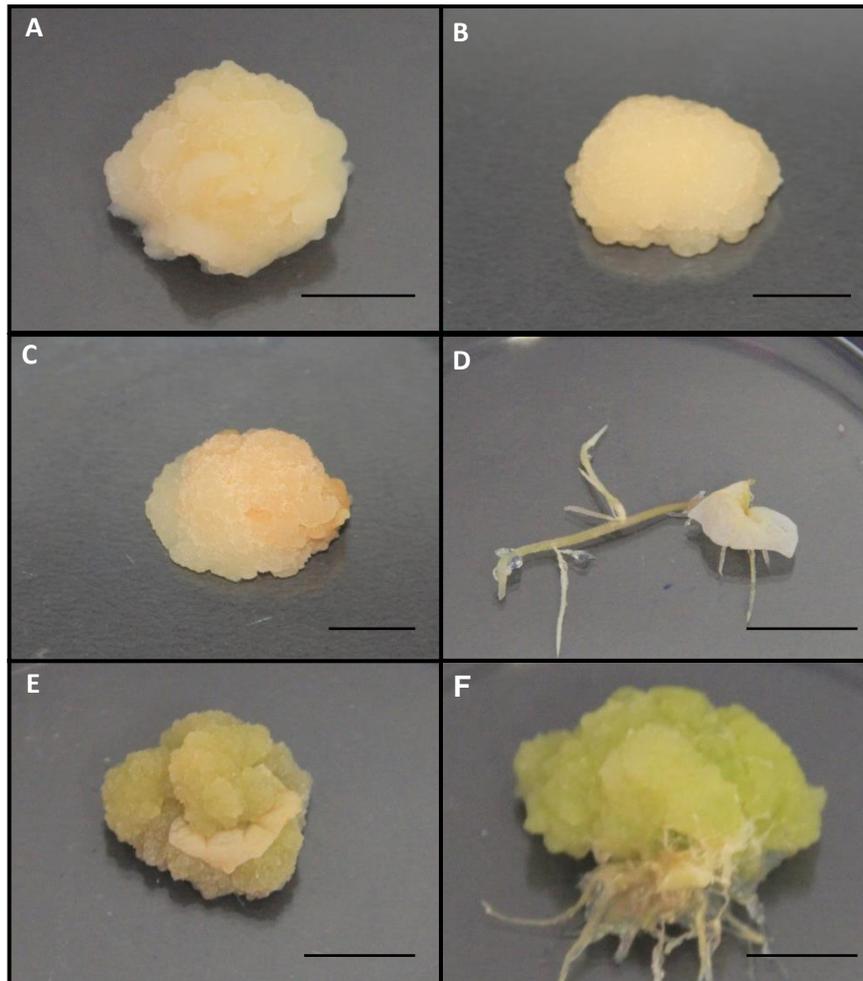
Quando os explantes foram cultivados na presença de ANA, ocorreu a formação de calos friáveis de coloração esverdeada, em frequências distintas, em resposta a todas as concentrações testadas (Tabela 2, Figura 10D-F). Foi também observada a formação de raízes adventícias finas e esbranquiçadas a partir dos explantes (Figura 10D) ou dos calos (Figura 10F).

Não houve morfogênese quando os segmentos foliares foram cultivados na presença de 2,4-D (dados não mostrados).

Tabela 2 – Morfogênese a partir de explantes foliares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e cultivados em meio MSM suplementado com diferentes tipos e concentrações de auxinas

Tipo e concentração de auxina (µM)	Calogênese (%)	Rizogênese (%)
PIC 12,4	93	-
PIC 20,7	93	-
PIC 28,9	100	-
ANA 16,2	0	100
ANA 26,9	78	45
ANA 37,8	70	100

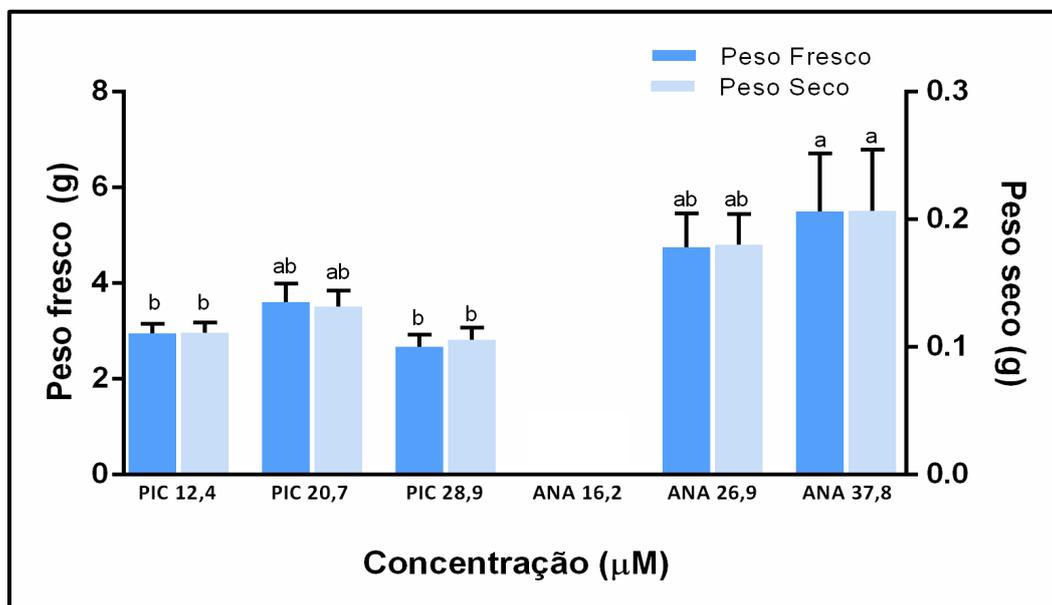
Figura 10 - Formação de calos friáveis e raízes adventícias a partir de segmentos foliares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA ou PIC, por 60 dias, na presença de luz



Legenda: Calos e raízes obtidos em resposta a: A) PIC a 12,4 μM; B) PIC a 20,7 μM; C) PIC a 28,9 μM; D) Segmento foliar apresentando regeneração direta de raízes adventícias em meio MSM suplementado com ANA a 16,2 μM; E) Calo obtido em resposta a ANA a 26,9 μM; F) Calo obtido em resposta a ANA a 37,8 μM, com produção de raízes adventícias. Barra = 1 cm.

Apesar de apresentarem a menor frequência de indução de calogênese, os calos obtidos em resposta a ANA a 37,8 μM apresentaram o maior acúmulo de biomassa. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à biomassa dos calos obtidos em meios suplementados com ANA a 26,9 μM ou PIC a 20,7 μM (Figura 11). Dessa forma, os calos friáveis obtidos nessas três condições foram submetidos a uma análise cromatográfica preliminar, por CCD, para avaliação qualitativa da produção de metabólitos. No entanto, a presença de metabólitos secundários somente foi detectada no extrato de calos derivados de segmentos foliares cultivados em meio com PIC a 20,7 μM (dados não mostrados). Portanto, essa condição foi utilizada para os experimentos seguintes.

Figura 11 - Biomassa (g) de calos friáveis derivados de segmentos foliares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA e PIC, por 60 dias, na presença de luz



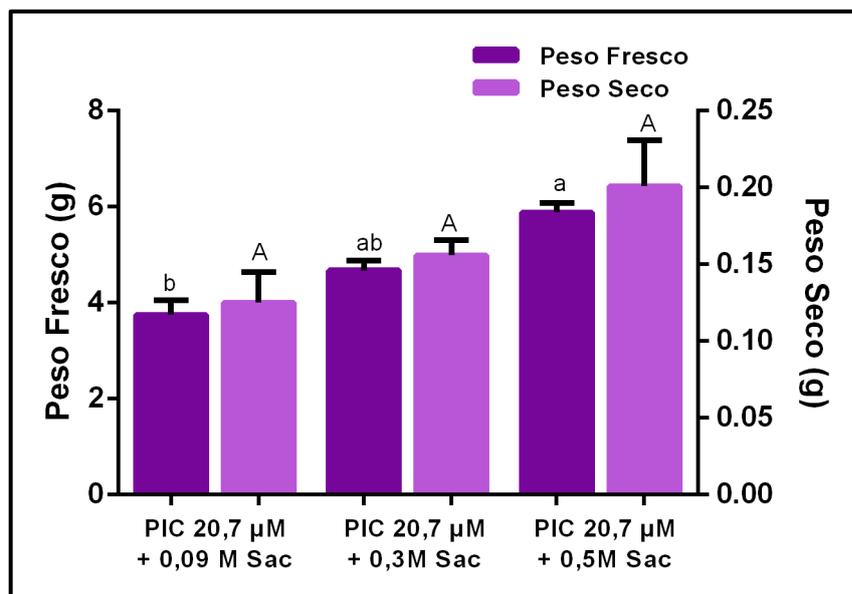
Legenda: Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2.2 Indução da produção de substâncias bioativas em calos derivados de explantes foliares

Segmentos foliares cultivados na presença de PIC a 20,7 μM e sacarose a 0,3 ou 0,5 M não apresentaram a formação de calos, ao contrário do que foi observado quando utilizada a concentração padrão de sacarose (0,09 M). Por outro lado, quando calos friáveis foram induzidos em meio contendo sacarose a 0,09 M e PIC a 20,7 μM e, posteriormente, transferidos para meios contendo concentrações mais elevadas de sacarose (0,3 ou 0,5 M), foi observada a continuação da proliferação celular, embora sem diferenças estatísticas em relação ao acúmulo de biomassa (Figura 12).

Os calos transferidos para meio suplementado com concentrações mais elevadas de sacarose também apresentaram alterações de coloração, com o surgimento de regiões verde-amareladas na superfície.

Figura 12 - Biomassa (g) de calos obtidos a partir de segmentos foliares de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro* em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μM , contendo diferentes concentrações de sacarose.



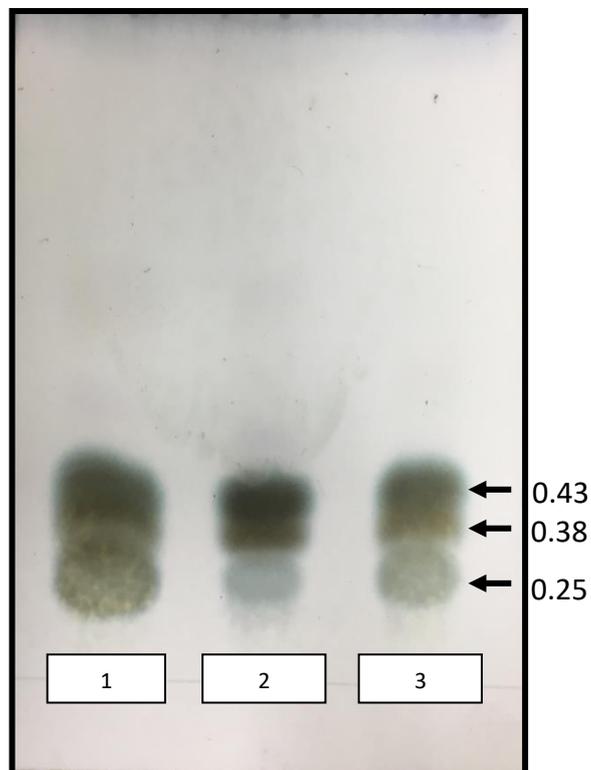
Legenda: Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2.3 Análise fitoquímica

3.2.3.1 Análise por CCD

A análise por CCD dos calos friáveis cultivados na presença de PIC a $20,7 \mu\text{M}$ e diferentes concentrações de sacarose (0,09; 0,3 ou 0,5 M) revelou a presença de três bandas indicativas de saponinas nos três extratos, com coloração castanho escuro e valores de R_F de 0.25, 0.38 e 0.43 (Figura 13). Por outro lado, não foram observadas bandas indicativas de flavonoides (dados não mostrados).

Figura 13 - Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de calos derivados de segmentos foliares de plantas *in vitro* de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com PIC a $20,7 \mu\text{M}$, contendo diferentes concentrações de sacarose

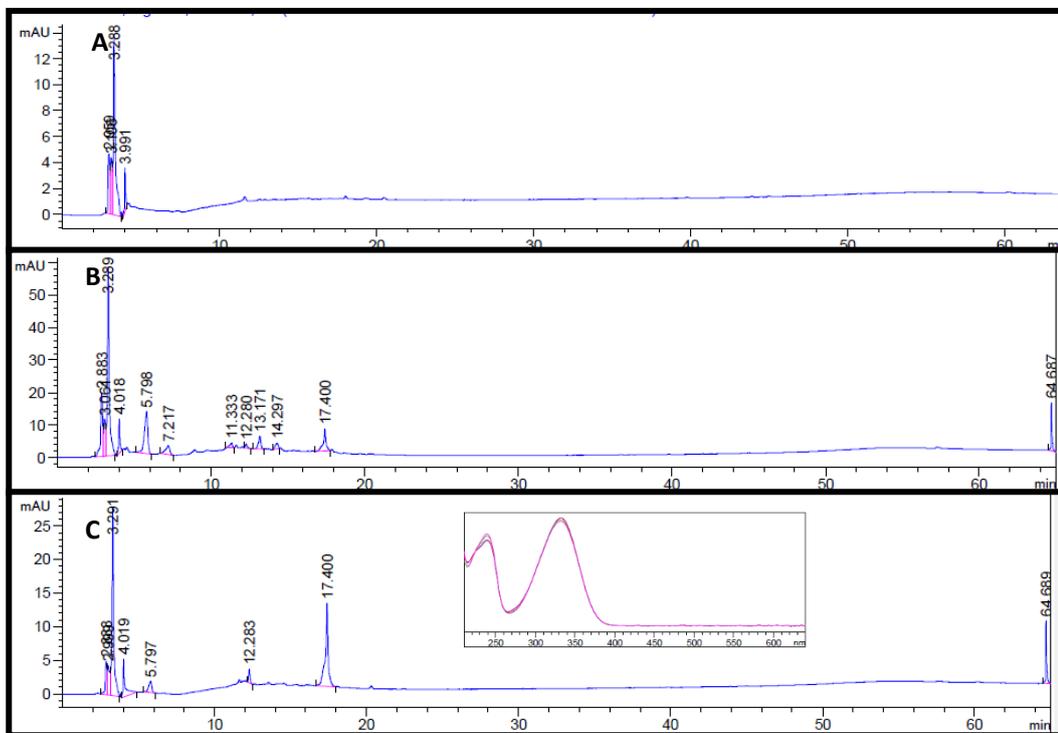


Legenda: Extratos de calos cultivados em meio MSM suplementado com PIC a $20,7 \mu\text{M}$ e sacarose a: 1) 0,09 M; 2) 0,3 M e 3) 0,5 M.

3.2.3.2 Análise por CLAE-UV-DAD

Os cromatogramas obtidos a partir da análise por CLAE-UV-DAD a 280 nm dos extratos de calos cultivados em PIC a 20,7 μM com diferentes concentrações de sacarose estão representados na figura 14. Foi possível observar dois sinais em comum nos extratos de calos cultivados em meio com sacarose a 0,3 e 0,5 M e ausentes no meio contendo concentração padrão de sacarose (0,09 M), com tempos de retenção (tR) de 12,28 e 17,4 minutos, o que sugere se tratar das mesmas substâncias. A diferença observada na área do sinal de tR = 17,4, que é maior na amostra cultivada na presença de sacarose a 0,5 M, indica um aumento na concentração da substância de acordo com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura (Figura 14). Não foram detectados sinais de absorção nos outros comprimentos de onda utilizados na análise (dados não mostrados).

Figura 14 - Cromatogramas dos extratos de calos derivados de segmentos foliares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μM , contendo diferentes concentrações de sacarose.



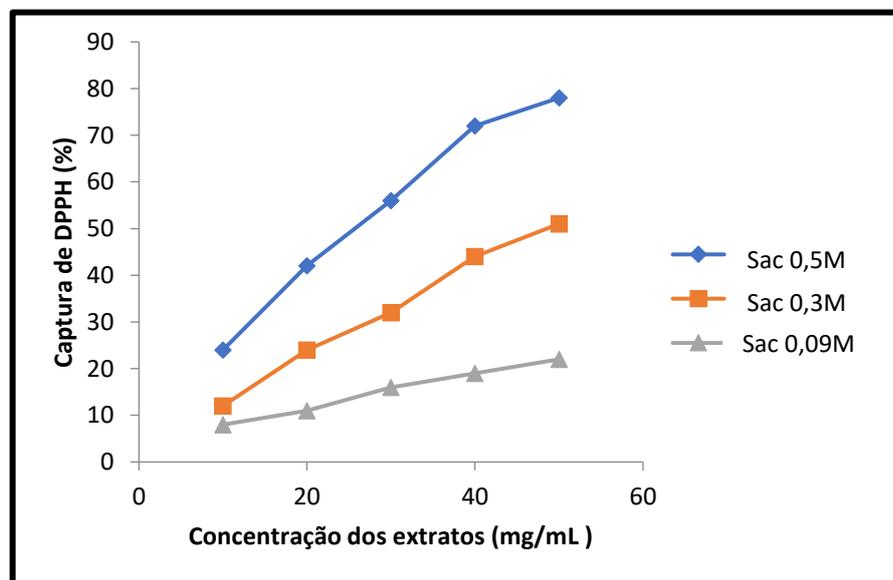
Legenda: Extratos de calos cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μM e sacarose a: A) 0,09 M; B) 0,3 M e C) 0,5 M. No detalhe, o espectro de UV_{280nm} do sinal com tempo de retenção de 17,4 minutos.

3.2.4 Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante

Foi observado um aumento estatisticamente significativo da produção de substâncias fenólicas em calos friáveis cultivados na presença de PIC a 20,7 μ M e de sacarose a 0,3 ou 0,5 M ($4,45 \pm 0,021$ e $5,98 \pm 0,004$ mg EAG/g de extrato, respectivamente), quando comparados aos calos cultivados em meio contendo a concentração padrão de sacarose (0,09 M) ($3,95 \pm 0,014$ mg EAG/g de extrato).

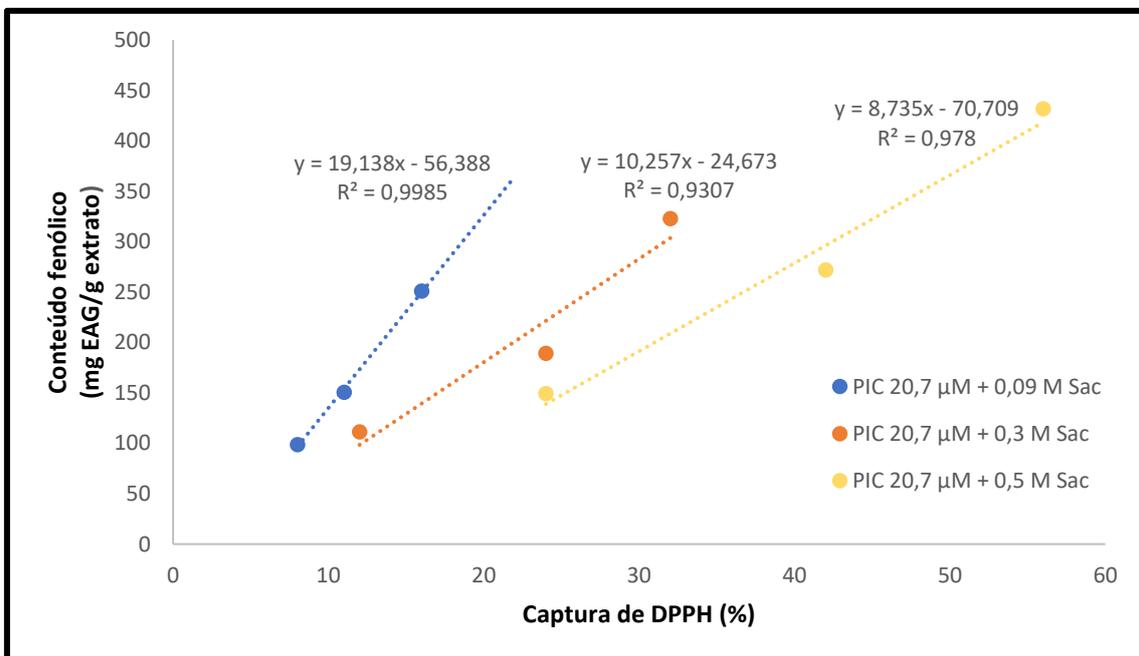
Extratos de calos induzidos em meio suplementado com PIC e sacarose a 0,09 M e posteriormente transferidos para meio contendo concentrações mais elevadas de sacarose (0,3 ou 0,5 M) também apresentaram maior potencial antioxidante, evidenciado pela redução do radical DPPH (Figura 15). A maior porcentagem de captura do radical (78%) foi observada em extratos dos calos cultivados em meio contendo sacarose a 0,5 M.

Figura 15 - Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de calos friáveis derivados de segmentos foliares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μ M, contendo diferentes concentrações de sacarose



O conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos de calos avaliados apresentou uma correlação positiva, indicando que a maior atividade antioxidante está relacionada à maior produção de substâncias fenólicas pelos materiais analisados (Figura 16).

Figura 16 - Relação entre conteúdo de fenóis totais e potencial antioxidante de extratos de calos friáveis derivados de segmentos foliares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 20,7 μ M, contendo diferentes concentrações de sacarose



3.3 Discussão

Culturas desorganizadas como calos e células em suspensão constituem técnicas bastante utilizadas para a produção *in vitro* de metabólitos de interesse comercial (ALI et al., 2016; ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013; CAI; KNORR; SMETANSKA, 2012; GADZOVSKA-SIMIC et al., 2012; GONÇALVES; ROMANO, 2013; GUPTA et al., 2012; NAGELLA; MURTHY, 2010), uma vez que são capazes de manter uma produção constante e em larga escala dessas substâncias, por um longo período de tempo (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

No presente estudo, culturas de calos friáveis foram obtidas a partir de segmentos foliares excisados de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro* e cultivados em meio MSM contendo diferentes concentrações das auxinas ANA e PIC. Embora os calos formados em resposta às duas auxinas tenham sido friáveis, variaram quanto à coloração e produção de metabólitos. Enquanto calos induzidos na presença de PIC eram amarelados e apresentaram a produção de possíveis saponinas, calos induzidos em resposta a ANA eram esverdeados, apresentaram a formação de raízes adventícias e não produziram substâncias detectáveis com os métodos de análise utilizados. Essas respostas podem estar relacionadas à sensibilidade das células do explante a essas auxinas, a qual é dependente da presença de transportadores ou receptores proteicos específicos nas membranas celulares (BENJAMINS; SCHERES, 2008). Além disso, é também possível que as duas auxinas tenham induzido reprogramações genéticas distintas, resultando na ativação diferencial de genes associados aos padrões morfogênicos e biossintéticos observados.

Outro aspecto analisado nesta parte do trabalho foi a influência de diferentes concentrações de sacarose na indução e multiplicação de calos friáveis de *P. pohlii* visando à síntese de flavonoides e outras substâncias com potencial antioxidante. Embora a indução de calos na presença de sacarose a 0,3 ou 0,5 M não tenha sido eficiente, foi observado que a transferência dos calos para meios contendo concentrações mais elevadas do açúcar estimulou a produção de substâncias fenólicas.

A influência da sacarose na biossíntese de substâncias fenólicas também já foi relatada por diferentes autores (BAQUE et al., 2012; SOLFANELLI et al., 2006; WU et al., 2006). Em culturas de células em suspensão de *Artemisia absinthium*, por exemplo, foi observado um aumento proporcional do conteúdo fenólico em resposta a sacarose a 3 ou 5% (ALI et al., 2016). O aumento da concentração de sacarose também promoveu um maior acúmulo de compostos fenólicos em culturas de células em suspensão de *Glycyrrhiza inflata* (YANG; HE; YU, 2008) e culturas de calos de *Eryngium planum* (KIKOWSKA et al., 2012), além de outros materiais obtidos *in vitro*, como brotos de *Exacum affine* (SKRZYPCZAK-PIETRASZEK; SLOTA; PIETRASZEK, 2014) e raízes de *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006). Entretanto, Fazal e colaboradores (2016) observaram que concentrações elevadas de sacarose foram inibitórias tanto para a produção de compostos fenólicos quanto para o acúmulo de biomassa de suspensões celulares de *Prunella vulgaris*. Além disso, Baque e colaboradores (2012) também observaram que uma menor concentração de sacarose foi mais eficiente para a síntese de substâncias fenólicas em cultura de raízes de *Morinda citrifolia*.

Substâncias fenólicas possuem reconhecido potencial antioxidante devido às suas propriedades de óxido-redução, sendo capazes de inibir a oxidação das biomoléculas, mesmo em baixas concentrações. Com isso, desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres, juntamente com o sistema antioxidante enzimático celular, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX) (MATKOWSKI, 2008).

Nos últimos anos, o interesse na utilização de substâncias antioxidantes naturais vem crescendo consideravelmente devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Estudos relatam que doenças causadas por reações oxidativas celulares, como as neurodegenerativas e cardiovasculares, podem ser retardadas pela ingestão regular de alimentos ricos em substâncias antioxidantes (NANGEDRAN; SUNDRAN; SAMMAN, 2006; NILSSON et al., 2005). Entre esses, os maracujás são considerados importantes alimentos funcionais, por serem fontes naturais de substâncias antioxidantes, como flavonoides e carotenoides, além de fibras e vitaminas.

Neste trabalho, a capacidade antioxidante de calos friáveis derivados de explantes foliares de *P. pohlii* foi avaliada através do ensaio de dosagem da captura do radical livre DPPH. Esse ensaio é considerado um método rápido, simples e barato para medir a capacidade de determinada substância em agir como sequestradora de radicais livres ou doadora de hidrogênio. A vantagem deste método é que o DPPH pode reagir com qualquer amostra durante diferentes períodos de tempo, permitindo até mesmo a avaliação de substâncias que atuam lentamente, como antioxidantes fracos (KEDARE; SINGH, 2011).

O aumento da atividade antioxidante dos extratos de calos friáveis de *P. pohlii* foi diretamente proporcional ao seu conteúdo fenólico, induzido pelo aumento da concentração de sacarose no meio de cultura. Esse mesmo comportamento foi observado em culturas de células de *Prunella vulgaris* e *Artemisia absinthium* (ALI et al., 2016; FAZAL et al., 2016). A correlação positiva entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante de diferentes materiais vegetais obtidos *in vitro* também já foi relatada para *Passiflora alata* (LUGATO et al., 2014).

A fim de se obter mais informações sobre as substâncias fenólicas com potencial antioxidante presentes nos extratos de calos de *P. pohlii*, foram realizadas análises cromatográficas utilizando as técnicas de CCD e CLAE. As análises por CCD mostraram que, apesar de não haver a produção de flavonoides, foram observadas bandas indicativas de saponinas em todos os extratos analisados, com os mesmos valores de R_F , indicando se tratar das mesmas substâncias. Esses resultados diferem dos obtidos anteriormente com folhas de

plantas *in vitro* de *P. pohlii* (SIMÃO, 2015), explante que deu origem aos calos analisados e que apresenta a produção de dois flavonoides isômeros, caracterizados aqui neste trabalho como spinosina e iso-spinosina. Além disso, as bandas indicativas de saponinas observadas nos extratos de calos também diferiram em cor e no valor de R_F quando comparadas com as bandas observadas nos extratos de folhas *in vitro* analisados anteriormente, demonstrando que os calos friáveis aqui obtidos possuem um metabolismo diferente dos seus explantes originais.

As análises cromatográficas por CLAE realizadas neste trabalho também mostraram a presença de outra substância ($t_R = 17,4$ min), cuja concentração aumenta proporcionalmente à elevação da concentração de sacarose no meio de cultura. Essa substância possui espectro de absorção constituído de dois sinais, entre 240 e 340 nm, característica das substâncias das classes das saponinas ou dos taninos, de acordo com Negri e Tabach (2013). No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para sua identificação.

Com base nos resultados obtidos nessa parte do trabalho, foi possível concluir que a presença de altas concentrações de sacarose no meio de cultura influencia não só a capacidade morfogênica, como também a produção de substâncias fenólicas e o potencial antioxidante de calos derivados de explantes foliares de *P. pohlii*. Dessa forma, apesar de não ter sido evidenciada a produção de flavonoides nesses materiais e de ainda serem necessários estudos mais aprofundados visando à eliciação e à elucidação das moléculas produzidas, calos friáveis de *P. pohlii* podem representar um sistema biotecnológico importante para a produção em larga escala de substâncias fenólicas com atividade antioxidante.

4 CRIOPRESERVAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOSINTÉTICA DE RAÍZES DE *Passiflora pohlii* Mast.

Introdução

Culturas de células e tecidos de plantas são consideradas estratégias alternativas para a produção de metabólitos secundários, uma vez que os métodos tradicionais de cultivo podem ser prejudicados por exigências específicas de solo e clima, bem como pelos estágios de crescimento e desenvolvimento das plantas, aumentando os custos de extração de substâncias bioativas (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002). Entretanto, a manutenção dos sistemas *in vitro* requer subculturas periódicas, tornando o processo dispendioso, suscetível a erros, contaminações e à perda de potencial morfogênico e biossintético, além de alterações genéticas. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias de conservação *in vitro* é considerado de grande importância para a manutenção de materiais biotecnológicos que produzem substâncias bioativas de interesse (MURCH et al., 2004).

Entre as estratégias de conservação *in vitro*, a criopreservação é considerada a única opção disponível para o armazenamento de germoplasma em longo prazo, de forma segura e com custos de manutenção reduzidos (ENGELMANN, 2011).

Como a integridade dos materiais criopreservados e, conseqüentemente, sua capacidade de recuperação, podem ser afetados pela formação de cristais de gelo dentro e fora das células, a desidratação dos materiais é de fundamental importância nas técnicas de criopreservação vegetal (KACZMARCZYK et al., 2012). Assim, a retirada da água pode ser obtida pela redução gradual da temperatura, pela exposição dos tecidos a soluções altamente concentradas ou pela desidratação evaporativa (BENSON, 2008).

Para a desidratação osmótica, o material vegetal é geralmente exposto às soluções de vitrificação, constituídas por uma mistura de substâncias crioprotetoras, como álcoois, açúcares, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), entre outras. Essas substâncias diminuem o ponto de congelamento, sendo que algumas são capazes de atravessar a membrana celular, tornando o citoplasma mais viscoso e forçando a saída de água para o meio extracelular (BENSON, 2008; KIM et al., 2009).

Como as respostas às soluções de vitrificação podem variar de acordo com o tecido e a espécie estudada, diferentes soluções, com combinações de diversas substâncias crioprotetoras, já foram desenvolvidas a fim de se obter maiores taxas de recuperação após a

imersão em NL (Quadro 4). Uma das mais utilizadas é a *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2), desenvolvida por Sakai, Kobayashi e Oiyama (1990), constituída por glicerol (30%), etilenoglicol (15%), DMSO (15%) e sacarose (0,4 M). No entanto, como alguns materiais não sobrevivem ao tratamento com as soluções de vitrificação devido à toxidez de seus componentes, principalmente o DMSO, alguns autores utilizam uma solução de osmoproteção, denominada solução de *loading*, que contém glicerol (2 M) e sacarose (0,4 M), antes da exposição a PVS2, para que os explantes possam adquirir tolerância à desidratação (MATSUMOTO; NIINO, 2017). Outra solução de vitrificação comumente utilizada é a *Plant Vitrification Solution 3* (PVS3), uma mistura de glicerol e sacarose (50 – 50%), desenvolvida por Nishizawa, Sakai e Amano (1993). Apesar de ser mais viscosa que as outras soluções, dificultando a pipetagem, ela é menos tóxica do que a PVS2, por não possuir DMSO e etilenoglicol em sua composição (MATSUMOTO; NIINO, 2017).

Quadro 4 - Principais soluções de vitrificação utilizadas na criopreservação de plantas

Solução	Composição	Referência
Solução de Steponkus	EG (7 M) + Sorbitol (0,88 M) + Albumina (6%)	LANGIS et al., 1989
PVS	Glicerol (22%) + EG (13%) + Propileno glicol (13%) + DMSO (6%)	URAGAMI, SAKAI, NAGAI, 1990
PVS2	Glicerol (30%) + EG (15%) + DMSO (15%) + Sacarose (0,4 M)	SAKAI et al., 1990
PVS3	Glicerol (50%) + Sacarose (50%)	NISHISZAWA, SAKAI, AMANO, 1993
PVS4	Glicerol (35%) + EG (20%) + Sacarose (0,6 M)	SAKAI, 2000
VSL	Glicerol (20%) + EG (30%) + Sacarose (5%) + DMSO (10%) + CaCl ₂ (10 mM)	SUZUKI et al., 2008

Diferentes técnicas de criopreservação vegetal já foram desenvolvidas nos últimos 30 anos e os estudos aplicando essas técnicas têm mostrado resultados promissores, sendo algumas já utilizadas para a conservação em larga escala de diferentes espécies vegetais (ENGELMANN, 2011). A técnica de dessecação, que consiste na redução do conteúdo hídrico do material pela exposição à sílica gel ou a corrente de ar em câmara de fluxo laminar antes do resfriamento, e a técnica de vitrificação, na qual a desidratação do material ocorre pela exposição a soluções de vitrificação antes da imersão em NL (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAM, 1990), têm sido as mais utilizadas, geralmente associadas à técnica de encapsulamento, na qual o material vegetal é envolvido por uma matriz de alginato de cálcio. Além da conferir proteção física ao explante contra os efeitos da desidratação excessiva e do resfriamento, o encapsulamento facilita ainda a manipulação do material (FABRE; DEREUDDRE, 1990; MATSUMOTO; SAKAI, 1995).

Recentemente, as técnicas de vitrificação e desidratação em placas de alumínio (crioplacas) têm sido aplicadas com sucesso a uma variedade de materiais vegetais e espécies de regiões temperadas e tropicais (NIINO et al., 2013, 2017; YAMAMOTO et al., 2011). Nessas técnicas, os explantes são fixados nas crioplacas com pequenas gotas de solução de alginato de cálcio e, em seguida, expostos às soluções de vitrificação (V-Crioplaca) ou à evaporação física (D-Crioplaca), antes da imersão em NL. Uma das vantagens dessa técnica está relacionada às rápidas taxas de resfriamento ($4000 - 5000^{\circ}\text{C min}^{-1}$) e aquecimento ($3000 - 4500^{\circ}\text{C min}^{-1}$) do material, devido à alta condutividade térmica do alumínio e ao contato direto dos explantes com o NL e com a solução de *unloading*, que possibilita a reidratação do material, durante o aquecimento, favorecendo a sobrevivência e a recuperação dos explantes criopreservados (KULUS; ZALEWSKA 2014; NIINO et al., 2017). Além disso, a adesão do material vegetal às placas de alumínio permite a manipulação de vários explantes simultaneamente, evitando perdas e injúrias durante as diferentes etapas do processo (NIINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2012).

Contudo, apesar dos tratamentos que visam à proteção dos tecidos durante a criopreservação, possíveis danos podem ocorrer nos materiais criopreservados, incluindo a peroxidação de lipídios, rupturas de membranas, alterações em proteínas e ácidos nucleicos, além de eventos desencadeadores de apoptose (BENSON, 1990). Esses danos estão associados ao estresse oxidativo causado pelas condições *in vitro* e podem levar a baixas taxas de recuperação após o resfriamento e à indução de alterações celulares, moleculares e metabólicas que podem vir a comprometer a eficiência dos protocolos. Desta forma, a elucidação dos aspectos celulares e fisiológicos envolvidos na indução das crioinjúrias, assim

como o monitoramento da estabilidade molecular e metabólica após a criopreservação são considerados de fundamental importância para assegurar a manutenção da integridade física e da capacidade produtora dos materiais criopreservados.

A caracterização e compreensão dos efeitos da desidratação osmótica, do resfriamento e das condições de recuperação na integridade celular e na organização dos tecidos dos materiais criopreservados vem sendo realizadas por meio de análises histológicas. Dessa forma, é possível determinar as etapas críticas dos protocolos de criopreservação, e otimizar estes tratamentos com o uso de substâncias antioxidantes (BARRACO et al. 2013; SALMA et al., 2013).

Para materiais biotecnológicos produtores de substâncias de interesse, outra importante maneira de avaliar a manutenção das características após a criopreservação é por meio do monitoramento da capacidade biossintética. Para isso, a produção de substâncias bioativas pelos materiais criopreservados é comparada à dos materiais obtidos *in vitro* ou mantidos sob condições naturais, por meio de análises cromatográficas, como a CCD e a CLAE, e/ou pela comparação de suas atividades biológicas.

No gênero *Passiflora*, a criopreservação é considerada uma medida adicional importante para a prevenção da erosão genética e para o armazenamento dos materiais biotecnológicos produtores de metabólitos secundários. Nos últimos anos, essa estratégia vem sendo utilizada para o armazenamento de sementes e propágulos vegetativos, de forma complementar aos bancos de sementes tradicionais e à manutenção no campo ou em casas de vegetação, nos quais as perdas são praticamente inevitáveis, devido a doenças e ao custo da manutenção da coleção.

Estudos para a criopreservação de sementes de *Passiflora* têm como principais objetivos a determinação das taxas de tolerância à desidratação, assim como o teor hídrico adequado para o armazenamento. A tolerância à dessecação e ao resfriamento das sementes de *P. pinnatistipula*, *P. tarminiana* e *P. molíssima* foi descrita por González-Benito e colaboradores (2009). Veiga-Barbosa e colaboradores (2013) avaliaram a taxa de germinação de 10 espécies de *Passiflora* (*P. alata*, *P. cincinnata*, *P. coriacea*, *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. foetida*, *P. gibertii*, *P. micropetala*, *P. morifolia*, *P. mucronata* e *P. nitida*) após a desidratação e armazenamento em NL, observando que a maioria das sementes apresentou tolerância à desidratação e que a porcentagem de germinação não foi afetada pela criopreservação. Mais recentemente, Araújo e colaboradores (2016) descreveram a germinação de *P. mucronata*, *P. micropelata*, *P. suberosa* e *P. edulis* após quatro diferentes tratamentos para criopreservação, obtendo alta porcentagem de germinação após o

resfriamento sem o tratamento com crioprotetores. Entretanto, devido à contínua destruição de habitats pela ação antrópica, há uma maior dificuldade de obtenção de sementes de populações silvestres de *Passiflora*, levando a uma necessidade maior de desenvolver estudos visando à criopreservação de propágulos vegetativos, como ápices caulinares e segmentos nodais (PACHECO et al., 2016).

Nesse sentido, foram estabelecidas metodologias para a criopreservação de ápices caulinares e de segmentos nodais de *P. foetida*, *P. suberosa* e *P. pohlii* (FALCÃO, 2011; GARCIA et al., 2011; MERHY et al., 2014, VIANNA, 2016). Falcão (2011) utilizou a técnica de encapsulamento-vitrificação para ápices caulinares de *P. foetida* e obteve maior taxa de recuperação (60%) em explantes tratados com PVS2 por 120 minutos, quando comparados com explantes tratados com PVS3, os quais não apresentaram recuperação após imersão em NL. A criopreservação de ápices caulinares de *P. suberosa* utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação resultou em 28% de recuperação dos explantes após pré-cultura em sacarose a 0,3 M por 24 h, tratamento com PVS2 por 60 minutos e incubação em meio MSM suplementado com BAP a 0,44 μ M, no escuro, por 60 dias após o reaquecimento (GARCIA et al., 2011). Mais recentemente, Vianna (2016) utilizou a técnica de V-Crioplaca para a criopreservação desses mesmos explantes, tendo obtido uma porcentagem de recuperação de 60% após tratamento com PVS3 por 90 minutos.

Embora segmentos nodais não sejam utilizados com frequência para criopreservação devido ao seu maior tamanho e elevado grau de diferenciação dos tecidos, o que pode dificultar a penetração dos crioprotetores no interior das células, Merhy e colaboradores (2014) desenvolveram um protocolo eficiente para a criopreservação de segmentos nodais de *P. pohlii* utilizando a técnica de vitrificação. Foi obtida uma alta taxa de recuperação (65%) para os explantes tratados com PVS3 por 30, 60 e 120 minutos e incubados em meio MSM suplementado com BAP a 30,8 μ M, no escuro, por 30 dias, com posterior transferência para a presença de luz. A estabilidade genética das plantas recuperadas foi ainda avaliada por meio de marcadores RAPD e ISSR, não tendo sido encontrados polimorfismos nas regiões genômicas analisadas (MERHY et al., 2014).

Recentemente, um novo método foi desenvolvido para a criopreservação de embriões zigóticos de *P. edulis*, denominado vitrificação por infiltração a vácuo (*Vacuum Infiltration Vitrification* - VIV), que permite a penetração rápida e uniforme da solução de vitrificação no explante, resultando em uma recuperação eficiente após o resfriamento (NADARAJAN; PRITCHARD, 2014).

No entanto, apesar dos diversos protocolos já estabelecidos nos últimos anos para a criopreservação de diferentes tipos de explantes e genótipos de *Passiflora* (Quadro 5), ainda há a necessidade de mais estudos, principalmente visando à caracterização do material conservado (PACHECO et al., 2016).

Quadro 5 – Protocolos de criopreservação desenvolvidos para espécies de *Passiflora* nos últimos 15 anos

Espécies	Material Vegetal	Referências
<i>P. nitida</i> ; <i>P. serrato-digitata</i> ; <i>P. edulis</i>	Sementes	MELETTI et al., 2007
<i>P. pinnatistipula</i> ; <i>P. tarminiana</i> ; <i>P. molíssima</i>	Sementes	GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009
<i>P. suberosa</i>	Ápices Caulinares	GARCIA et al., 2011
<i>P. foetida</i>	Ápices Caulinares	FALCÃO, 2011
<i>Passiflora</i> spp.	Sementes	VEIGA-BARBOSA et al., 2013
<i>P. pohlii</i>	Segmentos Nodais	MERHY et al., 2014
<i>P. suberosa</i>	Ápices Caulinares	VIANNA, 2016
<i>P. mucronata</i> , <i>P. micropelata</i> , <i>P. suberosa</i> , <i>P. edulis</i>	Sementes	ARAÚJO et al., 2016

Considerando a recente descrição da presença de saponinas em extratos de raízes de plantas mantidas em condições naturais e obtidas *in vitro* de *P. pohlii* (SIMÃO et al., 2016), o objetivo desta parte do trabalho foi estabelecer uma metodologia de criopreservação para ápices radiculares excisados de plantas *in vitro* utilizando a técnica de V-Crioplaca. Foi também realizada a análise de possíveis alterações anatômicas ocorridas durante diferentes etapas do protocolo, assim como a comparação da capacidade biossintética dos materiais criopreservados e não-criopreservados, visando caracterizar, respectivamente, injúrias celulares e alterações metabólicas induzidas pelo protocolo de criopreservação.

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Criopreservação de segmentos radiculares utilizando a técnica de V-Crioplaca

Ápices radiculares, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram excisados de plantas de *P. pohlii* propagadas *in vitro* (MERHY, 2014) e pré-cultivados em meio MSM líquido contendo sacarose a 0,3 M e suplementado com ácido indolacético (AIA) a 5,7 μ M (SIMÃO et al., 2016). Os explantes foram mantidos sob agitação (100 rpm), por 24 h, na ausência de luz. Após a pré-cultura, os segmentos radiculares foram transferidos para placas de alumínio, como descrito por Yamamoto e colaboradores (2011). Para adaptar o protocolo para explantes radiculares, foram produzidas novas crioplacas de aço inox (7 mm largura \times 37mm comprimento \times 0,5 mm espessura), contendo apenas um poço longo (Figura 17).

Figura 17 - Crioplacas desenvolvidas para a criopreservação de explantes radiculares



A adesão dos explantes nas placas (2 a 3 explantes/placa) foi realizada utilizando-se as soluções de alginato de sódio a 3% e CaCl_2 a 100 mM. Primeiramente, os poços das placas foram parcialmente preenchidos com 200 μ L de solução de alginato de sódio (preparada em meio MSM livre de cálcio). Os explantes eram então colocados nos poços e cobertos com solução de CaCl_2 a 100 mM (preparada em meio MSM), até completar o volume. Após 15 minutos de polimerização, o excesso de solução de CaCl_2 foi retirado com o auxílio de pipeta e as placas foram secas em papel de filtro (Whatman® n°1). Para o tratamento de osmoproteção, as placas foram imersas em solução de *loading* (meio MSM + glicerol a 2,0 M

+ sacarose a 0,4 M) por 20 minutos, a 25°C. Em seguida, foram transferidas para as soluções PVS2 (a 0°C) ou PVS3 (a 25°C) por diferentes períodos (0, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos). O resfriamento ocorreu por imersão direta das placas contendo os explantes radiculares em criotubos preenchidos com NL, onde foram mantidos por, pelo menos, 1 hora. Para o reaquecimento, as crioplacas foram retiradas do NL e rapidamente transferidas para 20 mL de solução de *unloading* (meio MSM líquido + sacarose a 1,2 M), a 25°C, por 20 minutos. Após este período, os segmentos radiculares foram retirados das placas com o auxílio de um bisturi, secos em discos de papel de filtro (Whatman® nº1) e inoculados em frascos de cultura (5,8 cm x 5,8 cm) contendo 20 mL de meio de recuperação (MSM sólido suplementado com AIA a 5,7 µM). Os segmentos radiculares criopreservados foram mantidos em ausência de luz, por 60 dias.

A avaliação da eficiência do processo de criopreservação foi realizada pela aferição das porcentagens de sobrevivência e recuperação do material vegetal 30 e 60 dias após o reaquecimento, respectivamente. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência, foram considerados os explantes não oxidados, enquanto para a recuperação, foram considerados aqueles que deram origem a raízes laterais.

4.1.2 Caracterização histológica dos segmentos radiculares submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

As alterações celulares ocorridas durante as diferentes etapas do protocolo de criopreservação de explantes radiculares de *P. pohlii* por V-Crioplaca foram analisadas por microscopia óptica nos seguintes materiais:

- i) Explantes submetidos à pré-cultura (pré-cultura);
- ii) Explantes pré-cultivados e expostos à solução de *loading* (LS);
- iii) Explantes pré-cultivados e expostos às soluções de *loading* e *unloading* (LS + ULS);
- iv) Explantes pré-cultivados e tratados com solução de vitrificação (PVS);
- v) Explantes pré-cultivados e expostos às soluções de *loading*, PVS e *unloading*, mas não criopreservados (PVS -NL);
- vi) Explantes pré-cultivados e imersos diretamente em NL (NL);
- vii) Explantes pré-cultivados, expostos às soluções de *loading* e PVS antes da imersão em NL e reaquecimento em solução de *unloading* (PVS +NL).

Para as análises histológicas, os materiais foram fixados, emblocados em resina, seccionados e corados, de acordo com Salma e colaboradores (2013). As amostras foram fixadas por cinco dias a 4°C em tampão fosfato contendo paraformaldeído a 10%, glutaraldeído a 1% e cafeína a 1%. Após resfriamento em NL, os segmentos radiculares foram fixados após 2, 5, 7, 15 e 30 dias de cultura em meio de recuperação, no escuro. Os materiais foram desidratados em série etanólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100 % v/v) a 4°C, com trocas a cada hora. Em seguida, as amostras foram transferidas para solução de etanol/butanol (50% - 50%) por 24 h a 4°C, e então para butanol a 100%, por quatro dias. Finalmente, as raízes foram transferidas para solução de butanol-resina por 24 h e resina a 100% por 72 h, antes da inclusão em blocos de resina. Para cada bloco, foram feitos cerca de 50 cortes de 4 µm de espessura, utilizando-se um micrótomo automático (Micrótomo MICROM HM3CS).

A coloração foi realizada utilizando PAS (ácido periódico-reativo de Schiff) e NAP (naftol azul preto), permitindo a visualização de polissacarídeos e proteínas, que se coram de vermelho e azul, respectivamente.

As imagens foram processadas utilizando o programa QCapture pro 5.1 (QImaging®, Canadá) e as análises qualitativas e quantitativas das células das regiões do córtex, endoderme e periciclo do tecido radicular, incluindo níveis de plasmólise, foram realizadas utilizando o programa de livre acesso Image-J, desenvolvido pelo National Institute of Health, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Esses ensaios foram realizados no *Institut de Recherche pour le Développement* (DIADÉ/IRD) (Montpellier – França), sob a orientação do Dr. Florent Engelmann e com a colaboração da pesquisadora Myriam Collin.

4.1.3 Preparo de extratos vegetais

Para a análise por CCD foram preparados extratos de raízes de plantas mantidas *in vitro* e de raízes criopreservadas, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.

4.1.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a caracterização fitoquímica dos extratos, foram utilizados diferentes sistemas de CCD, como descritos no item 4.2.4.2.

4.1.5. Análise estatística

Os ensaios de criopreservação foram repetidos três vezes, com 10 explantes por tratamento em cada repetição. Os dados experimentais obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). As médias foram diferenciadas estatisticamente por meio do teste de Tukey a um nível de significância de $p \leq 0,05$, utilizando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc).

Os dados obtidos pelas análises histológicas foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc). A comparação das alterações ocorrida nas etapas do protocolo de criopreservação, nas células das três zonas teciduais estudadas, foi realizada por ANOVA One-way. As médias foram diferenciadas estatisticamente por meio do teste de Tukey a um nível de significância de $p \leq 0,05$. Para cada área celular e condição experimental, os dados corresponderam à medição de 50 células (10 lâminas x 1 raiz x 5 células).

4.2 **Resultados**

4.2.1 Criopreservação de segmentos radiculares utilizando a técnica de V-Crioplaca

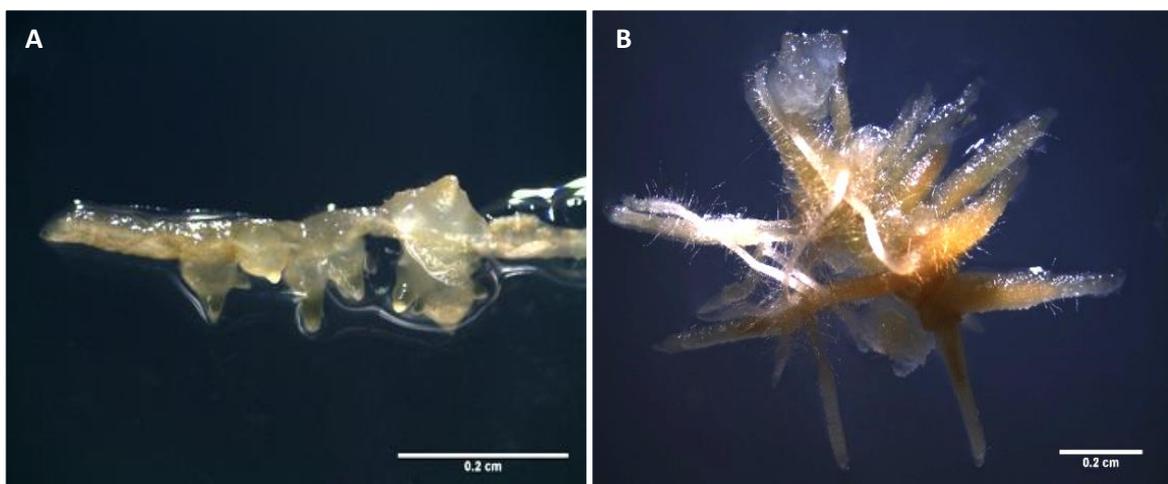
Para a criopreservação de segmentos radiculares de *P. pohlii* utilizando a técnica de V-Crioplaca foram avaliadas a influência da exposição a duas soluções crioprotetoras (PVS2 e PVS3), por diferentes períodos.

Explantes criopreservados e não criopreservados apresentaram 100% de sobrevivência, independente da solução crioprotetora utilizada (Tabela 3). Entretanto, explantes não tratados com PVS2 ou PVS3 não sobreviveram à exposição ao NL. A recuperação foi significativamente mais baixa, quando comparada com a sobrevivência. O alongamento do explante inicial e/ou formação de raízes laterais foram observados aproximadamente sete dias após transferência para meio de recuperação.

O tipo de solução de vitrificação desempenhou um importante papel na capacidade de recuperação de explantes criopreservados e não-criopreservados, sendo a taxa obtida após exposição à PVS2 mais alta que a observada com PVS3 (Tabela 3). Explantes tratados com PVS2, mas não criopreservados, apresentaram taxas de recuperação entre 81 e 35%, enquanto aqueles tratados com PVS3 apresentaram frequências de recuperação entre 50 e 22%. Entre os explantes criopreservados, a maior taxa de recuperação (79%) foi observada nos que foram tratados com PVS2 por 45 minutos, decrescendo progressivamente até 30%, após 120 minutos de exposição. Nos tratamentos com PVS3, a maior taxa de recuperação (43%) foi observada após 90 minutos de exposição, apesar de não diferir significativamente dos explantes tratados por 30 e 60 minutos (40 e 37%, respectivamente) (Tabela 3).

A formação de raízes adventícias a partir dos explantes criopreservados ocorreu, inicialmente, apenas a partir dos explantes tratados com PVS2 (Figura 18). As raízes tratadas com PVS3 apresentaram, inicialmente, o alongamento do explante original, 10 dias após o reaquecimento, seguido pela formação de raízes adventícias, que eram mais espessas e amareladas do que aquelas recuperadas após o tratamento com PVS2. O número máximo de raízes adventícias (4,44 raízes por explante) foi observado nos materiais expostos por 45 minutos à PVS2, antes da imersão em NL (Tabela 3).

Figura 18 – Segmentos radiculares de *P. pohlii* criopreservados utilizando o protocolo de V-Crioplaca, após tratamento com PVS2 por 45 minutos e cultivo em meio de recuperação MSM sólido suplementado com AIA a 5,7 μ M, por 30 dias, na ausência de luz



Legenda: A) após 7 dias de cultura; B) após 30 dias de cultura. Barra = 0,2 cm.

Tabela 3 - Sobrevivência e recuperação de segmentos radiculares de *P. pohlii* criopreservados utilizando a técnica de V-Crioplaca, após 60 dias de cultura em MSM sólido suplementado com AIA a 5,7 μM , na ausência de luz

Tratamento	Duração (min)	Sobrevivência (%)		Recuperação (%)		Nº de raízes/ explante	
		NL -	NL +	NL -	NL +	NL -	NL +
PVS 2	0	100	0	95 \pm 0.63 ^a	0 \pm 0.00 ^c	5.92 \pm 0.36 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c
	30	100	100	72 \pm 0.48 ^b	66 \pm 0.31 ^{ab}	3.73 \pm 0.39 ^a	2.52 \pm 0.29 ^b
	45	100	100	81 \pm 0.33 ^a	79 \pm 0.44 ^a	4.57 \pm 0.35 ^a	4.44 \pm 0.36 ^a
	60	100	100	65 \pm 0.24 ^{bc}	60 \pm 0.55 ^b	3.53 \pm 0.37 ^a	2.14 \pm 0.27 ^b
	90	100	100	52 \pm 0.58 ^c	50 \pm 0.21 ^b	2.11 \pm 0.26 ^a	2.00 \pm 0.29 ^b
	120	100	100	35 \pm 0.25 ^d	30 \pm 0.08 ^b	2.85 \pm 0.50 ^a	2.28 \pm 0.60 ^b
PVS 3	0	100	0	80 \pm 0.22 ^a	0 \pm 0.00 ^c	3.81 \pm 0.34 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c
	30	100	100	50 \pm 0.34 ^a	40 \pm 0.31 ^{ab}	3.11 \pm 0.30 ^a	2.38 \pm 0.18 ^b
	45	100	100	30 \pm 0.54 ^b	28 \pm 0.09 ^b	2.66 \pm 0.33 ^b	2.66 \pm 0.40 ^b
	60	100	100	50 \pm 0.10 ^a	37 \pm 0.25 ^a	2.89 \pm 0.26 ^b	2.89 \pm 0.31 ^b
	90	100	100	39 \pm 0.24 ^b	43 \pm 0.32 ^a	1.85 \pm 0.34 ^b	2.43 \pm 0.20 ^b
	120	100	100	22 \pm 0.16 ^c	25 \pm 0.44 ^b	1.50 \pm 0.28 ^b	1.50 \pm 0.28 ^{bc}

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

4.2.2. Caracterização histológica dos segmentos radiculares submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

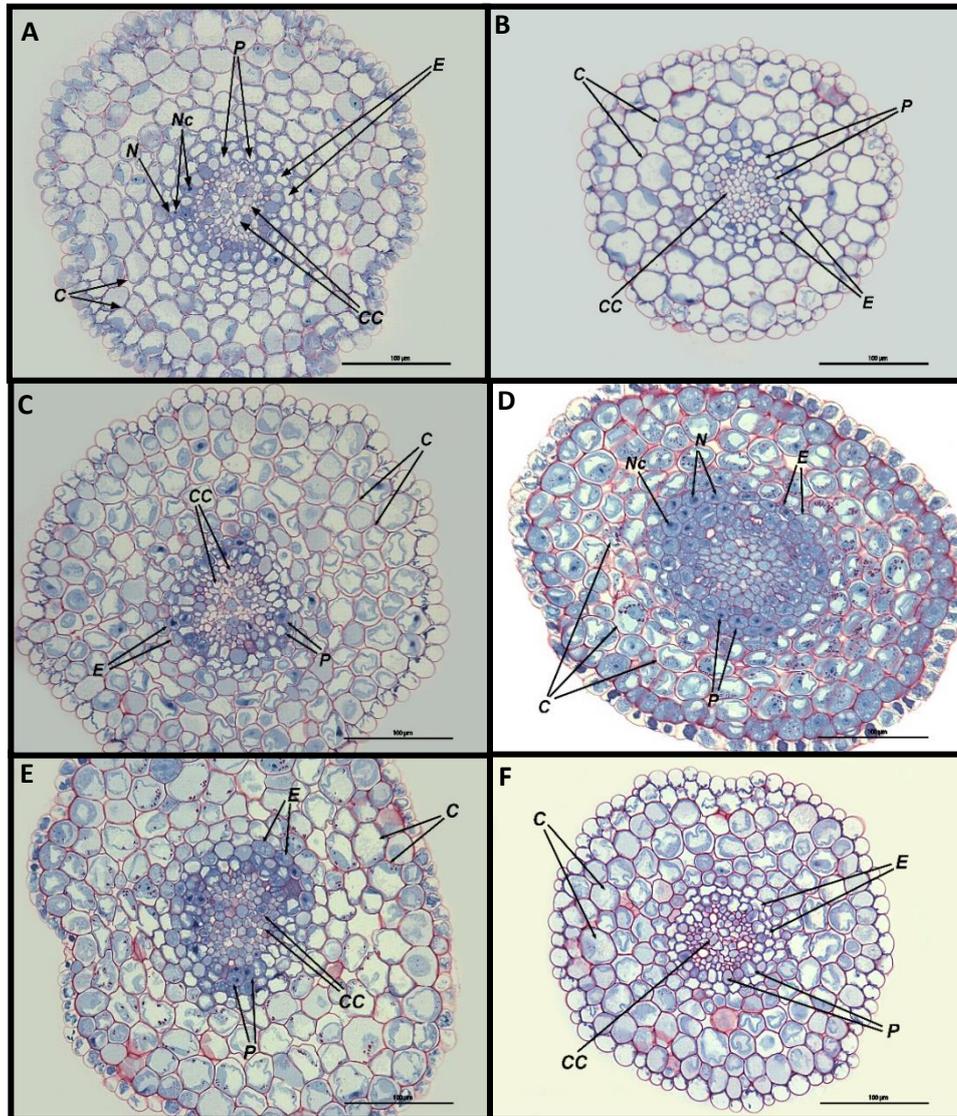
4.2.2.1. Análise qualitativa

Células corticais de raízes excisadas de plantas propagadas *in vitro* e não submetidas ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca eram arredondadas, com a maior parte do volume celular ocupado pelo citoplasma. Os núcleos eram evidentes, com nucléolos visíveis. Células da endoderme e do periciclo também exibiram formas redondas, com coloração azul intensa, indicando uma alta concentração de proteínas. Vasos do xilema e floema foram observados nas células do cilindro central (Figura 19A).

Após o pré-tratamento com sacarose a 0,3 M, as células corticais eram maiores, quando comparadas com aquelas não tratadas, embora não tenha sido observado nenhum tipo de dano ou plasmólise. Além disso, as células mais internas apresentaram coloração azul menos intensa, o que corresponde a uma diminuição na concentração de proteínas (Figura 19B). Após a exposição à solução de *loading*, foi observado um aumento na taxa de plasmólise, especialmente nas células corticais, com a retração do protoplasto, que se encontrava separado da parede celular. Os núcleos também perderam a forma arredondada, enquanto a região do periciclo sofreu menos alterações (Figura 19C). Explantes tratados com as soluções de *loading* e *unloading* apresentaram plasmólise nas células do córtex e da endoderme, além de leve ondulação nas paredes celulares. Não foram observadas modificações nas células do periciclo.

O tratamento com PVS2 induziu plasmólise apenas nas células corticais, que também apresentaram um aumento no acúmulo de amido, indicado por pontos vermelhos nas células. Células da endoderme e do periciclo não foram afetadas e apresentaram coloração azul intensa. Núcleos e nucléolos dessas células apresentaram formas normais, com o nucleoplasma condensado (Figura 19D). Após o resfriamento e reaquecimento em solução de *unloading*, explantes tratados com PVS2 apresentaram plasmólise apenas na região cortical, enquanto células da endoderme e do periciclo permaneceram intactas (Figura 19E). Em contraste, segmentos radiculares tratados com PVS2 e expostos à solução de *unloading*, mas não criopreservados, mantiveram as características similares àquelas dos explantes expostos apenas à PVS2 (Figura 19F).

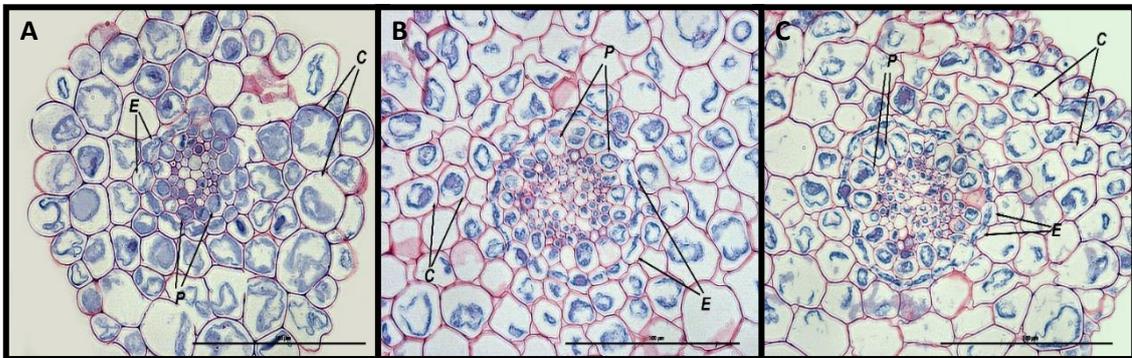
Figura 19 - Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* após diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca



Legenda: A) Controle não tratado; B) Após pré-tratamento com sacarose a 0,3 M; C) Após pré-cultura e tratamento com solução de *loading*; D) Após pré-cultura e exposição às soluções de *loading* e PVS2; E) Após pré-cultura, exposição às soluções de *loading* e PVS2 e imersão em NL; F) Após tratamento com PVS2 - NL. P - periciclo, E - endoderme, CC - cilindro central, N - núcleo, Nc - nucléolo, C - córtex. Barra = 100µm.

Raízes tratadas com PVS3 apresentaram plasmólise em células da região cortical, da endoderme e do periciclo, com as paredes celulares de algumas células ligeiramente ondulada (Figura 20A). Não foram observadas diferenças na forma das células e plasmólise entre explantes tratados com essa solução crioprotetora e submetidos ou não à criopreservação (Figuras 20B e C).

Figura 20 – Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* após tratamento com PVS3



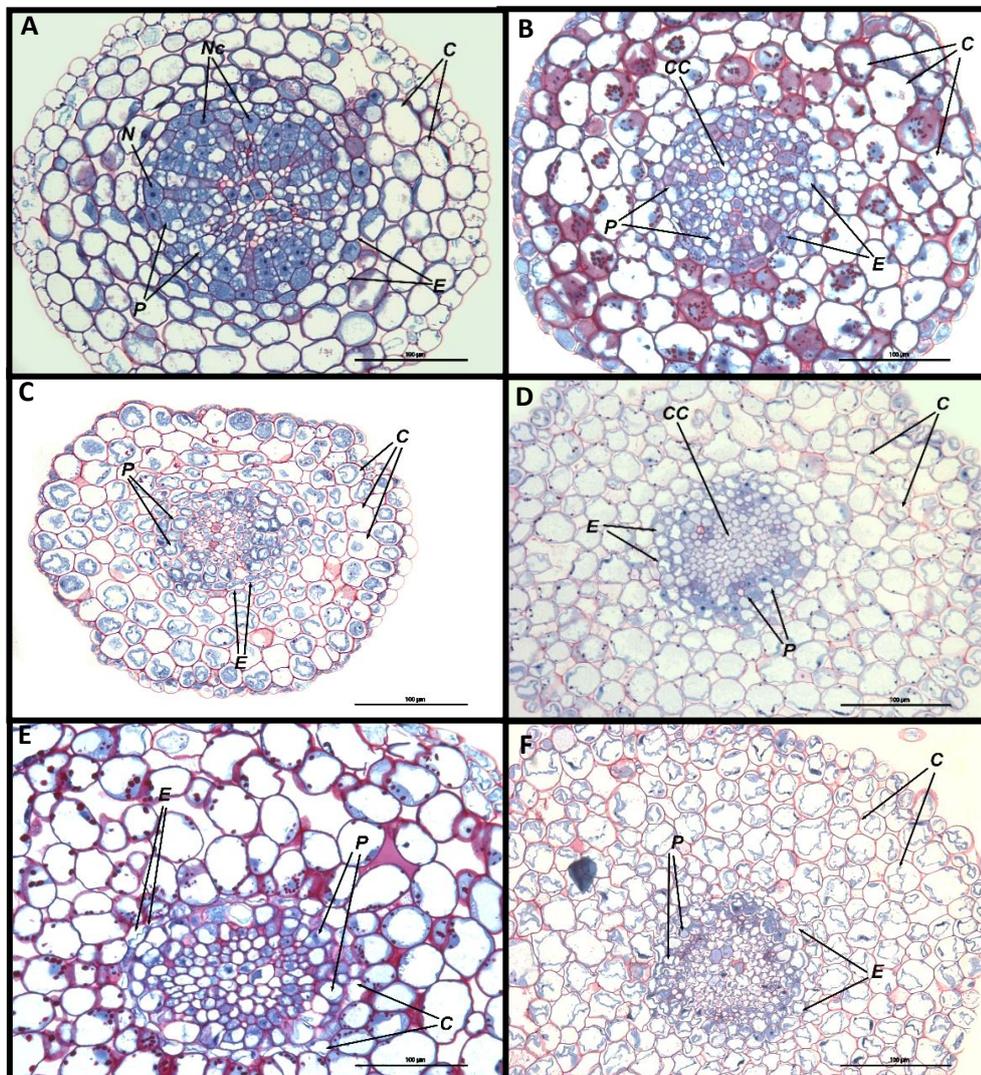
Legenda: A) Após tratamento com PVS3; B) Após tratamento com PVS3 + NL; C) Após tratamento com PVS3 - NL (com tratamento de solução de *unloading*). Barra = 100µm.

Dois dias após o reaquecimento, células dos explantes pré-cultivados e expostos às soluções de *loading* e *unloading* apresentaram uma diminuição da plasmólise (Figura 21A), enquanto células plasmolisadas puderam ainda ser observadas em explantes tratados com PVS2, criopreservados ou não, especialmente nas regiões do córtex e da endoderme (Figuras 21B e C). Não foram observadas alterações nos explantes tratados com PVS3. Após cinco dias e cultura em meio de recuperação, nenhuma alteração foi observada nos explantes expostos às soluções de *loading* e *unloading*, e também nas raízes tratadas com PVS2 (Figuras 21D-F).

Após sete dias de cultura em meio de recuperação, foi observada uma diminuição substancial na plasmólise de explantes criopreservados, com exceção das células corticais (Figura 22A). O nucleoplasma tornou-se mais condensado novamente, com os nucléolos retomando a sua forma redonda original, em todas as regiões estudadas, independente do

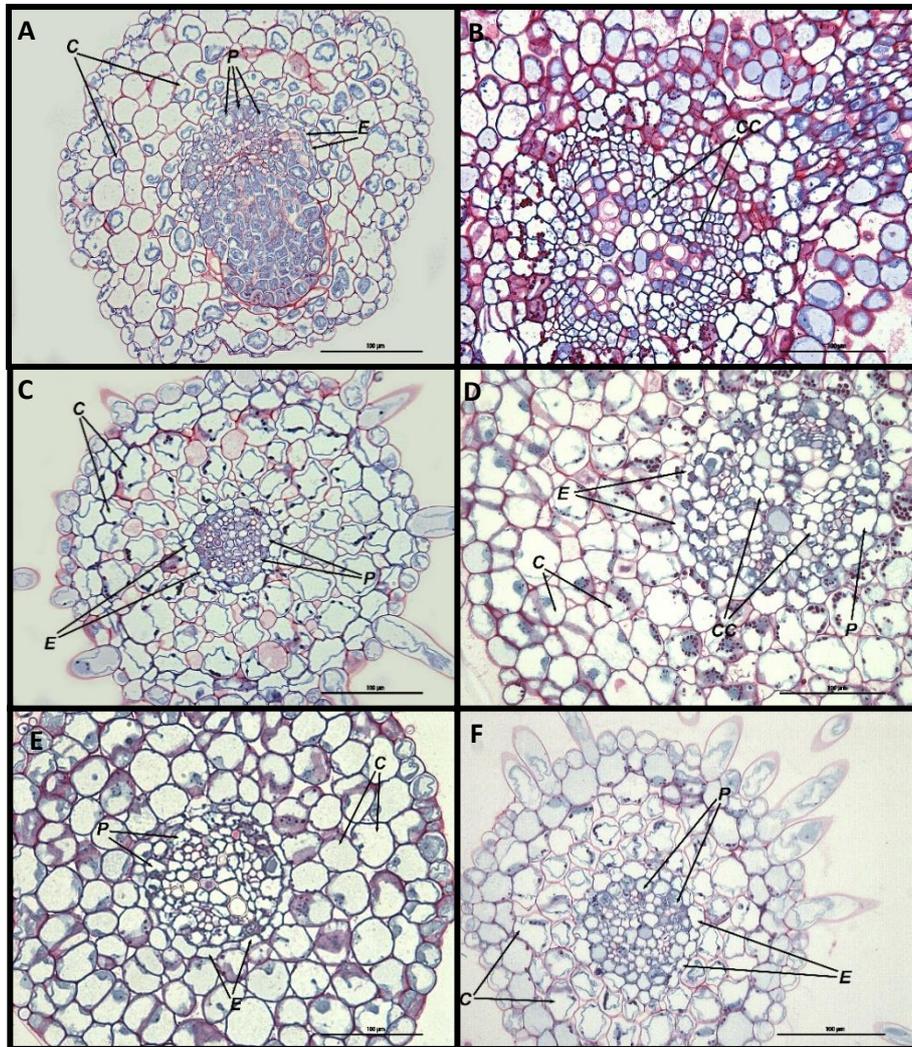
tratamento. Após 15 dias de cultura, foi observado o crescimento de tricomas unicelulares na epiderme das raízes, incluindo as que passaram pela criopreservação (Figura 22B e C). Foram também observadas células plasmolisadas na região cortical, especialmente nas raízes expostas às soluções de *loading* e *unloading*. Trinta dias após o reaquecimento, todos os explantes, criopreservados ou não, apresentaram a mesma organização dos tecidos quando comparados aos controles, sendo a plasmólise observada apenas na epiderme (Figura 22D-F).

Figura 21 - Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* submetidos às diferentes etapas dos protocolos de criopreservação por V-Crioplaca após 2 e 5 dias de cultura em meio de recuperação (MSM + AIA a 5,7 μ M)



Legenda: A – C) Após 2 dias de cultura: A) Controle não tratado; B) Após tratamento com soluções de *loading* + *unloading*; C) Após tratamento com PVS2 + NL. D – F) Após 5 dias de cultura: D) Após tratamento com soluções de *loading* + *unloading*; E) Após tratamento com PVS2 + NL; F) Após tratamento com PVS2 - NL. Barra = 100 μ m.

Figura 22 – Secções histológicas de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* submetidos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação por V-Crioplaca, após 7, 15 e 30 dias de cultura em meio de recuperação (MSM + AIA a 5,7 μ M)



Legenda: A) Sete dias de cultura após tratamento com PVS2 + NL; B – C) Após 15 dias de cultura: B) Controle não tratado; C) Após tratamento com PVS2 + NL; D – F) Após 30 dias de cultura: D) Após tratamento com soluções de *loading* + *unloading*; E) Após tratamento com PVS2 – NL; F) Após tratamento com PVS2 + NL. Barra = 100 μ m.

4.2.2.2. Análise quantitativa

As maiores taxas de plasmólise foram observadas em células corticais, independente da etapa do protocolo de criopreservação (Tabela 4). Nessas células, as menores taxas de

plasmólise foram observadas nas raízes não tratadas (6,21%) ou pré-cultivadas em meio suplementado com sacarose (0,07%). Por outro lado, os maiores valores de plasmólise foram observados nas raízes expostas à solução de *loading* (30,51%) e nos materiais criopreservados após tratamento com PVS2 (39,21%) (Tabela 4). Nas células da endoderme, a plasmólise foi maior (10,60 - 15,91%) após tratamento com solução de *loading*, tratamento com soluções de *loading + unloading* e tratamento com PVS2, enquanto que nas células do periciclo, a maior porcentagem de plasmólise (5,51 - 5,80%) foi observada após tratamento com solução de *loading* e tratamento com soluções de *loading + unloading* (Tabela 4).

Quando comparados os materiais criopreservados e mantidos em meio de recuperação por diferentes períodos, nenhuma ou pouca plasmólise foi observada nos controles e nas raízes expostas à solução de *loading*, independentemente do tipo celular (Tabela 4). Por outro lado, altas taxas de plasmólise foram observadas nas células do córtex (42,69 e 50,20%), endoderme (18,23 e 12,35%) e periciclo (13,91 e 0,412%) de raízes tratadas com PVS2, submetidas ou não à criopreservação, após dois dias de cultura (Tabela 4). As taxas de plasmólise decresceram rapidamente com o tempo de cultura nas células do periciclo e da endoderme, e mais vagarosamente nas células do córtex. Trinta dias após o reaquecimento, não foi observada plasmólise nas células, independentemente das condições experimentais (dados não mostrados).

Tabela 4 - Taxas de plasmólise nas células da região do córtex, da endoderme e do periciclo de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e submetidos ao protocolo de criopreservação por V-Crioplaca

Tempo de cultura em meio de recuperação*	Tratamentos	Plasmólise (%)		
		Córtex	Endoderme	Periciclo
0	Controle	6,21 ± 1,042 a	1,35 ± 0,260 a	0,90 ± 0,207a
	Pré-cultura	0,07 ± 0,369 a	0,21 ± 0,135 a	0,16 ± 0,085 a
	LS	30,51 ± 2,273 d	15,91 ± 3,264 b	5,80 ± 1,621 b
	LS+ULS	28,99 ± 3,401 c	13,29 ± 2,159 b	5,51 ± 1,686 b
	PVS2	16,29 ± 2,443 bc	10,60 ± 1,094 b	0,38 ± 0,077 a
	PVS2+NL	39,21 ± 5,129 d	2,43 ± 1,354 a	0,78 ± 0,534 a
	PVS2-NL	14,13 ± 3,636 bc	1,04 ± 0,686 a	0,00 ± 0,000 a
2	Controle	0,34 ± 0,335 a	0,00 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
	LS+ULS	0,47 ± 0,326 a	10,44 ± 3,765 ab	0,0 ± 0,00 a
	PVS2+NL	42,69 ± 6,555 b	18,23 ± 4,57 b	13,91 ± 3,236 b
	PVS2-NL	50,20 ± 5,001 b	12,35 ± 5,289 ab	0,412 ± 0,412 a
5	Controle	2,10 ± 0,5426 a	0,32 ± 0,315 a	0,165 ± 0,165 a
	LS+ULS	7,56 ± 2,265 a	2,90 ± 1,213 ab	0,305 ± 0,305 ab
	PVS2+NL	10,75 ± 4,644 a	10,98 ± 3,018 b	8,05 ± 3,172 b
	PVS2-NL	35,55 ± 3,945 b	11,42 ± 4,414 b	4,36 ± 2,402 ab
7	Controle	0,17 ± 0,170 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
	LS+ULS	14,14 ± 4,054 ab	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
	PVS2+NL	29,35 ± 6,442 b	7,77 ± 3,527 b	3,284 ± 1,988 a
	PVS2-NL	1,969 ± 1,327 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
15	Controle	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
	LS+ULS	12,88 ± 2,917 b	0,29 ± 0,286 a	0,00 ± 0,000 a
	PVS2+NL	1,91 ± 1,078 a	0,00 ± 0,000 a	0,20 ± 0,145 a
	PVS2-NL	1,15 ± 3,829 b	0,13 ± 0,136 b	0,00 ± 0,000 a

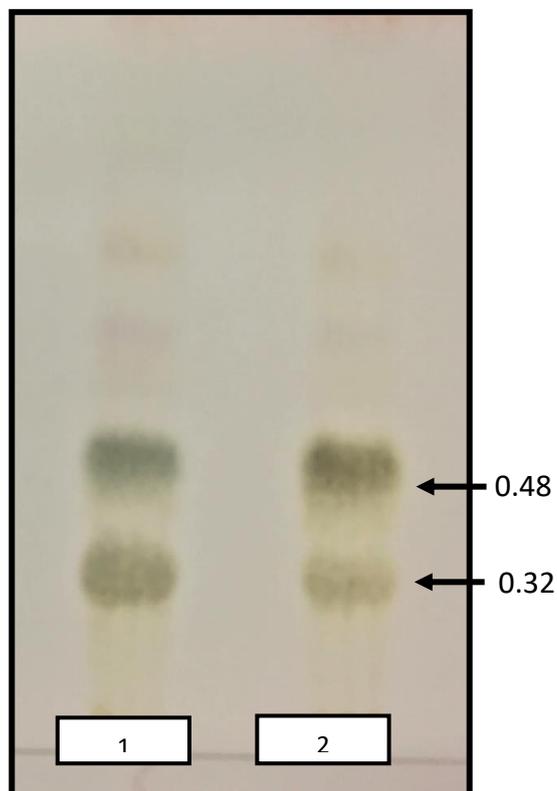
* Meio de recuperação = meio MSM + AIA a 5,7 µM.

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

4.2.3 Avaliação da capacidade biossintética

A análise comparativa por CCD dos extratos de raízes de plantas mantidas *in vitro* e raízes criopreservadas revelou a presença de duas bandas indicativas de saponinas, com coloração castanho escuro, com valores de R_F de 0.32 e 0.48, sem diferenças entre os padrões cromatográficos apresentados por ambos materiais (Figura 23). Por outro lado, não foram observadas manchas indicativas de flavonoides na placa revelada com NP/PEG 4000 (dados não mostrados).

Figura 23 - Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de raízes de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro* e raízes criopreservadas



Legenda: 1) Raízes excisadas de plantas mantidas *in vitro*;
2) Raízes submetidas à criopreservação pela técnica de V-Crioplaca.

4.3 Discussão

Como as condições *in vitro* estão associadas a condições de estresse que podem levar à perda da capacidade proliferativa e biossintética, no presente estudo foi desenvolvido um protocolo de armazenamento em longo prazo, por criopreservação, para segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii*. Além disso, foi também realizada a caracterização anatômica das alterações celulares induzidas durante a criopreservação e a avaliação da capacidade biossintética do material criopreservado, pela primeira vez no gênero.

Segmentos radiculares de *P. pohlii* foram criopreservados utilizando o protocolo de V-Crioplaca, visando à redução de possíveis danos causados pela manipulação dos explantes, observados em outros protocolos. Apesar da eficiência dessa técnica ser amplamente reconhecida para ápices caulinares (NIINO et al., 2017), este é o primeiro trabalho sobre criopreservação de ápices radiculares utilizando o método de V-Crioplaca.

O sucesso da utilização de segmentos apicais de raízes em protocolos de criopreservação pode ser atribuído à presença de uma grande quantidade de células meristemáticas nesta região, uma vez que estas células são mais tolerantes à desidratação e às mudanças na temperatura, e apresentam recuperação mais rápida em comparação com outros tipos celulares (KIM et al., 2012). Diversos estudos descreveram maiores taxas de recuperação de ápices radiculares em comparação com segmentos centrais após a criopreservação (BENSON; HAMILL, 1991; KIM et al., 2012; SALMA et al., 2013).

O ponto principal para o sucesso de um protocolo de criopreservação baseado em vitrificação é a remoção parcial ou completa da água intracelular, por meios físicos e/ou químicos de desidratação, para evitar a formação de cristais de gelo. Por essa razão, diferentes soluções de vitrificação foram desenvolvidas nos últimos anos, sendo as soluções PVS2 e PVS3 as mais comumente utilizadas (SAKAI; ENGELMANN, 2007). A principal diferença entre essas soluções é a presença de EG e DMSO na PVS2, duas substâncias crioprotetoras capazes de penetrar rapidamente na parede celular e nas membranas celulares. Estes crioprotetores, assim como o glicerol e o propileno glicol, induzem o afinamento da membrana, provocando uma desordem que resulta na formação espontânea de poros, aumentando então a taxa de difusão de outras substâncias crioprotetoras através da membrana. Contudo, a presença de DMSO em altas concentrações pode causar a destruição completa da membrana (HUGHES et al., 2013; HUGHES; MANCERA, 2014). Portanto, como a PVS3 é composta apenas por glicerol e sacarose, é geralmente utilizada como uma alternativa para espécies que são mais susceptíveis ao efeito citotóxico do DMSO.

A penetração dos crioprotetores também pode ser afetada pela quantidade de moléculas de esteróis, como o β -sitosterol e estigmasterol, incorporadas nas membranas de células vegetais, uma vez que a presença destes esteróis tem um efeito de condensação nos fosfolipídios, levando a um espessamento da membrana (HUGHES et al., 2013). Como o balanço entre fosfolipídios e esteróis pode variar substancialmente entre espécies e tecidos, o sucesso dos protocolos de criopreservação também depende da interação destes constituintes da membrana com as substâncias crioprotetoras presentes na solução de vitrificação, assim como suas concentrações, para evitar os seus efeitos citotóxicos (HUGHES et al., 2013; KIM et al., 2012). Neste trabalho, a maior porcentagem de recuperação observada após tratamento com PVS2, quando comparadas com as obtidas com PVS3, pode estar relacionada à presença de DMSO e EG, que permitiram uma penetração mais rápida dos crioprotetores, enquanto que PVS3 apresentou apenas um efeito osmótico que levou à ocorrência de plasmólise em todas as regiões estudadas, assim como ao aspecto ondulado da parede celular. Além disso, estes resultados podem estar associados a composição da membrana de ápices radiculares de *P. pohlii*, que provavelmente permitiram uma melhor interação com DMSO e outras substâncias, possibilitando seus efeitos crioprotetores, com baixa toxidez.

Outro importante aspecto estudado nesta parte do trabalho foi a caracterização histológica de danos celulares ocorridos durante as diferentes etapas do processo de criopreservação. Esse monitoramento pode ajudar a compreender como células diferentes respondem aos estresses de dessecação e resfriamento, como a peroxidação lipídica e a ruptura de membranas, resultando em baixas taxas de recuperação após imersão em NL, devido ao aumento da produção de ERO (BENSON, 1990). As análises qualitativas realizadas neste trabalho permitiram a observação de diferentes alterações celulares, dependendo da etapa do processo de vitrificação e nível de desidratação celular. Essas diferenças na resposta celular às soluções de vitrificação e à exposição ao NL podem ser atribuídas à localização, tamanho e outras características fisiológicas das células (VOLK; CASPERSEN, 2007), uma vez que células corticais mais externas foram mais danificadas do que células mais centrais (periciclo e cilindro central).

As maiores taxas de plasmólise em raízes de *P. pohlii* foram observadas após os tratamentos de *loading* e PVS2, antes e depois da criopreservação. Yap e colaboradores (2011) e Salma e colaboradores (2013) também relataram altas taxas de plasmólise após tratamento com solução de *loading* em ápices caulinares de *Garcinia cowa* e ápices radiculares de *Rubia akane*, respectivamente. Soluções de *loading* geralmente são compostas de glicerol e sacarose, sendo utilizadas em protocolos de vitrificação para induzir tolerância à

desidratação e minimizar o estresse osmótico que pode ser associado à exposição a soluções de vitrificação (KIM et al., 2012). Portanto, a concentração dos seus constituintes, bem como a duração do tratamento de *loading* pode afetar a recuperação de explantes criopreservados, uma vez que altas concentrações de glicerol podem ter efeito citotóxico e induzir danos irreversíveis na membrana celular, impedindo a regeneração das células (KIM; LEE, 2012; SAKAI; ENGELMANN, 2007).

Explantes criopreservados tratados com PVS2 apresentaram maiores taxas de plasmólise apenas nas células corticais, enquanto as células do periciclo e da endoderme não sofreram danos após este tratamento. Estas últimas regiões são caracterizadas pela presença de pequenas células meristemáticas, quando comparadas com as células do córtex. A sobrevivência de células pequenas após processos de criopreservação foi observada por diversos autores, utilizando diferentes tipos de materiais vegetais (RAHMAH et al., 2015; NAN et al., 2008; SALMA et al., 2013). Volk e Caspersen (2007) observaram que essas células, caracterizadas pela presença de pequenos vacúolos e uma coloração intensa do citoplasma, semelhante àquelas observadas no periciclo e cilindro central de raízes de *P. pohlii*, podem ser mais tolerantes ao estresse osmótico causado pela desidratação. De acordo com Sorin e colaboradores (2005), a formação de ambas raízes adventícias e raízes laterais são iniciadas nas células do periciclo, porém são controladas por diferentes vias regulatórias. Deste modo, a sobrevivência destas células permitiu a rápida recuperação e regeneração do material, bem como a formação de novas raízes adventícias a partir de explantes expostos às diferentes etapas do protocolo de criopreservação utilizando V-Crioplaca, confirmando assim a capacidade destas células de tolerar o estresse osmótico causado pelo processo de desidratação.

Embora a criopreservação seja considerada, atualmente, a estratégia mais indicada para a conservação em longo prazo de materiais biotecnológicos produtores de substâncias de interesse, a implementação de sistemas de monitoramento, principalmente da estabilidade molecular e metabólica dos materiais criopreservados, é considerada essencial para o sucesso dos protocolos de armazenamento.

Neste trabalho, a técnica de CCD foi utilizada para avaliar a manutenção da capacidade biossintética das raízes submetidas ao processo de criopreservação, uma vez que permite a obtenção de resultados mais rápidos, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução e interpretação (BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005). Como não foram observadas diferenças na produção de saponinas entre as raízes criopreservadas e aquelas excisadas de plantas *in vitro*, pode-se afirmar que o processo de criopreservação não

influenciou a estabilidade metabólica das raízes do ponto de vista qualitativo, preservando as características do material original.

Parte dos resultados desta etapa do trabalho constituem o artigo “**Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryoplate technique**”, publicado no periódico *Protoplasma*.

5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE *Passiflora pohlii* Mast.: COMPARAÇÃO COM ESPÉCIES DOS SUBGÊNEROS *DECALOPA* E *PASSIFLORA*

Introdução

Em países tropicais, os principais agentes causadores de doenças em humanos e animais são bactérias, fungos, vírus e nematoides, responsáveis por mais de 85% dos casos de óbitos. Entretanto, o uso indiscriminado de drogas antibióticas sintéticas para o tratamento dessas doenças está levando a um aumento no número de microrganismos resistentes. Além disso, a globalização levou a um aumento na mobilidade humana e do comércio em todo o mundo, o que vem contribuindo significativamente para a rápida disseminação de agentes infecciosos, incluindo aqueles resistentes a medicamentos (OMS, 2010).

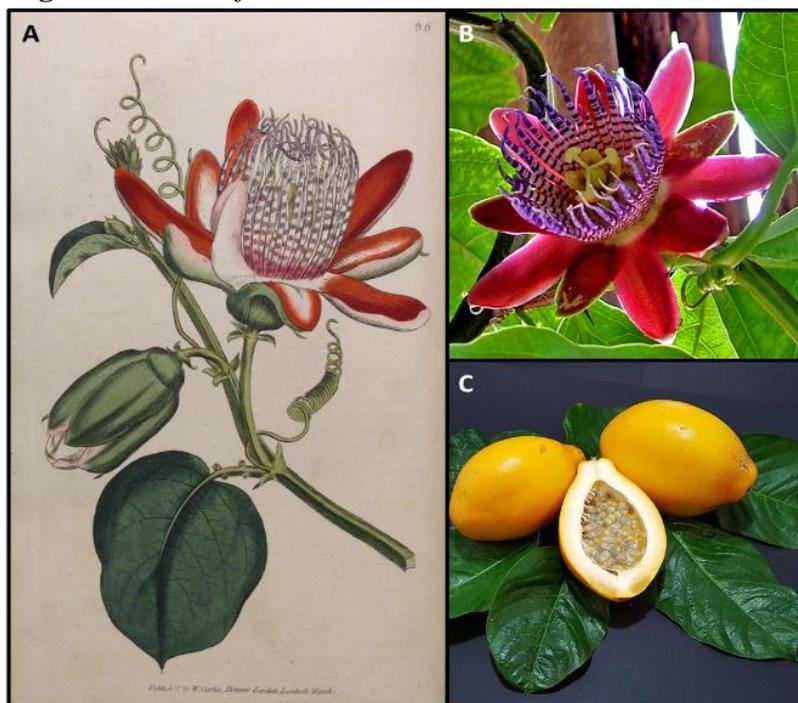
Uma vez que plantas medicinais podem constituir uma fonte alternativa de novos agentes antibióticos, diversos estudos têm sido realizados visando à descoberta de novas drogas, através da investigação do potencial de substâncias bioativas derivadas de plantas para o tratamento de várias doenças infecciosas (BAX et al., 2000; PAN et al., 2009). Muitas dessas substâncias já vem sendo utilizadas atualmente pela indústria farmacêutica, totalizando cerca de ¼ de todos os fármacos prescritos em países industrializados. Além disso, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% das 252 drogas consideradas básicas e essenciais são exclusivamente derivadas de plantas (OMS, 2010; OKSMAN-CALDENTEY; INZÉ, 2004; RATES 2001). Outro aspecto importante a ser considerado é que, em alguns casos, os substitutos sintéticos para essas substâncias não possuem a mesma eficácia e especificidade farmacológica que o fármaco original, para o tratamento de uma doença específica (OKSMAN-CALDENTEY; INZÉ, 2004; RAMACHANDRA; RAVISHANKAR, 2002).

O gênero *Passiflora* é uma conhecida fonte de substâncias bioativas, como alcaloides, saponinas e flavonoides, já bastante exploradas para uso humano, devido ao seu amplo potencial farmacológico (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Trabalhos anteriores com espécies do gênero descreveram a atividade antibacteriana de diferentes materiais obtidos de plantas cultivadas em condições naturais (BABY et al., 2010; BENDINI et al., 2006; JOHNSON; MARIDASS; IRUDAYARAJ, 2008; MOHANASUNDARI et al., 2007). Nesta parte do trabalho, o potencial antibacteriano de plantas de *P. pohlii* cultivadas *in vitro* foi

investigado, em comparação com o de outras três espécies do gênero, *P. alata*, *P. foetida* e *P. suberosa*, pertencentes aos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*.

Passiflora alata Curtis, conhecida popularmente como maracujá-doce, pertence subgênero *Passiflora* e é uma das três espécies mais comercializadas de maracujá no Brasil (Figura 24) (JUNQUEIRA et al., 2005; ULMER; MACDOUGAL, 2004). É uma espécie nativa da América do Sul, com ampla distribuição no Brasil (BERNACCI et al., 2015). Além do potencial agrônômico, *P. alata* possui também grande potencial medicinal, sendo incluída na Farmacopeia Brasileira. Suas folhas são utilizadas como matéria-prima para fitoterápicos comerciais para o tratamento de ansiedade (OLIVEIRA; CAMPOS; SILVA, 2015), e pela indústria de cosméticos, na composição de cremes que retardam o envelhecimento da pele. Extratos de diferentes partes da planta demonstraram atividade sedativa, ansiolítica, analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (COLOMEU et al., 2014; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; FIGUEREDO et al., 2016; LUGATO et al., 2014; MOREIRA et al., 2011; OGA et al., 1984; PROVENSÍ et al., 2008; REGINATTO et al., 2006; RUDNICKI et al., 2007; ZERAIK et al., 2011). Além disso, estudos fitoquímicos resultaram na identificação de, principalmente, flavonoides e saponinas em diversas partes da planta, incluindo folhas e raízes (DOYAMA et al., 2005; MORAES et al., 1997; REGINATTO et al. 2001; ZUCOLOTTI et al., 2012).

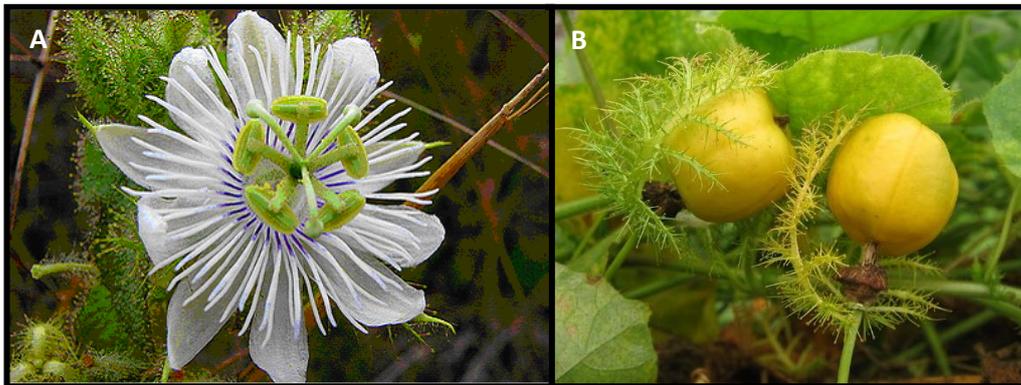
Figura 24 - *Passiflora alata* Curtis



Legenda: A) Hábito (www.doconversations.wordpress.com). B) Flor. (www.panoramio.com) C) Fruto. (www.ciprest.com.br).

Passiflora foetida L., popularmente conhecida como maracujá-de-estalo, maracujá-domato ou maracujá-de-papoco (Figura 25) (NUNES; QUEIROZ, 2001), pertence ao subgênero *Passiflora* e apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo principalmente em regiões de clima tropical (BERNACCI et al., 2015). É uma espécie amplamente utilizada na medicina popular, principalmente no tratamento de ansiedade, insônia asma e doenças de pele (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2001). Além disso, estudos farmacológicos descreveram atividade analgésica (CHAN BASHA et al., 2008) e antibacteriana em extratos de folhas, frutos e raízes, confirmando seu uso popular no tratamento de diferentes tipos de infecção (BABY et al., 2010; CHAN BASHA et al., 2008; MOHANASUNDARI et al., 2007). Seus principais fitoconstituintes são alcaloides, fenóis, flavonoides e glicosídeos (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Figura 25 - *Passiflora foetida* L.

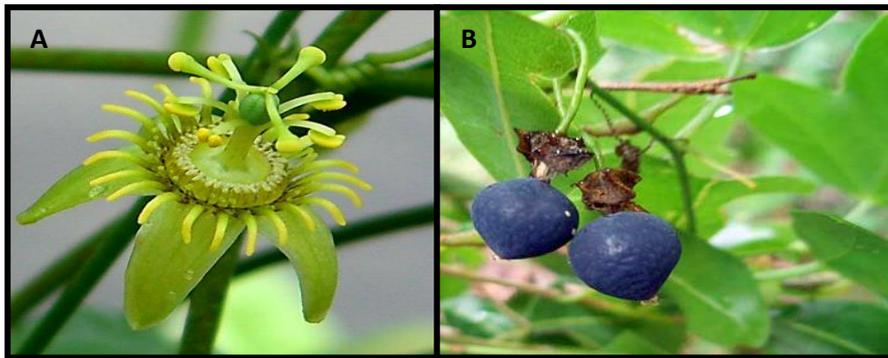


Legenda: A) Flor. B) Fruto.

Fonte: <http://www.plantsofperfection.com>.

Passiflora suberosa L. pertence ao subgênero *Decaloba* e possui um grande potencial agrônomo devido à sua tolerância a vírus, fungos e agentes patogênicos do solo que causam danos às culturas de maracujá (GARDNER, 1989; JUNQUEIRA et al. 2005). Esta espécie também é usada como planta ornamental, devido ao pequeno tamanho de suas frutas e flores (Figura 26) (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Suas folhas são comumente utilizadas na medicina popular como sedativo e para o tratamento de hipertensão, diabetes e doenças da pele (MILLER, 1998). Estudos farmacológicos recentes demonstraram atividades hipoglicemiantes, hipolipidêmicas (SUDASINGHE; PEIRIS, 2018), antibacteriana, antioxidante e citotóxica (BANDARA; PADUMADASA, PEIRIS, 2018).

Figura 26 - *Passiflora suberosa* L.



Legenda: A) Flor. B) Fruto.

Fonte: <http://www.plantsofperfection.com>.

O objetivo desta parte do trabalho foi investigar a associação entre a presença de flavonoides e saponinas e o potencial antibacteriano de plantas *in vitro* de *P. pohlii*, em comparação outras três espécies do gênero: *P. alata*, *P. foetida* e *P. suberosa*.

5.1 Material e Métodos

5.1.1 Preparo de extratos vegetais

Para as análises cromatográficas e avaliação da atividade antibacteriana foram preparados extratos de folhas e raízes de plantas mantidas *in vitro* de *P. pohlii*, *P. alata*, *P. foetida* e *P. suberosa*, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.2.2). A ressuspensão dos extratos foi realizada em metanol, com auxílio de ultrassom.

5.1.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a caracterização fitoquímica dos extratos, foram utilizados diferentes sistemas de CCD, como descritos anteriormente no item 4.2.4.2.

5.1.3 Atividade antibacteriana

A análise do potencial antibacteriano dos extratos foi realizada utilizando o método de diluição em ágar (macrodiluição) descrito por Soberón e colaboradores (2007), com modificações (BARBOZA et al., 2015). Para isso, foram utilizadas 20 cepas bacterianas (Quadro 6), Gram-positivas e Gram-negativas, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e da coleção do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ. As cepas dos estoques foram previamente inoculadas em tubos de ensaio de 15 x 100 mm contendo cerca de 3 mL de meio Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid, Ltda.) e mantidas em estufa a 37°C, por 18 h.

Os extratos foram solubilizados em 20 mL de meio Mueller-Hinton Ágar (MHA, Oxoid Ltda.), obtendo as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e distribuídos em placas de Petri. Após solidificação do meio, 2 μL de cada suspensão bacteriana foram aplicados nas placas, em duplicata. Após 24 h de incubação em estufa a 37°C, o crescimento das colônias foi observado e comparado com as placas controles contendo apenas MHA sem extratos (controle positivo) e MHA + DMSO a 0,5% (controle negativo). Os experimentos foram repetidos três vezes para cada extrato.

As concentrações inibitória mínima (CIM), bactericida mínima (CBM) e a inibitória de 50% do crescimento bacteriano (CI_{50}) foram determinadas pelo método de diluição em placa de 96 poços. Para a realização destes ensaios, foram utilizadas apenas as cepas que apresentaram inibição do crescimento no ensaio de macrodiluição descrito acima.

As suspensões bacterianas foram padronizadas e ajustadas para 0.5 na escala de McFarland. Em seguida, foram incubadas em meio MHB a 37°C por 18 h, e ajustadas para 0.14 nm de densidade óptica (D.O.), a 580 nm. Destas suspensões, 100 μL foram adicionados a placas de 96 poços, juntamente com 100 μL de soluções com diferentes concentrações dos extratos (100 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em quadruplicatas, com incubação por 18 h a 37°C. Após esse período, 2 μL de cada de cada suspensão foram semeados em placas de Petri contendo meio MHA, seguindo-se uma incubação a 37°C por 18 h, para avaliação de CBM. As placas foram analisadas em leitor de microplacas a 492 nm e as absorbâncias obtidas foram utilizadas para estabelecer CIM e calcular o CI_{50} por regressão não-linear, utilizando o software GraphPad Prism®.

Para eliminar a possível influência da cor dos extratos, três poços contendo apenas os extratos nas diferentes concentrações foram analisados em cada ensaio. O valor da média de

cada triplicata foi descontado dos valores de absorbância obtidos, para a avaliação de CIM e CI₅₀.

Os controles experimentais utilizados foram determinados por suspensões bacterianas adicionadas a poços contendo meio MHB sem extratos (controle positivo) e em meio MHB contendo DMSO a 0,5% (controle negativo). Cada experimento foi repetido por quatro vezes e todos os materiais e meios de cultura foram previamente esterilizados a 121°C por 20 minutos.

Esses ensaios foram realizados no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio.

Quadro 6 - Cepas bacterianas utilizadas para a avaliação da atividade antibacteriana de extratos de materiais *in vitro* das espécies de *Passiflora*

	Espécies	Cepas
Gram-positivas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(ATCC 33679)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	(29212)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
	<i>Staphylococcus simulans</i>	(ATCC 27851)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	(ATCC 15305)
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(ATCC 8668)
Gram-negativas	<i>Aeromonas caviae</i>	(ATCC 15468)
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
	<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 12241)
	<i>Escherichia coli</i>	(17-2)
	<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
	<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 35218)
	<i>Escherichia coli</i> K-12	(HB 101)
	<i>Escherichia coli</i> K-12	(C600)
	Enteroaggregative <i>E. coli</i>	(EAEC 042)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 700603)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 27853)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	(C20)
	<i>Serratia marcescens</i>	(7145)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)	

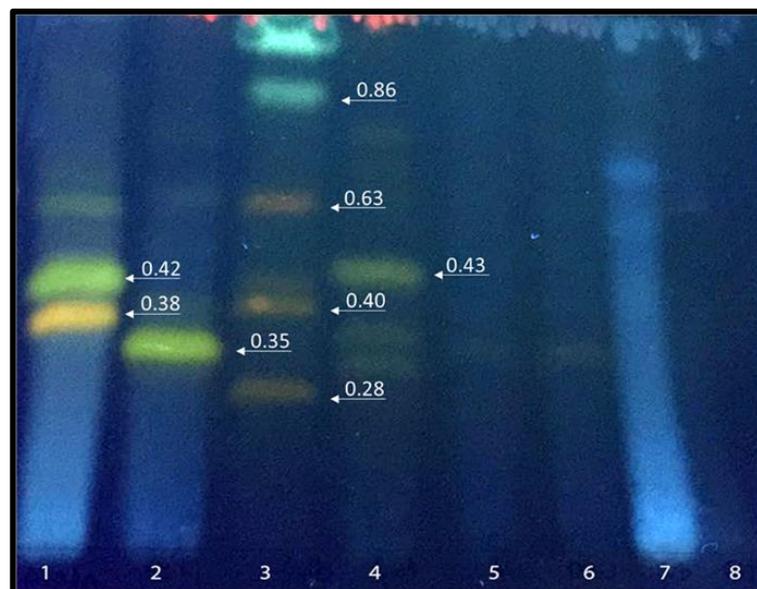
5.2 Resultados

5.2.1 Análises cromatográficas

Foi observada a presença de flavonoides e saponinas nas análises de CCD dos extratos de folhas e raízes de plantas mantidas *in vitro* das quatro espécies de *Passiflora* estudadas.

Bandas características de flavonoides foram observadas apenas em extratos de folhas das quatro espécies estudadas. Entretanto, cada extrato apresentou um perfil cromatográfico distinto (Figura 27). Extratos de folhas de *P. pohlii* e *P. foetida* apresentaram bandas verdes fluorescentes ($R_F = 0.35$ e 0.43 , respectivamente), enquanto o extrato de folhas de *P. alata* apresentou duas bandas majoritárias, uma verde fluorescente ($R_F = 0.42$) e uma alaranjada ($R_F = 0.38$). O extrato de folhas de *P. suberosa* apresentou três bandas de cor laranja clara ($R_F = 0.28$, 0.40 e 0.63), e uma banda de cor azul fluorescente ($R_F = 0.86$), que não foi observada em nenhuma das outras espécies (Figura 27).

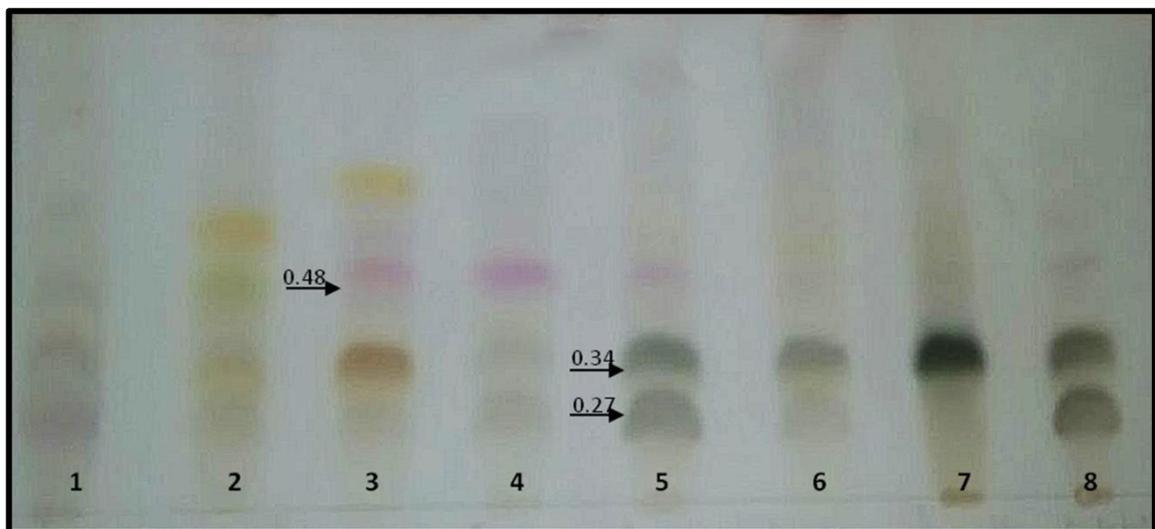
Figura 27 - Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em extratos de folhas e raízes excisadas de plantas *in vitro* de quatro espécies de *Passiflora*



Legenda: 1 - 4) Folhas de: 1) *P. alata*; 2) *P. pohlii*; 3) *P. suberosa*; 4) *P. foetida*.
5 - 8) Raízes de: 5) *P. alata*; 6) *P. pohlii*; 7) *P. suberosa*; 8) *P. foetida*. Fase móvel: AcOEt:ácido fórmico:AcOH:H₂O (100:11:11:26, v/v). Visualização: NP/PEG 4000/UV_{365nm}. Setas indicam os valores de R_F .

Bandas indicativas de saponinas foram detectadas nos extratos das quatro espécies analisadas, caracterizadas por bandas de cor laranja, roxa e castanho escuro (Figura 28). Folhas de *P. suberosa*, *P. foetida* e *P. alata* apresentaram bandas similares de cor roxa ($R_F = 0.48$), sugerindo se tratar da mesma substância. Quatro bandas de cor castanho escuro e mesmo valor de R_F (0.34) foram observadas nos extratos das quatro espécies. Raízes de *P. alata*, *P. pohlii* e *P. foetida* também apresentaram bandas de cor cinza, com o mesmo valor de R_F (0.27).

Figura 28 - Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de folhas e raízes excisadas de plantas *in vitro* de quatro espécies de *Passiflora*



Legenda: 1 – 4) Folhas de: 1) *P. alata*; 2) *P. pohlii*; 3) *P. suberosa*; 4) *P. foetida*. 5 – 8) Raízes de: 5) *P. alata*; 6) *P. pohlii*; 7) *P. suberosa*; 8) *P. foetida*. Fase móvel: $\text{CHCl}_3:\text{AcOH}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (60:32:12:8, v/v). Visualização: anisaldeído- H_2SO_4 /aquecimento (100°C). Setas indicam os valores de R_F .

5.2.2. Avaliação da atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano de extratos de folhas e raízes de plantas propagadas *in vitro* de *P. pohlii* e de outras três espécies de *Passiflora* foi avaliado pelo ensaio de macrodiluição. Extratos de folhas e raízes de *P. pohlii* levaram a um aumento do crescimento em todas as cepas testadas, com exceção de *Streptococcus pyogenes*, que apresentou um crescimento semelhante ao controle. Já os extratos de *P. suberosa* não alteraram o crescimento das 20 cepas testadas (Tabela 5).

Os extratos de folhas e raízes de *P. alata* e *P. foetida* proporcionaram uma inibição seletiva do crescimento de apenas duas cepas, *Bacillus thuringiensis* (ATCC33697) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 8668). Além disso, extratos de raízes de *P. alata* também reduziram o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Por outro lado, um aumento no crescimento de quase todas as outras cepas foi observado em resposta aos extratos de folhas de *P. alata* e folhas e raízes de *P. foetida*, quando comparadas ao controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação da atividade antibacteriana de extratos (1000 µg.mL⁻¹) de materiais obtidos *in vitro* de quatro espécies de *Passiflora* utilizando o método de macrodiluição

Cepas	<i>P. pohlii</i>		<i>P. suberosa</i>		<i>P. alata</i>		<i>P. foetida</i>	
	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
<i>B. thuringiensis</i>	A	A	-	-	I	I	I	I
<i>E. faecalis</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
Gram-positivas								
<i>S. aureus</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>S. simulans</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>S. saprophyticus</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	I	I	I	I
<i>A. caviae</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>A. hydrophila</i>	A	A	-	-	A	-	-	A
<i>C. freundii</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>E. coli</i> (17-2)	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	A	A	-	-	A	-	A	A
Gram-negativas								
<i>E. coli</i> K-12 (HB 101)	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>E. coli</i> K-12 (C600)	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>E. coli</i> (EAEC 042)	A	A	-	-	A	-	-	A
<i>K. pneumoniae</i>	A	A	-	-	A	-	-	A
<i>P. aeruginosa</i>	A	A	-	-	-	R	-	-
<i>S. typhimurium</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>S. marcescens</i>	A	A	-	-	A	-	A	A
<i>S. sonnei</i>	A	A	-	-	A	-	A	A

A= aumento; R = redução, I = inibição. Traço = crescimento semelhante ao controle em MHA.

Com base nestes resultados, os extratos de folhas e raízes de plantas de *P. alata* e *P. foetida* mantidas *in vitro* foram testados para CIM, CBM e CI₅₀, avaliando o crescimento das cepas de *B. thuringiensis* e *S. pyogenes* (Tabela 6).

Extratos de raízes de *P. alata* apresentaram o menor valor de CI₅₀ para as duas cepas, quando comparado com os outros extratos testados, com valores de 28,98 µg.mL⁻¹ para *S. pyogenes* e 9,08 µg.mL⁻¹ para *B. thuringiensis*. Extratos de raízes de *P. alata* e *P. foetida* apresentaram o menor valor de CIM para as duas cepas, com valores abaixo de 100 µg.mL⁻¹. O melhor resultado de CBM para *S. pyogenes* foi obtido com o extrato de raízes de *P. foetida*, com valores abaixo de 250 µg.mL⁻¹. Para *B. thuringiensis*, o menor valor de CBM foi observado nos tratamentos com folhas de *P. foetida*, sendo necessários valores abaixo de 500 µg.mL⁻¹ para se observar atividade bactericida (Tabela 6).

Tabela 6- Avaliação das concentrações inibitória de 50% do crescimento bacteriano (CI₅₀), inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) de extratos de folhas e raízes obtidas de plantas mantidas *in vitro* de *P. alata* e *P. foetida*

Extratos		<i>Streptococcus pyogenes</i>			<i>Bacillus thuringiensis</i>		
		CI ₅₀	CIM	CBM	CI ₅₀	CIM	CBM
<i>P. alata</i>	Folhas	488	>750	1000	75,67	>250	>1000
	Raízes	28,98	>100	500	9,08	>100	750
<i>P. foetida</i>	Folhas	104,74	>250	>500	75,3	>250	>500
	Raízes	36,89	>100	>250	37,51	>100	500

5.3 Discussão

Como espécies de *Passiflora* têm sido amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, vários trabalhos têm investigado a composição fitoquímica e o potencial farmacológico de diferentes partes das suas plantas nos últimos

anos. Neste trabalho, foi investigada, pela primeira vez no gênero, a associação entre a presença de flavonoides e saponinas e o potencial antibacteriano de plantas *in vitro* de *P. pohlii*, em comparação com outras três espécies do gênero.

O perfil cromatográfico de flavonoides encontrados nos extratos de folhas de plantas *in vitro* de *P. pohlii* foi similar ao observado por Simão (2015), sem diferenças entre materiais *in vitro* e *in vivo*. Para *P. alata*, *P. foetida* e *P. suberosa*, o perfil de flavonoides obtido neste trabalho foi similar ao observado por Birk e colaboradores (2005), nos extratos de partes aéreas de plantas destas três espécies mantidas em condições naturais.

Apesar de flavonoides serem as substâncias mais descritas no gênero, saponinas também têm sido descritas em algumas espécies de *Passiflora*. Em folhas de *P. alata*, por exemplo, já foram identificadas cinco diferentes saponinas, sendo uma do tipo esteroide glicosídeo e quatro triterpênicas (REGINATTO et al., 2001). O teor da saponina majoritária, denominada quadrangulosídeo, foi determinado como 22,2% (m/m) do extrato aquoso, correspondendo a 8,2% (m/m) das folhas secas (REGINATTO et al., 2004). Birk e colaboradores (2005) e Boeira e colaboradores (2010) também evidenciaram a presença de saponinas em extratos etanólicos de folhas de *P. alata* utilizando técnicas cromatográficas. Além disso, saponinas também já foram detectadas em diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*, incluindo folhas e raízes de plantas mantidas *in vivo* e produzidas *in vitro* (SIMÃO, 2015; SIMÃO et al., 2016), e raízes submetidas à criopreservação, como descrito neste trabalho (item 5).

Trabalhos anteriores com espécies do gênero descreveram atividade antibacteriana de extratos de diferentes materiais obtidos de plantas cultivadas em condições naturais, utilizando diferentes métodos de avaliação. Birner e Nicolls (1973) apontaram a presença de passicol, uma substância com atividade antimicrobiana, em extratos de *P. molissima*. Diversos estudos com *P. foetida*, que assim como *P. alata* pertence ao subgênero *Passiflora*, descreveram atividade de extratos de diferentes materiais, incluindo raízes, contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas (BABY et al., 2010; BENDINI et al., 2006; MOHANASUNDARI et al., 2007). Bendini e colaboradores (2006) observaram uma grande atividade antimicrobiana nos extratos de folhas de *P. foetida*. Mohanasundari e colaboradores (2007) observaram o efeito de extratos de folhas e frutos contra cepas de *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Streptococcus pyogenes* utilizando o método de difusão em ágar. Extratos de raízes foram testados utilizando o método de difusão de disco de Kirby-Bauer contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BABY et al., 2010). Ao contrário do observado

neste trabalho, esses estudos apontam melhores resultados de atividade antibacteriana contra cepas Gram-negativas.

O potencial antibacteriano de extratos derivados de diferentes espécies de plantas tem sido associado à presença de metabólitos secundários (BUKKE; HADI; PRODUTUR, 2015; DZOTAM; TOUANI; KUETE, 2016). No gênero *Passiflora*, Ramaiya, Bujang e Zakaria (2014) relacionaram a maior quantidade de compostos fenólicos em extratos metanólicos de folhas e caules de *P. quadrangularis*, *P. maliformis* e *P. edulis* com o potencial antibacteriano, sendo os melhores resultados observados em cepas Gram-positivas. A produção de fenóis, flavonoides e taninos, assim como a avaliação do potencial antibacteriano de extratos de *P. alata* preparados com diferentes solventes também foi avaliada por Vasic e colaboradores (2012). O extrato em acetato de etila apresentou maior atividade antibacteriana quando comparado com outros extratos testados, especialmente contra cepas Gram-positivas. Entretanto, como baixas concentrações de fenóis e flavonoides foram detectadas nesse extrato, foi sugerido que a atividade antibacteriana não está relacionada a estas substâncias. Johnson e colaboradores (2008) também atribuíram as altas taxas de inibição de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes*, *Aeromonas sps*, *Serratia* e *Escherichia coli* provocadas por extratos clorofórmicos de calos de *P. edulis* à presença de diversas substâncias, incluindo saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides.

O potencial antibacteriano de extratos de raízes e folhas excisadas de plantas *in vitro* de *P. alata* e *P. foetida* observado neste trabalho pode estar relacionado à presença de substâncias restritas à espécies do subgênero *Passiflora*, indicando uma forte influência genotípica, uma vez que os perfis cromatográficos dessas espécies diferiram daqueles dos materiais *in vitro* de *P. pohlii* e *P. suberosa*, pertencentes ao subgênero *Decaloba*, que não apresentaram atividade antibacteriana. Porém, ainda há a necessidade de mais estudos visando, principalmente, ao isolamento e à identificação das substâncias bioativas presentes nos extratos das diferentes espécies.

Estes resultados constituem o artigo “**A comparative study of phytoconstituents and antibacterial activity of *in vitro* derived materials of four *Passiflora* species**”, publicado no periódico “Anais da Academia Brasileira de Ciências”.

CONCLUSÕES

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

- As análises por RMN permitiram a elucidação estrutural e a identificação dos flavonoides presentes nos extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas em condições naturais como sendo os isômeros iso-spinosina e spinosina;
- Calos friáveis obtidos a partir de segmentos foliares cultivados na presença de PIC e elevadas concentrações de sacarose apresentaram a produção de substâncias fenólicas com atividade antioxidante;
- A eficiência da técnica de V-Crioplaca associada ao uso de PVS2 para a criopreservação de segmentos radiculares foi comprovada pela capacidade de reversão dos danos estruturais durante o processo, pelas altas taxas de recuperação obtidas e pela manutenção da capacidade biossintética das raízes criopreservadas;
- Extratos de folhas e raízes excisadas de plantas *in vitro* de *P. pohlii* promoveram um aumento no crescimento da maioria das cepas bacterianas testadas, ao contrário do observado nas outras espécies de *Passiflora* avaliadas, indicando uma forte influência genotípica.

PERSPECTIVAS

- Avaliar o potencial farmacológico dos flavonoides spinosina e iso-spinosina encontrados nos extratos de folhas de *P. pohlii*;
- Identificar as substâncias fenólicas produzidas pelos calos friáveis derivados de explantes foliares;
- Desenvolver um protocolo eficiente para a criopreservação de calos friáveis derivados de explantes foliares, utilizando as técnicas de encapsulamento-vitrificação e encapsulamento-desidratação;
- Identificar as substâncias produzidas pelas raízes de plantas *in vitro* e avaliar seu potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; CHILLARA, R.; KUSHWAHA, P.; KHEDGIKAR, V.; KARVANDE, A.; CHOUDHARY, D.; ADHIKARY, S.; MAURYA, R.; TRIVEDI, R. Evaluation of anti-osteoporotic activity of butanolic fraction from *Passiflora foetida* in ovariectomy-induced bone loss in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 804-813, 2017.
- ALI, M.; ABBASI, B.H.; AHMAD, N.; ALI, S.S.; ALI, S.; ALI, G.S. Sucrose-enhanced biosynthesis of medicinally important antioxidant secondary metabolites in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1945-1954, 2016.
- ALI, M.; ABBASI, B.H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400-406, 2013.
- AMISSAH, J.N.; PAOLILLO JR, D.J.; BASSUK, N. Adventitious Root Formation in Stem Cuttings of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and Its Relationship to Stem Anatomy. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 4, p. 479-486, 2008.
- 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.
- ASADUJJAMAN, M.; MISHUK, A.U.; HOSSAIN, M.A.; KARMAKAR, U.K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of Integrative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 121-126, 2014.
- ASHMORE, S.E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome. 1997.
- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, B.; ASLAN, E.; YUKSEL, M.U. *Passiflora incarnata* Linneaus as an anxiolytic before spinal anesthesia. **Journal of Anesthesia**, v. 26, n.1, p. 39-44, 2012.
- BABY, E.; BALASUBRAMANIAM, A.; MANIVANNAN, R.; JOSE, J.; SENTHILKUMAR, N. Antibacterial activity of methanolic root extract of *Passiflora foetida* Linn. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p. 38-40, 2010.
- 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, 2018
- BAQUE, M.A.; MOH, S.; LEE, E.; ZHONG, J.; PAEK, K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1255-1267, 2012.
- BARBALHO, S.M.; DAMASCENO, D.C.; SPADA, A.P.M.; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A.C.; GUIGER, E. L.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA, M.; MENDES, C.G. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rat offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.12, p. 1490-1495, 2011.
- BARBOZA, T.J.S.; FERREIRA, A.F.; IGNACIO, A.C.P.R.; ALBARELLO, N. Antimicrobial activity of *Annona mucosa* (Jacq.) grown *in vivo* and obtained by *in vitro* culture. **Brazilian journal of microbiology**, v. 46, p. 785-789, 2015.
- BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; IAPICHINO, G.; ENGELMANN, F. Investigating the cryopreservation of nodal explants of *Lithodora rosmarinifolia* (Ten.) Johnst., a rare, endemic

- Mediterranean species. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, p. 141–146, 2013.
- BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs - The need for and development of new antibacterials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.1, p. 51-59, 2000.
- BEHRENDORFF, J.B.Y.H.; VICKERS, C.E.; CHRYSANTHOPOULOS, P.; NIELSEN, L.K. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 76, p. 1-11, 2013.
- BENDINI, A., CERRETANI, L., PIZZOLANTE, L., TOSCHI, T.G., GUZZO, F., CEOLDO, S., MARCONI, A.M., ANDRETTA, F., LEVI, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 102–109, 2006.
- BENJAMINS, R.; SCHERES, B. Auxin: The Looping Star in Plant Development. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 443–65, 2008.
- BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. in: Reed, B. M. (Ed.) **Cryopreservation plant: A practical Guide**. New York, USA: Springer, p. 15-32, 2008.
- BENSON, E. E. **Free radical damage in stores plant germoplasm**. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p. 75-86, 1990.
- BENSON, E.E.; HAMILL, J.D. Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, p. 163–172, 1991.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2015. *Passifloraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182> (Acesso em 07/06/2017).
- BETSUI, F.; TANAKA-NISHIKAWA, N.; SHIMOMURA, K. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 5, p.387–391, 2004.
- 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.
- BIRNER, J.; NICOLLS, J.M. Passicol, an Antibacterial and Antifungal Agent Produced by *Passiflora* Plant Species: Preparation and Physicochemical Characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 3, p. 105–109, 1973.
- BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CORRÊA, A.M.R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; SILVA, J.; RATES, S.M.K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 526-532, 2010.
- BOMBARDELLI, E.; BONATI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G. Passiflorine, a New Glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2661-2665, 1975.
- BORGES, M.; CEIRO, W.; MENESES, S.; AGUILERA, N.; VÁZQUEZ, J. INFANTE, Z; FONSECA, M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 87-90, 2004.

- 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.
- BUENO, P.C.P.; PASSARELI, F.; ANHESINE, N.B.; TORRES, R.B.T.; CAVALHEIRO, A.J. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *lingua* (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 23-26, 2016
- BUKKE, A.N.; HADI, F.N.; PRODUTUR, C.S. Comparative study of *in vitro* antibacterial activity of leaves, bark, heart wood and seed extracts of *Caesalpinia sappan* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. 903–907, 2015.
- CABRERA, M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. **Research Signpost**, v. 37, n. 2, p. 1-22, 2006
- CAI, Z.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 29–34, 2012.
- 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.
- CASTRO, P.C.F.; HOSHINO, A.; SILVA, J.C.; MENDES, F.R. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 481-484, 2007.
- CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil: Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v.45, n.1, p. 1-92, 1997
- CHAN BASHA, S.K.; RAJ, B.D.; SWAMY, S.B.; REDDY, J.M. Evaluation of analgesic activity of hydro alcoholic leaf extract of *Passiflora foetida*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, p. 70-75, 2008
- CHANG, C.C.; LEE, S.S. Rapid Identification of Flavonoid Glycosides in *Pasania kawakamii* and *Cyclobalanopsis morii* via HPLC/MS and HPLC-SPE-NMR^a. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 4, 2012.
- 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.
- COSTA, G.M.; ORTMANN, C.F.; SCHENKEL, E.P. REGINATTO, F.H. Na HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6.; p. 1096-1102, 2011.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.
- DAVIES, K.M.; DEROLES, S.C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Current Opinions on Biotechnology**, v. 26, p. 133-140, 2014.
- DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 148-153, 2010.
- DEWICK, P. M. (2002) Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. **John Wiley & Sons**, 507p.

- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1–23, 2004.
- DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEG, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371–374, 2005.
- DZOTAM, J.K.; TOUANI, F.K.; KUETE, V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 565–570, 2016.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.
- EVELAND, A.L.; JACKSON, D.P. Sugars, signaling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3367-3377, 2012.
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. **CryoLetters**, v. 11, p. 413–426, 1990.
- FALCÃO, Erica. **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.
- FALKENBERG MB; SANTOS RI; SIMÕES CMO. 2003. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES CMO; SCHENKEL EP; GOSMANN G; MELLO JCP; MENTZ LA; PETROVICK PR (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 230-288.
- FARIA, F. S.; STEHMANN, J. R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 262-269, 2010.
- FAZAL, H.; ABBASI, B.H.; AHMAD, N.; ALI, M.; ALI, S. Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, p.573-581, 2016.
- FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 55, v. 25, p. 10187-10193, 2007.
- FEUILLET, C.; MAC DOUGAL, J.M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003.
- FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. Passifloraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.) **The families and genera of vascular plants**. v. 9. Berlin, Springer, 2007.
- FIGUEIREDO, D.; COLOMEU, T.C.; SCHUMACHER, N.S.G.; STIVANIN-SILVA, L.G.; CAZARIN, C.B.B.; MELETTI, L.M.M.; FERNANDES, L.G.R.; PRADO, M.A.; ZOLLNER, R.L. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). **International Immunopharmacology**, v. 35, p. 127-136, 2016.
- FINE, P.V.A.; MILLER, Z.J.; MESONES, I.; IRAZUZTA, S.; APPEL, H.M.; STEVENS, M.H.H. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. **Ecology**, v. 87, n. 7, p. 150-162, 2006.

- FRANÇA, S.C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. 1104p.
- FRYE, A.; HAUSTEIN, C. Extraction, Identification, and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of *Passiflora*. **American Journal of Undergraduate Research**, v.6, n.3, 2007.
- 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.
- GADZOVSKA-SIMIC, S.; TUSEVSKI, O.; ANTEVSKI, S.; ATANASOVA-PANCEVSKA, A.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M.; KUNGULOVSKI, D.; SPASENOSKI, M. Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. **Archives of Biological Science**, v. 64, n. 1, p. 113-121, 2012.
- GARCIA, R.O.; PACHECO, G.; VIANNA, M.G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. **Cryo Letters**, v.32, n.5, p.377-388, 2011.
- GARCÍA-RUIZ, A.; GIRONES-VILAPLANA, A.; LEÓN, P.; MORENO, D.A.; STINCO, C.M.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; RUALES, J. Banana Passion Fruit (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey): Microencapsulation, Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2017.
- 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.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. (2008). Plant propagation by tissue culture, 3 ed. **Springer**, v. 1, 501p.
- GESZTESI, L. J.; DA LUZ, P. M. Procède pour la preparation d'un extrait vegetal de *Passiflora alata* et utilization dudit extrait dans des compositions cosmetiques et pharmaceutiques. Patente FR2920310. 03 de agosto de 2007.
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances** v.31, p.166-174, 2013.
- GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; AGUILAR, N.; AYILA T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post-cryopreservation. **CryoLetters**, v. 30, n. 2, p.142-147, 2009.
- GOPAL, J.; CHAMAIL, A.; SARKAR, D. (2002). Slowgrowth in vitro conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. **Journal Potato Research**, v. 45, p. 203-213, 2002.
- GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres et al. (ed.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p.183-260, 1998.
- GUPTA, R. K.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A. K.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n.3, p. 801-806, 2012.

HARA, K.; SOMEYA, T.; SANO, K.; SAGANE, Y.; WATANABE, T.; WIJESEKARA, R.G.S. Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. **Data in Brief**, v. 17, p. 870-875, 2018.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 1, p. 2831-2846, 2007.

HASAN, N.; HUSSEIN, S. Adventitious Root Induction of *Labisia pumila* in Respond to Plant Growth Regulators and Different Type of Explant. **The Science News-Letter**, v.7, n. 1, p. 9-18, 2013.

HITMI, A.; BARTHOMEUF, C.; SALLANON, H. Cryopreservation of *Crysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, p. 408-412. 2000.

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.

HUGHES, Z. E. ; MALAJCZUK, C. J.; MANCERA, R. L. The Effects of Cryosolvents on DOPC- β -Sitosterol Bilayers Determined from Molecular Dynamics Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 3362-3375, 2013.

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.

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

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, v.25, p. 3159-3173, 2013.

INGALE, S.; KASTURE, S. Evaluation of analgesic activity of the leaves of *Passiflora incarnata* Linn. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 6, p. 35-39, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2015). Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/5457#resultado>>. (Acesso em 08 de julho de 2017).

IWASE, A.; MITSUDA, N.; KOYAMA, T.; HIRATSU, K.; KOJIMA, M.; ARAI, T.; INOUE, Y.; SEKI, M.; SAKAKIBARA, H.; SUGIMOTO, K.; OHME-TAKAGI, M. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v. 21, p. 508-514, 2011.

JANZANTTI, N. S.; MACORIS, M. S.; GARRUTI, D. S.; MONTEIRO, M. Influence of the cultivation system in the aroma of the volatile compounds and total antioxidant activity of passion fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 511-518, 2012.

JANZANTTI, N.S.; MONTEIRO, M. Changes in the aroma of organic passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) during ripeness. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 612-620, 2014.

JOHNSON, M.; MARIDASS, M.; IRUDAYARAJ, V. Preliminary Phytochemical and Anti-Bacterial Studies on *Passiflora edulis*. **Ethnobotanical Leaflets** 12, 425-432, 2008.

- JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K. P.; FIALHO, J. F. **Melhoramento genético do maracujá-doce**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 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.
- KATOH, N.; YUI, M.; SATO, S.; SHIRAI, T.; YUASA, H.; HAGIMORI, M. Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by *in vitro* grafting. **Scientia Horticulturae**, v. 100, p.1-4, 2004.
- KEDARE, S.B.; SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.
- KIKOWSKA, M.; KĘDZIORA, I.; KRAWCZYK, A.; THIEM, B. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 2, p. 197-200, 2012.
- KILAYRI, J.M.; BAHRANY, A.M. Callus Growth and Proline Accumulation in Response to Sorbitol and Sucrose-Induced Osmotic Stress in Rice. **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 609-611, 2002.
- KIM, A.; CHOI, J.; HTWE, K.M.; CHIN, Y.; KIM, J.; YOON, K.D. Flavonoid glycosides from the aerial parts of *Acacia pennata* in Myanmar. **Phytochemistry**, v. 118, p. 17-22, 2015.
- 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.
- KIM, H.H. ; LEE, S.C. Personalisation of droplet-vitrification protocols for plant cells: A systematic approach to optimising chemical and osmotic effects. **CryoLetters**, v. 33, p. 271–279, 2012.
- KIM, H.H. ; POPOVA, E.V.; SHIN, D.J.; BAE, C.H.; BAEK, H.J.; PARK, S.U.; ENGELMANN, F. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach. **CryoLetters**, v. 33, n. 6, p. 506–517, 2012.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; KANG, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.
- 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.

- KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-16, 2013.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LANGASSNER, S.M.Z. **Avaliação Da Composição Química e Atividades Biológicas de Espécies de *Passiflora***. 2009. 167p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.
- 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.
- LEE, Y.; JEON, S.J.; LEE, H.E.; JUNG, I.H.; JO, Y.; LEE, S.; CHEONG, J.H.; JANG, D.S.; RYU, J.H. Spinosin, a C-glycoside flavonoid, enhances cognitive performance and adult hippocampal neurogenesis in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 415, p. 9-16, 2016.
- LEE, Y.S.; YANG, T.; PARK, S.; BAEK, J.H.; WU, S.; LIM, K. Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. **Plant Omics Journal**, v.4, n.4, p. 190-194, 2011.
- LEMOES, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; NETO, C.E.R.; ALBUQUERQUE, M.M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- LEWIS, K.C.; MAXWELL, A.R.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; ENRIQUEZ, R.G. Room-temperature (^1H , ^{13}C) and variable-temperature (^1H) NMR studies on spinosyn. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 38, p. 771-774, 2000.
- LI, K.; GAO, C.; LI, W. Study on fragmentation of vitexin and isorhamnetin-3-O-beta D-rutinoside using electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 36, n. 2, p. 180-184, 2011.
- LIU, J.; ZHAI, W.; YANG, Y.; SHI, J.; LIU, Q.; LIU, G.; FANG, N.; LI, J.; GUO, J. GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosyn in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 128, p. 41-49, 2015.
- LOLLI, L.F., SATO, C.M., ROMANINI, C.V., VILLAS-BOAS, L.D.B., SANTOS, C.A.M., OLIVEIRA, R.M.W. Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 308–314, 2007.
- LÓPEZ-VARGAS, J.H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDAMARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756–763, 2013.
- LUDWIG-MÜLLER, J.; VERTOCNIK, A.; TOWN, C. D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2095–2105, 2005.
- LUGATO, D.; SIMÃO, M. J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 339-346, 2014.

- LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.
- MACIEL, S. C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne Mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 414-418, 2009.
- MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 127-134, 2012.
- MANEECHAI, S.; DE-EKNAMKUL, W.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H.; LIKHITWITAYAWUID, K. Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of *Artocarpus lakoocha*. **Phytochemistry**, v. 81, p. 42-49, 2012.
- MASSON, J.; LIBERTO, E.; BREVARD, H.; BICCHI, C.; RUBIOLO, P. A metabolomic approach to quality determination and authentication of raw plant material in the fragrance field. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, n. 14, p. 143-154, 2014.
- MARTIN, K. P.; ZHANG, C.; HEMBROM, M. E.; SLATER, A.; MADASSERY, J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, 163-169, 2008
- MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 6, p. 548-560, 2008.
- 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.
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; TAKAHASHI, C.; YAMADA, L. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. **CryoLetters**, v. 16, p. 189-196, 1995.
- MELETTI, L.M.M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R.F.A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Revista Scientia Agraria Paranaensis**, v.6, p.13-20, 2007.
- MERHY, T. S. M. **Cultura de Tecidos e Conservação *in vitro* de *Passiflora pohlii***. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.
- 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.
- MILLER, L.G. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Archives of Internal Medicine**, v.158, n. 20, p. 2200-2211, 1998.
- MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P. L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 91–804, 2013.
- MIZUSAKI, A.; NISHI, K.; NISHIWAKI, H.; ISHIDA, M.; SUGAHARA, T.; TAMAMOTO, T. Suppressive effect of ethanol extract from passion fruit seeds on IgE production. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 176-184, 2017.

- MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2650–2653, 2007.
- MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281–288, 2007.
- MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V.; CARVALHO, M.J.; BOLETI, A.P.A.; TEIXEIRA, L.S.; MATOS, H.R.; LIMA, E.S. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1367–1378, 2013.
- MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 6, p. 527–531, 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.
- MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H.Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257–260, 1997.
- MOREIRA, P.D.; JUNIOR, S.D.; LORENCINI, M.; GESZTESI, J.L.; ESTEVES, S.S.; FERRARI, C.R.; MANFIO, G.P.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory evidence of a standardized *Passiflora alata* dry extract. **Planta Medica**, v. 77, n. 12, 2011.
- MORRONE, M.S.; ASSIS, A.M.; ROCHA, R.F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTTO, S.M.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.
- MOVAFEGH, A.; ALIZADEH, R.; HAJIMOHAMADI, F.; ESFEHANI, F.; NEJATFAR, M. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 6, p.1728–1732, 2008.
- MÜLLER, S. D. **Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá Doce**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale Itajaí, Itajaí. 2006.
- MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.399–403, 2005.
- MÜLLER, V.; CHAVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTO, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARADI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970–974, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

- MURCH, S. J.; RUPASINGHE, H.P.V.; GOODENOWE, D.; SAXENA, P.L. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 419-425, 2004.
- 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.
- NAGELLA, P.; MURTHY, H.N. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6735–6739, 2010.
- NAN, O.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.; KONAN, J.; BALLO, K.; MONDEIL, F.; MALAURIE, B. Cryopreservation by Encapsulation-Dehydration of Plumules of Coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, v. 29, n. 4, p. 33-350, 2008.
- NANGEDRAN, B.; SUNDRAN, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.
- NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 26, p.1-6. 2007
- NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 851-860, 2013.
- NIINO, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, S.I.; MAKI, S.; TANAKA, D.; ENGELMANN, F. **Manual of Cryopreservation Methods Using Cryo-Plate**. Impresso, Jalisco. 175p, 2017
- 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.
- NILSSON, J.; PILLAI, D.; ÖNNING, G.; PERSSON, C.; NILSSON, A.; AKESSON, B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazole-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruits and vegetables. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 239-246, 2005.
- NISHISZAWA, S.; SAKAI, A.; AMANO, Y. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinallis* L.) embryogenic suspension cells and subsequence plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.
- NSIMBA, R.Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. Seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p. 760-766, 2008.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P.. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v.1, n.1, p.33-46, 2001.
- OGA, S.; DE FREITAS, P. C. D.; DA SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, p. 303-306, 1984.

- OKSMAN-CALDENTY, K.M.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- OLIVEIRA, M.S.; CAMPOS, M.A.; SILVA, F.S. Arbuscular mycorrhizal and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 522-528, 2015.
- OMS — Organização Mundial da Saúde, 2010. Quality control methods for medicinal plant materials, Geneva.
- PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v.144, p. 42-47, 2012.
- PACHECO, G.; SIMÃO, M.J.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.; VIEIRA, M.L.C.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora*: A Review. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 305-311, 2016.
- PAN, L.; BLANCO, E.J.C.; KINGHORN, A.D. 2009. Plant-derived natural products as leads for drug discovery. In: OSBOURN AE AND LANZOTTI V. (Eds.), Plant-Derived Natural Products, **Springer US**, New York, USA, p. 547-567.
- PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D., CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1-15, 2016.
- PATEL, S.S.; VERMA, N.K.; SHRESTHA, B.; GAUTHAMAN, K. Antihypertensive effect of methanolic extract of *Passiflora nepalensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n. 1, p.187-189, 2011.
- PATIL, A. Exploring *Passiflora incarnata* (L.): A medicinal plants secondary metabolites as antibacterial agent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 14, p. 1496-1501, 2010.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the flavone C-glycoside pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 295-301, 2005.
- PEREIRA. C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com Ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
- PEREIRA. C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com Ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
- PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P. Comparative pharmacological study of hydroetanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162-164, 2001.
- PIKULSKI, M.; BRODBELT, J.S. Differentiation of Flavonoid Glycoside Isomers by Using Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, p. 1437-1453, 2003.
- PROVENSI, G.; NOËL, F.; LOPES, D.V.S.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; COSTA, F.; MORAIS, E.C.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Participation of GABA-benzodiazepine

Receptor Complex in Anxiolytic Effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 845-851, 2008.

RAFFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCATI, V.; TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts of *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v. 777, n. 1, p. 223-231, 1997.

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.

RAMACHANDA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnological Advances**, v.20, p.101-153, 2002

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

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

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAUTER, A.P.; MATINS, A.; BORGES, C.; FERREIRA, J.; JUSTINO, J.; BRONZE, M.; COELHO, A.V; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionization mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera*: Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 59-64, 2005.

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.

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

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

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

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

RODRIGUES, T. R. **Estudos de alcaloides harmônicos em sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Maracujá Azedo) por SBSE/CLAE-Flu dual**. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

- ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, p. 185-205, 2002.
- ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. *In vitro* cold storage of cork oak shoot cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, n. 2, p. 155-157, 1999.
- ROTILI, M.C.C.; COUTRO, S.; CELANT, V.M.; VORPAGEL, J.A.; BARP, F.K.; SALIBE, A.B.; BRAGA, G.C. Composição, atividade antioxidante e qualidade do maracujá amarelo durante armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 227-240, 2013
- RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M.R.; PEREIRA, T.V.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719–724, 2007.
- SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. *In*: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (eds) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm—Current Research Progress and Applications. Rome: **JIRCAS, Tsukuba/IPGRI**, p. 1–7, 2000.
- SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucelar cells of navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Report**, v. 9, p. 30-33, 1990.
- 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, 2002.
- SALGADO, J.M.; BOMBARDE, T.A.D.; MANSI, D.N.; PIEDADE, S.M.S.; MELETTI, L.M.M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30 n.3, 2010.
- SALMA. M.; ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; COLLIN, M.; ESCOUTE, J.; LARTAUD, M.; YI, J. Y.; KIM, H. H.; VERDEIL, J. L.; ENGELMANN, F. Effect of the successive steps of a cryopreservation protocol on the structural integrity of *Rubia Akane* Nakai hairy roots. **Protoplasma**, v. 251, n. 3, p. 649–659, 2013.
- SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 789-795, 2011.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.
- SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.600-603, 2011.
- SGROTT, R.A.G. **Desenvolvimento de extrato enriquecido em flavonoides a partir de raízes de Wilbrandia ebracteata** COGN. 2016. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2016.

- SHANMUGAM, S.; KARUPPUSAMY, A.; THANGARAJ, P. Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 272-280, 2014.
- SHANMUGAM, S.; MURUGAIYAN, I.; LIMA, B. S.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; NARAIN, N.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; THANGARAJ, P. HPLC-DAD-MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.
- SHENG, Y.X.; LI, L.; WANG, Q.; GUO, H.Z.; GUO, D.A. Simultaneous determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid and benzoic acid in Si-Wu decoction by high-performance liquid chromatography DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 805-810, 2005.
- SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; MELETTI, L.M.M.; PASCHOAL, J.A.R.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.
- SILVEIRA, F.; ROSSI, S.; FERNÁNDEZ, C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.; FERREIRA, F. Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1783-1788, 2011.
- SIMÃO, M. J. **Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* Mast.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 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.
- SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E. J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, p. 1672-1692, 2013.
- SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, E.; SLOTA, J.; PIETRASZEK, J. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, p. 47-53, 2014.
- SOBERÓN, J.R.; SGARIGLIA, M.A.; SAMPIETRO, D.A.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1450–1461, 2007.
- SOLFANELLI, C.; POGGI, A.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 637-646, 2006.
- SORIN, C.; BUSSELL, J.D.; CAMUS, I.; LJUNG, K.; KOWALCZYK, M.; GEISS, G.; MCKHANN, H.; GARCION, C.; VAUCHERET, H.; SANDBERG, G.; BELLINI, C. Auxin

- and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1. **Plant Cell**, v. 17, p. 1343–1359, 2005.
- SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 219-243, 2004.
- STRASSER, M. **Triagem fitoquímica e farmacológica e formulação de nanopartículas de produtos derivados de *Passiflora serratodigitata* L.** 2011. 89p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
- SUBOTIĆ, A.; JEVREMOVIĆ, S.; TRIFUNOVIĆ, M.; PETRIĆ, M.; MILOSEVIĆ, S.; GRUBISIĆ, D. The influence of gibberellic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Gilib. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 14, p. 3223-3228, 2009.
- SUDASINGHE, H.P.; PEIRIS, D. C. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. **PeerJ**, v. 6, p.1-17, 2018.
- 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.
- 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.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. ***Passiflora* passionflowers of the world.** Timber Press, Portland Timber Press, p.430, 2004.
- URAGAMI, A., SAKAI, A.; NAGAI, M. Cryopreservation of dried axially buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 328-321, 1990.
- VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse modelo of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112–119, 2007.
- VASIC, S.M.; STEFANOVIC, O.D.; LICINA, B.Z.; RADOJEVIC, I.D.; COMIC, L.R. Biological activities of extracts from cultivated Granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal**, v. 11, p. 208–18, 2012.
- 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.
- VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v.1, p. 13-25, 2002.
- VIANNA, M. G. **Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares.** 2016. 75p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Pós-Graduação em Biologia Vegetal – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2016.
- VOLK, G.M.; CASPERSEN, A.M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha x piperita*. **Protoplasma**, v. 231, p. 215–226, 2007.

- VON ARNOLD, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: GEORGE, E. F; HALL, M. A.; DE KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. **Springer**, v. 1, 501p.
- 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, L. BAI, Y. SHI, X.; CUI, X.; CUI, S.; ZHANG, F.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen *Ziziphhi Spinozae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 90, p. 399-403, 2008.
- WANG, L.E.; ZHANG, X.Q.; YIN, Y.Q.; ZHANG, Y.H. Augmentative effect of spinosin on pentobarbital-induced loss of righting reflex in mice associated with presynaptic 5-HT1A receptor. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 277–282, 2012.
- WATT, M.P.; THOKOANE, N.L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. In vitro storage of Eucalyptus grandis germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 61, n. 2, p. 161-164, 2000.
- WOHLMUTH, H.; PENMAN, K.G.; PEARSON, T.; LEHMANN, R.P. Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.
- WU, C.H.; DEWIR, Y.H.; HAN, E.J.; PAEK, K.Y. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 3, p. 193-199, 2006.
- 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.; 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.
- YANG, Y.; HE, F.; YU, J. Dynamics analyses of nutrients consumption and flavonoids accumulation in cell suspension culture of *Glycyrrhiza inflata*. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 4, p. 732-734, 2008.
- YAP, L.V.; NOOR, N.M.; CLYDE, M.M.; CHIN, H.F. Cryopreservation of *Garcinia cowa* Shoot Tips by Vitrification: The Effects of Sucrose Preculture and Loading Treatment on Ultrastructural Changes in Meristematic Cells. **CryoLetters**, v. 32, p. 188-196, 2011.
- YIN, S.; ZHANG, Y.; GAO, W.; WANG, J.; MAN, S.; LIU, H. Effects of nitrogen source and phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2013.
- YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000a.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products.**, v. 63, p. 1377-1380, 2000b.

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

ZERAIK, M.L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J.; TITS, M.; YARIWAKE, J.H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, p. 259–265, 2011.

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, 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.

ZIBADI, S.; FARIDC, R.; MORIGUCHID, S.; LUE, S.; FOOE, L.Y.; TEHRANIC, P.M.; ULREICHF, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, p. 408-416, 2007.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. 2007. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. 1104p.

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

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

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. 232-239, 2011.