



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

Ana Carolina Madeira Silveira

**Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de
materiais obtidos *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.**

Rio de Janeiro/RJ

2019

Ana Carolina Madeira Silveira

Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.

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

S587 Silveira, Ana Carolina Madeira.
Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos in vitro de *Passiflora suberosa* L./ Ana Carolina Madeira Silveira.– 2019. 90f. : il.

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

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

CDU 582.842.7

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

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

Assinatura

Data

Ana Carolina Madeira Silveira

Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação de utilização da biodiversidade.

Aprovada em 16 de agosto de 2019.

Orientadores:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Banca examinadora:

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

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

Prof.^a Dra. Renata de Oliveira Garcia
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus pela força e saúde todos os dias durante esta etapa.

Mãe, não existem palavras em nenhum dicionário que expressem o quanto o teu apoio foi essencial para que esta dissertação fosse elaborada. Obrigada por todos os abraços em meio às crises de choro aparentemente incontroláveis (e pelo chocolate escondido na marmitta).

Vovó *Passilguinha* (Ilza) e Vovô Portugal (Carlos Madeira), a netinha tornou-se mestre! Obrigada por cuidarem das minhas plantinhas tão bem e por sempre ter um *KitKat* para adoçar meus dias.

Obrigada pai pelo apoio e por entender como era importante para mim e para minha carreira cursar um mestrado.

Obrigada, Tio Marco por todas as caronas e conselhos importantes.

Pedro, obrigada por sempre entender o tamanho da minha responsabilidade e me incentivar demais. Você, gestor desportivo, me ouviu falar tanto de maracujás que não deveria mais nem aguentar.

Vinicius e Amanda, que loucura! Eu olho para trás e sinto um orgulho enorme de o quão longe nós chegamos. E sei que o mestrado é só o início da nossa caminhada. Lembrem-se: o *smog* é o *fog* tóxico.

Aos meus amigos de outros Carnavais, Barbara, Bruna, Raíza, Letícia, Andressa, Michelle, Rafaela, Orlando, Caroline, Almeno, Thiago, Patrick, Victor Hugo e Gabriel, obrigada por entenderem todas às vezes que eu disse "não posso, eu preciso escrever".

Georgia, obrigada por ser uma orientadora presente e paciente desde 2013 quando eu iniciei na monitoria e até agora no mestrado. Seu incentivo diário foi muito importante para o resultado aqui apresentado.

Para a equipe do Labmit, só posso ser grata pela acolhida em 2015 e pelo auxílio que sempre se fez presente no convívio diário. Professora Elisabeth Mansur, Renata, Bianka, Marcela, Jamine, Raphaela, Tielen, Vitória, Igor, Teresa, Gilson e Mariela obrigada pelas fotos, tabelas, conselhos, artigos compartilhados e por toda a ajuda, apoio ao trabalho e risadas.

A todos os integrantes do NBV, obrigada pela disponibilidade de sempre. Nilda e Eduardo, obrigada pela ajuda nas análises fitoquímicas.

À UERJ, agradeço pela oportunidade de realizar vários sonhos. Desde 2012 até agora, essas paredes cinzas tornaram-se o lugar mais bonito do mundo. Entrei como uma aluna de graduação e saio com muito mais do que títulos ou diplomas.

Agradeço à banca avaliadora pelo tempo e atenção dispensados para a leitura deste trabalho.

E agradeço também ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho. E o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), número de processo 1738612.

It's not always rainbows and butterflies. It's compromise that moves us along.

Maroon 5 – She will be loved

RESUMO

SILVEIRA, Ana Carolina Madeira. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.** 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O gênero *Passiflora* (família Passifloraceae) é composto por cerca de 560 espécies conhecidas popularmente como maracujás, as quais apresentam potencial agrônomo, ornamental e medicinal. *Passiflora suberosa*, a espécie estudada neste trabalho, apresenta resistência a doenças que causam danos à cultura do maracujazeiro, o que justifica seu uso como porta-enxerto, além de ser usada na medicina popular. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade antioxidante de plantas e materiais obtidos *in vitro* de *P. suberosa*. Para isso, calos friáveis foram induzidos a partir de segmentos foliares cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM e mantidos na presença ou ausência de luz por 60 dias. Para o estabelecimento de culturas de raízes adventícias, segmentos radiculares foram excisados das plantas *in vitro* e cultivados na presença de diferentes concentrações das auxinas ANA, AIA e AIB, em frascos de cultura ou do tipo *Erlenmeyer* por 60 dias. Uma intensa multiplicação de raízes foi observada a partir de explantes cultivados em frascos de cultura, na presença de ANA, sendo o maior acúmulo de biomassa obtido nas culturas induzidas na presença de ANA a 2,7 μM . A caracterização fitoquímica de extratos de folhas e raízes de plantas *in vitro*, assim como de calos mantidos na presença ou ausência de luz e de raízes adventícias obtidas em diferentes condições de cultura foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises por CCD indicaram a presença de possíveis flavonoides no extrato de folhas de plantas *in vitro*, além de saponinas nos extratos de todos os outros materiais analisados. As análises por CLAE revelaram a presença de substâncias com espectros de absorção compatíveis com flavonoides no extrato de folhas *in vitro*. Todos os extratos de raízes analisados apresentaram a presença de um sinal comum em 254 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 38 minutos. Foi ainda investigado o potencial antioxidante dos diferentes materiais obtidos *in vitro* por meio dos ensaios de captura do radical DPPH e de CCD-DPPH. A maior atividade antioxidante foi observada em extratos de folhas de plantas mantidas *in vitro*. Esses resultados demonstram, pela primeira vez, o potencial de diferentes sistemas biotecnológicos de *P. suberosa* para a produção de substâncias bioativas.

Palavras-chave: Maracujá. Raízes adventícias. Calogênese. Saponinas. Flavonoides. DPPH.

ABSTRACT

SILVEIRA, Ana Carolina Madeira. **Phytochemical characterization and evaluation of the antioxidant activity of *in vitro*-derived material of *Passiflora suberosa* L.** 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The genus *Passiflora* (family Passifloraceae) is composed of approximately 560 species popularly known as passion fruit, and has agronomic, ornamental and medicinal potential. *Passiflora suberosa*, the species studied in this work, presents resistance to diseases that damage to the passion fruit culture, which justifies its use in grafting, besides being used in folk medicine. The goal of this work was to characterize the phytochemical profile and to evaluate the antioxidant activity of plants and materials obtained *in vitro* of *P. suberosa*. Friable callus were induced from leaf segments cultured on MSM media supplemented with PIC at 28.9 μM in the presence or absence of light for 60 days. For the establishment of adventitious root cultures, root segments were excised from *in vitro* plants and were cultivated in the presence of different concentrations of the auxins NAA, IAA and IBA in culture flasks or *Erlenmeyers* for 60 days. An intense root multiplication was observed from explants cultivated in culture flasks in the presence of NAA, with the highest accumulation of biomass obtained in cultures being cultured in the presence of NAA at 2.7 μM . The phytochemical characterization of extracts from leaves and roots of *in vitro* plants, as well as from calluses maintained in the presence or absence of light, and adventitious roots obtained under different culture conditions was performed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Analyzes by TLC indicated the presence of possible flavonoids in the extract from leaves of *in vitro* plants, and of saponins in the extracts of all other materials analyzed. Analyzes by HPLC revealed the presence of substances with flavonoid compatible absorption spectra in the *in vitro* leaf extract. All root extracts analyzed showed a common signal at 254 nm, with retention time of approximately 38 minutes. The potential antioxidants of the different materials obtained *in vitro* were also investigated by DPPH and TLC-DPPH radical capture assays. The highest antioxidant activity observed in the analyzed samples was the extract of leaves of plants maintained *in vitro*. These results demonstrate, for the first time, the potential of different biotechnological systems of *P. suberosa* for the production of bioactive substances.

Keywords: Passion fruit. Adventitious roots. Callogenesis. Saponins. Flavonoids. DPPH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica de espécies de <i>Passiflora</i> spp.....	16
Figura 2 -	<i>Passiflora suberosa</i> L.....	25
Figura 3 -	Distribuição geográfica de <i>Passiflora suberosa</i> L. no Brasil.....	26
Figura 4 -	Morfogênese a partir de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>Passiflora suberosa</i> cultivados em frascos do tipo <i>Erlenmeyer</i> por 60 dias, na ausência de luz, em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA.....	42
Figura 5 -	Biomassa (g) de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas a partir de segmentos radiculares cultivados em frascos do tipo <i>Erlenmeyer</i> por 60 dias, na ausência de luz, em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA.....	43
Figura 6 -	Formação de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas a partir de segmentos radiculares cultivados em frascos de cultura por 60 dias, na ausência de luz, em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA.....	44
Figura 7 -	Biomassa (g) de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas a partir de segmentos radiculares cultivados em frascos de cultura por 60 dias, na ausência de luz, em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de AIB, AIA e ANA.....	45
Figura 8 -	Calogênese a partir de segmentos foliares de <i>Passiflora suberosa</i> excisados de plantas micropropagadas e cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μ M, na presença ou ausência de luz por 60 dias.....	46
Figura 9 -	Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em diferentes materiais de <i>Passiflora suberosa</i> obtidos <i>in vitro</i>	47
Figura 10 -	Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em diferentes materiais de <i>Passiflora suberosa</i> obtidos <i>in vitro</i>	48
Figura 11 -	Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em diferentes amostras de raízes de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas <i>in vitro</i>	49

Figura 12 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de folhas de plantas de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas <i>in vitro</i>	50
Figura 13 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de calos de <i>Passiflora suberosa</i> cultivados na ausência de luz.....	51
Figura 14 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de raízes de plantas <i>in vitro</i> de <i>Passiflora suberosa</i> , com detecção em UV ₂₅₄ nm.....	52
Figura 15 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas em frascos de cultura em resposta a AIA, com detecção em UV ₂₅₄ nm.....	53
Figura 16 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas em frascos de cultura em resposta a AIB, com detecção em UV ₂₅₄ nm.....	54
Figura 17 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> obtidas em frascos de cultura em resposta a ANA, com detecção em UV ₂₅₄ nm.....	55
Figura 18 -	Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de raízes adventícias de <i>Passiflora suberosa</i> cultivadas em frascos do tipo <i>Erlenmeyer</i> , na presença de ANA a 0,54 µM, com detecção em UV ₂₅₄ nm.....	56
Figura 19 -	Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de diferentes materiais de <i>Passiflora suberosa</i> obtidos <i>in vitro</i>	57
Figura 20 -	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de possíveis flavonoides em materiais <i>in vitro</i> de <i>Passiflora suberosa</i>	58
Figura 21 -	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de possíveis saponinas em materiais <i>in vitro</i> de <i>Passiflora suberosa</i>	59
Figura 22 -	Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de possíveis saponinas em extratos de culturas de raízes adventícias de <i>P. suberosa</i>	60

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Estudos acerca do potencial farmacológico de espécies do gênero <i>Passiflora</i> nos últimos 20 anos.....	19
Quadro 2 - Técnicas de cromatografia utilizadas para a detecção de substâncias bioativas em espécies de <i>Passiflora</i>	23
Quadro 3 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a determinação do perfil cromatográfico de materiais <i>in vitro</i> de <i>P. suberosa</i> , por CLAE-UV-DAD.....	38
Quadro 4 - Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a detecção de flavonoides em materiais <i>in vitro</i> de <i>P. suberosa</i> , por CLAE-UV-DAD.....	38
Tabela 1 - Potencial antioxidante de diferentes materiais <i>in vitro</i> de <i>Passiflora suberosa</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CCD-DPPH	Cromatografia de Camada Delgada associada ao 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CO ₂	Gás carbônico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
GA ₃	Ácido giberélico
KIN	Cinetina
MS	Meio de Cultura de Murashige & Skoog
MSM	Meio de Cultura MS modificado por Monteiro <i>et al.</i> (2000)
NP/PEG	<i>Natural products</i> /polietilenoglicol
PIC	Picloram
R _F	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	Revisão de literatura	16
1.1	Gênero <i>Passiflora</i> L.	16
1.1.1	<u><i>Passiflora suberosa</i> L.</u>	24
1.2	Produção de metabólitos secundários <i>in vitro</i>	27
1.3	Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários em <i>Passiflora</i>	32
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Material vegetal e condições de cultura	35
3.2	Estabelecimento de culturas de raízes adventícias	35
3.3	Indução de calogênese a partir de segmentos foliares	36
3.4	Caracterização fitoquímica	36
3.4.1	<u>Preparo dos extratos vegetais</u>	36
3.4.2	<u>Análise por CCD</u>	36
3.4.3	<u>Análise por CLAE-UV-DAD</u>	37
3.5	Avaliação do potencial antioxidante	39
3.5.1	Ensaio DPPH.....	39
3.5.2	Análise Qualitativa por CCD-DPPH.....	40
3.6	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Estabelecimento de culturas de raízes adventícias	41
4.2	Calogênese a partir de explantes foliares de <i>P. suberosa</i>	42
4.3	Caracterização fitoquímica	46
4.3.1	<u>Análise por CCD</u>	46
4.3.1.1	<i>Análise de flavonoides</i>	46
4.3.1.2	<i>Análise de saponinas</i>	47
4.3.2	<u>Análise por CLAE-UV-DAD</u>	50
4.3.2.1	<i>Análise dos extratos de folhas</i>	50
4.3.2.2	<i>Análise dos extratos de calos</i>	51
4.3.2.3	<i>Análise dos extratos de raízes</i>	52
4.4	Avaliação do potencial antioxidante	56

4.4.1	<u>Ensaio DPPH</u>	56
4.4.2	<u>Análise Qualitativa por CCD-DPPH</u>	57
5	DISCUSSÃO	61
	CONCLUSÕES	66
	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	68

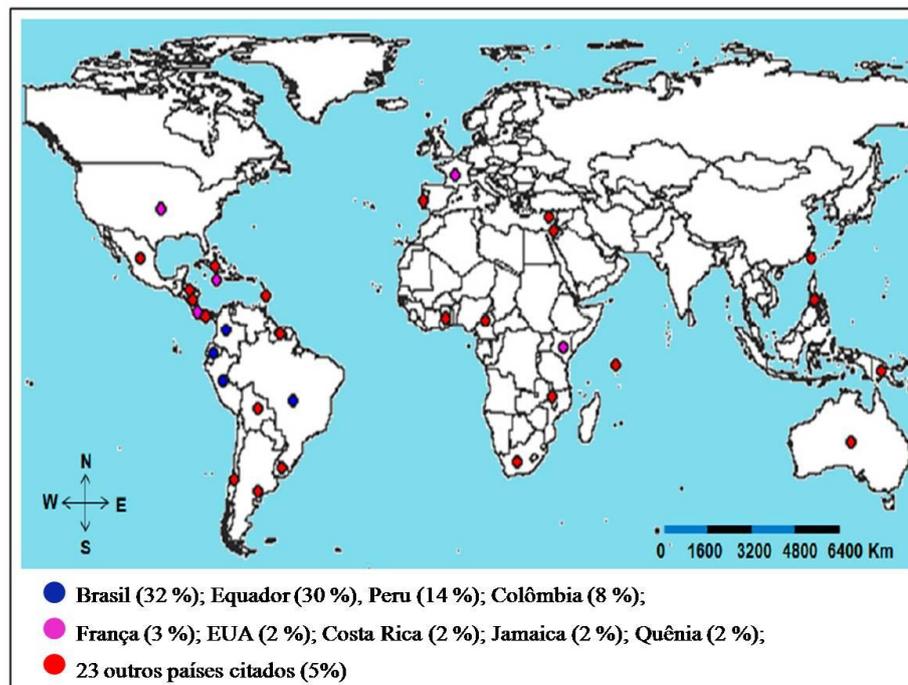
INTRODUÇÃO

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Gênero *Passiflora* L.

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família Passifloraceae, sendo composto por 5 subgêneros e cerca de 560 espécies que estão dispersas entre regiões subtropicais e tropicais (BERNACCI, 2003; VANDERPLANK, 2013), principalmente nas florestas tropicais da América do Sul, especialmente Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Há ainda registros de ocorrências de espécies em países da África, Ásia e Oceania (CERQUEIRA-SILVA, 2014) (FIGURA 1). No Brasil, existem cerca de 120 espécies nativas, sendo a região Centro-Norte o maior centro de distribuição geográfica (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Figura 1 - Distribuição geográfica de espécies de *Passiflora*



Legenda: Países destacados em azul detêm os maiores índices de ocorrência de espécies de *Passiflora*; os destacados em rosa estão na faixa intermediária de número de espécies e os países destacados em vermelho reúnem 5% do total de espécies do gênero.

Fonte: Cerqueira-Silva, 2014.

O gênero *Passiflora* é subdividido em cinco subgêneros, entre os quais *Passiflora* é o que apresenta maior diversidade, com 250 espécies que são originárias da América do Sul (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O subgênero *Decaloba* é o que apresenta o maior número de espécies estudadas, englobando cerca de 230 espécies, distribuídas por toda a América, Ásia e Oceania. O subgênero *Astrophea* abriga 57 espécies arbustivas e lianas na América do Sul, enquanto *Deidamioides* apresenta somente 13 espécies conhecidas, presentes entre as Américas Central e do Sul. *Tetrapathea* é o mais recente subgênero proposto e inclui apenas três espécies de lianas, encontradas na Austrália, Papua-Nova Guiné e Nova Zelândia (KROSNICK et al., 2013; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Os representantes do gênero são conhecidos como maracujás, palavra de origem indígena, das tribos Tupi e Guarani, e que deriva do termo “maraú-ya”, que significa “alimento em formato de cuia” (DAMATTO JUNIOR; LEONEL; PEDROSO, 2005) ou ainda “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo” (ZERAIK et al., 2010). A forma dos frutos é ovoide ou globosa, sendo indeiscentes e apresentando uma casca espessa, com coloração e tamanho variados. As sementes estão dispostas em um envoltório mucilaginoso (CERVI, 1997; YOCKTENG; D’EECKENBRUGGE; SOUZA-CHIES, 2011).

A maioria das espécies do gênero desenvolve flores actinomorfas, grandes e com uma ampla variedade de cores e formas, além de, em algumas espécies, haver a presença de nectários extraflorais. As plantas são lenhosas ou trepadeiras herbáceas, dificilmente em forma de arbusto, e com folhas simples, inteiras ou lobadas, havendo a possibilidade de variação entre indivíduos de uma mesma espécie. A maior parte das espécies desenvolve gavinhas axilares, enquanto que, em outras, essas gavinhas tiveram seus tamanhos reduzidos à forma de espinhos (VANDERPLANK, 2013).

Espécies de maracujá apresentam reconhecida importância agrônômica. No entanto, apesar da grande diversidade de espécies, apenas cerca de 40 são cultivadas entre as 60 que produzem frutos comestíveis. Entre essas, destacam-se o maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), o maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims) e o maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) (MELETTI, 2011; PATIL, et al., 2012; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A cultura do maracujazeiro teve início em caráter domiciliar e de subsistência, mas recebeu atenção da agroindústria, por gerar um retorno econômico elevado e rápido. A presença de açúcares, minerais, carotenos, ácido ascórbico e riboflavinonas, associada ao sabor agradável, são características importantes não só para o mercado de frutas frescas, mas também para os produtos industrializados e processados, como sorvetes, geleias, sucos e outros doces. Assim, o aumento da demanda comercial resultou na fixação de mão-de-obra

rural, com o conseqüente aumento na oferta de empregos diretos nas mais diferentes áreas da cadeia produtiva do maracujá, desde o plantio até a venda (MELETTI, 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo o estado da Bahia responsável pela metade da produção. O maracujá amarelo ocupa cerca de 95% da produção anual do país, que é de aproximadamente 704.000 toneladas em uma área de aproximadamente 59.246 hectares (CERVI, 1997; IBGE, 2017).

Devido à exuberância característica de suas flores, diversas espécies de *Passiflora* são também cultivadas para uso ornamental. No hemisfério norte já foram desenvolvidos, aproximadamente, 400 híbridos com essa finalidade (PEIXOTO, 2005; PIPINO et al., 2008; SOARES-SCOTT et al., 2003). No Brasil, no entanto, o mercado consumidor dessas espécies para fins ornamentais é menor do que em países da Europa (PEIXOTO, 2005). Espécies de *Passiflora* são também reconhecidas pelo grande potencial medicinal, com base em relatos de comunidades indígenas e uso na medicina popular desde o século XIX, com a ingestão de chás e infusões para o tratamento de irritabilidade e ansiedade (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; MIRODDI et al., 2013).

Nos últimos 20 anos, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de investigar outras propriedades farmacológicas de muitas espécies de maracujá, incluindo atividades analgésica, antibacteriana, anticonvulsivante, antidepressiva, antifúngica, anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiviral, diurética, imunoestimulante e neuroprotetora (QUADRO 1). Esses estudos possibilitaram o reconhecimento e a inclusão de algumas espécies do gênero, como *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* L., nas farmacopeias alemã, americana, brasileira, britânica, francesa, indiana e suíça (ANVISA, 2010; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; GOSMANN et al., 2011; PARFITT, 1999).

Essas atividades estão associadas à presença de diversas substâncias, entre as quais alcaloides, flavonoides e saponinas, que são consideradas as classes majoritárias no gênero. Além dessas, também já foram encontrados carboidratos (glicosídeos cianogênicos), lipídeos (carotenoides), componentes proteicos (aminoácidos), óleos essenciais, vitaminas e minerais (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; LOPES; TIYO; ARANTES, 2018; SPARG; LIGHT; VAN STADEN; 2004; STRASSER, 2011; ZIBADI et al., 2007).

Quadro 1 – Estudos acerca do potencial farmacológico de espécies do gênero *Passiflora* nos últimos 20 anos

Espécie	Material vegetal	Atividade farmacológica	Referência
<i>Passiflora</i> spp.	Planta completa	Ansiolítica	SOUSA; MELETTI, 1997
<i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Ansiolítica	DE-PARIS et al., 2002
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Folhas	Ansiolítica	DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002
<i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Ansiolítica	REGINATTO et al., 2006
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Folhas	Ansiolítica	ASLANARGUN et al., 2012
<i>Passiflora foetida</i> L.	Folhas	Analgésica	SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011
<i>Passiflora foetida</i> L.	Planta completa	Analgésica	ASADUJJAMAN et al., 2014
<i>Passiflora foetida</i> L.	Raízes	Antibacteriana	EMIN et al., 2010
<i>Passiflora foetida</i> L.	Folhas e frutos	Antibacteriana	PATIL et al., 2012
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Pó de fibra alimentar, polpa do fruto e sementes	Antibacteriana	LÓPEZ-VARGAS et al., 2013
<i>Passiflora suberosa</i> L.	Folhas	Antibacteriana	BANDARA; PADUMADASA; PEIRIS, 2018
<i>Passiflora alata</i> Curtis, <i>Passiflora foetida</i> L., <i>Passiflora pohlii</i> Mast. e <i>Passiflora suberosa</i> L.	Raízes	Antibacteriana	SIMÃO et al., 2018
<i>Passiflora caerulea</i> L.	Partes aéreas	Antimicrobiana	ANESINI; PEREZ, 1993
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Partes aéreas	Anticonvulsivante	NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Caule e folhas	Antidepressiva	WANG et al., 2013

Espécie	Material vegetal	Atividade farmacológica	Referência
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Planta completa	Antifúngica	QURESHI et al., 1997
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Sementes	Antifúngica	RIBEIRO et al., 2012
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Exocarpo	Anti-hiperglicêmica	SALGADO et al., 2010
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Planta completa	Anti-hiperglicêmica	BARBALHO et al., 2011
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Folhas	Anti-hiperglicêmica	GUPTA et al., 2012
<i>Passiflora nítida</i>	Folhas	Anti-hiperglicêmica	MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013
<i>Passiflora alata</i> Curtis	Folhas	Anti-hiperglicêmica	COLOMEU et al., 2014
<i>Passiflora suberosa</i> L.	Folhas	Anti-hiperglicêmica	SUDASINGHE; PEIRIS, 2018
<i>Passiflora nepalensis</i> Walp.	Planta completa	Anti-hipertensiva	PATEL et al., 2011
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Planta completa	Anti-inflamatória	BORELLI et al., 1996
<i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Anti-inflamatória	VARGAS et al., 2007
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Anti-inflamatória	ZUCOLOTTO et al., 2009
<i>Passiflora foetida</i> L.	Folhas	Anti-inflamatória	SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011
<i>Passiflora nítida</i>	Folhas	Anti-inflamatória	MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013
<i>Passiflora alata</i> Curtis	Folhas	Antioxidante	MÜLLER et al., 2005
<i>Passiflora alata</i> Curtis e <i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Antioxidante	RUDNICKI et al., 2007
<i>Passiflora foetida</i> L.	Caule	Antioxidante	ARUNG et al., 2009
<i>Passiflora edulis</i> Sims e <i>Passiflora alata</i> Curtis	Exocarpo	Antioxidante	ZERAIK et al., 2011
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Pó de fibra alimentar, polpa e sementes	Antioxidante	LÓPEZ-VARGAS et al., 2013

Espécie	Material vegetal	Atividade farmacológica	Referência
<i>Passiflora nítida</i> Kunth	Folhas	Antioxidante	MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013
<i>Passiflora manicata</i> (Juss.)	Folhas	Antioxidante	MORRONE et al., 2013
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (Cultivares: roxa, Frederick, amarela e rosa), <i>Passiflora. Edulis</i> Sims, <i>Passiflora maliformis</i> L. e <i>Passiflora quadrangularis</i> L.	Frutos	Antioxidante	RAMAIYA et al., 2013
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Frutos	Antioxidante	ROTILI et al., 2013
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Antioxidante	SILVA et al., 2013
<i>Passiflora alata</i> Curtis	Folhas	Antioxidante	COLOMEU et al., 2014
<i>Passiflora alata</i> Curtis	Folhas	Antioxidante	LUGATO et al., 2014
<i>Passiflora pohlii</i> Mast.	Raízes	Antioxidante	SIMÃO et al., 2016
<i>Passiflora suberosa</i> L.	Folhas	Antioxidante	BANDARA; PADUMADASA; PEIRIS, 2018
<i>Passiflora edulis</i> Sims e <i>Passiflora foetida</i> L.	Frutos	Antitumoral	PURICELLI et al., 2003
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Folhas	Antiviral	MÜLLER et al., 2007
<i>Passiflora incarnata</i> L.	Folhas	Diurética	DHAWAN, DHAWAN; SHARMA, 2004
<i>Passiflora</i> sp.	Folhas	Imunoestimulante	SILVEIRA et al., 2011
<i>Passiflora foetida</i> L.	Folhas	Neuroprotetora	WATTANATHORN et al., 2012

Os alcaloides presentes no gênero incluem os do tipo harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol ou do tipo indólicos, tendo sido encontrados nos caules e folhas de *P. incarnata*, *P. alata*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. incarnata*, *P. violacea* Veil., *P. edulis*, *P. suberosa* L., *P. morifolia* Mast. e *P. quadrangularis* L. Essas substâncias estão relacionadas aos potenciais anti-hipertensivo, ansiolítico e antioxidante apresentados por essas espécies (AVULA et al., 2012; FRYE; HAUSTEIN, 2007; LUTOMSKII; MALEK, 1975; MÜLLER,

2006; PEREIRA; VILEGAS, 2000; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; SANTOSH et al., 2011; TSUCHIYA et al., 1999) (QUADRO 1).

Os flavonoides descritos no gênero são encontrados, em sua maioria, nos frutos e nas folhas, e são principalmente do tipo C-glicosídicos, nos quais os açúcares estão diretamente ligados ao núcleo aromático da molécula, através de uma ligação carbono-carbono (BARBALHO et al., 2011; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; GOSMANN et al., 2011; MÜLLER et al., 2005; FERRERES et al., 2007; LOPES; TIYO; ARANTES, 2018; MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; RAFFAELLI et al., 1997; ZERAIK, 2010; ZERAIK et al., 2010). Entre os mais de 50 tipos de flavonoides já descritos para o gênero, os principais são vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosídeo e swertisina (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; GOSMANN et al., 2011).

As saponinas são consideradas substâncias majoritárias em algumas espécies de *Passiflora*, como em *P. edulis* e *P. alata* (BOMBARDELLI et al., 1975; BIRK; PROVENSI; GOSMANN, 2005; DOYAMA et al., 2005; FRANCIS et al., 2002; INGALE; HIVRALE, 2010; REGINATTO et al., 2001, 2004; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; WANG et al., 2013; YOSHIKAWA et al., 2000a, b). A presença dessas substâncias está associada aos potenciais anti-inflamatório, antihemolítico, antifúngico, antibacteriano, antioxidante e antiviral (FRANCIS et al., 2002; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; INGALE; HIVRALE, 2010).

A separação, o isolamento e a identificação dessas substâncias têm sido realizados por meio de técnicas cromatográficas, incluindo a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (QUADRO 2).

A técnica de CCD consiste na separação das substâncias de um extrato através da sua migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana, como uma placa de sílica-gel. A CCD permite a rápida análise simultânea de diferentes amostras, sendo que a identificação das substâncias detectadas pode ser feita através da comparação dos diferentes fatores de retenção (R_F), em relação a um padrão (SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017; WAGNER; BLADT, 2001). A técnica tem sido muito utilizada em estudos de análise fitoquímica de materiais de *Passiflora* (SIMÃO et al., 2016; 2018b).

Na CLAE, a separação das substâncias da amostra ocorre de modo mais específico, quando comparada com a análise em CCD, e é baseada no deslocamento seletivo das moléculas em consequência das interações que ocorrem entre a amostra e as fases móvel e estacionária. Existem diferentes classificações da CLAE, como a de fase normal, onde a

polaridade da fase estacionária, comumente feita de sílica na coluna cromatográfica, é maior do que a da fase móvel, e a de fase reversa, quando ocorre o contrário (ZERAİK, 2010). Além disso, a CLAE é uma metodologia de alta sensibilidade, sendo possível o uso de variados detectores, como o de UV, de fluorescência e de índice de refração (ZERAİK, 2010). Porém, para a identificação e elucidação estrutural das substâncias, é necessário que sejam empregadas outras técnicas, como a espectrometria de massas acoplada à CLAE (CLAE-EM) ou a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (LANÇAS, 2009; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017).

Quadro 2 – Técnicas de cromatografia utilizadas para a detecção de substâncias bioativas em espécies de *Passiflora*

Espécie	Análise cromatográfica	Referência
<i>Passiflora alata</i> , <i>Passiflora edulis</i> Sims	CCD, CLAE	DE PARIS et al., 2002
<i>Passiflora</i> spp.	CCD	BIRK et al., 2005
<i>Passiflora alata</i> Curtis	CCD	REGINATTO et al., 2006
<i>Passiflora caerulea</i> L.	CCD	BUSILACCHI et al., 2008
<i>Passiflora incarnata</i> L.	CCD, CLAE, CLAE –EM	WOHLMUTH et al., 2010
<i>Passiflora edulis</i> Sims	CLAE	ZERAİK et al., 2010
<i>Passiflora incarnata</i> L.	CLAE	ELSAS et al., 2011
<i>Passiflora edulis</i> Sims, <i>Passiflora alata</i> Curtis	CLAE	ZERAİK et al., 2011
<i>Passiflora</i> spp.	CLAE, CLAE-EM	ZUCOLOTTO et al., 2012
<i>Passiflora caerulea</i> L.	CLAE, CCDAE	OZAROWSKI et al., 2012
<i>Passiflora bahiensis</i> Klotzsach, <i>Passiflora coccínea</i> Aubl, <i>Passiflora quadrangularis</i> L., <i>Passiflora sidifolia</i> M. Roem., <i>Passiflora vitifolia</i> Kunth	CLAE-EM	SAKALEM et al., 2012
<i>Passiflora manicata</i> (Juss.)	CLAE	MORRONE et al., 2013
<i>Passiflora caerulea</i> L., <i>Passiflora incarnata</i> L.	CLAE, CCDAE	OZAROWSKI et al., 2013
<i>Passiflora edulis</i> Sims	CG-EM	RAZIA et al., 2014

Espécie	Análise cromatográfica	Referência
<i>Passiflora loefgrenii</i> Vitta	CLAE-DAD	ARGENTIERI et al., 2015
<i>Passiflora pohlii</i> Mast.	CCD	SIMÃO et al., 2016
<i>Passiflora cincinnata</i>	CLAE-DAD	DE LAVOR et al., 2018
<i>Passiflora alata</i> Curtis, <i>Passiflora foetida</i> L., <i>Passiflora pohlii</i> Mast., <i>Passiflora suberosa</i> L.	CCD	SIMÃO et al., 2018
<i>Passiflora molíssima</i>	CLAE-EM	BALLESTEROS-VIVAS et al., 2019
<i>Passiflora tripartitavar.</i> mollissima	CLUE	LOIZZO et al., 2019
<i>Passiflora</i> spp.	CLUE	MCCULLAGH et al., 2019
<i>Passiflora alata</i> Curtis	CLAE	PONZILACQUA et al., 2019
<i>Passiflora edulis</i> Sims	CLUE	VAGULA et al., 2019

Legenda: CCD – Cromatografia em Camada Delgada; CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas; CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência; CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotiodo; CCDAE – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência; CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.

1.1.1. *Passiflora suberosa* L.

Passiflora suberosa L., a espécie estudada neste trabalho, pertence ao subgênero *Decaloba*, e é conhecida no Brasil por diversos nomes populares, como maracujá–mirim, maracujazinho, maracujá-cortiça, ou maracujazinho-cortiça-preto (PORTER-UTLEY, 2014).

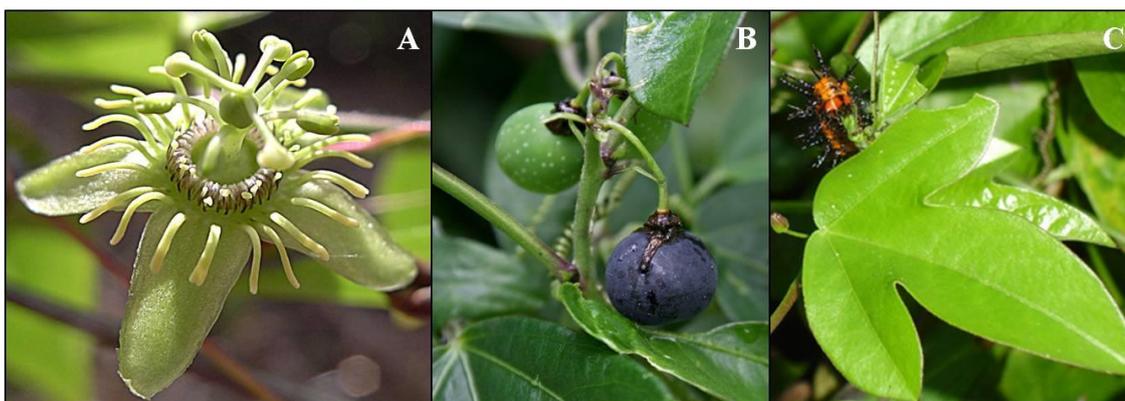
Suas flores são pequenas (1,3 a 2,5 cm de diâmetro), pentâmeras, com sépalas de cor amarelada ou esverdeada e sem a presença de pétalas (FIGURA 2A), com a possibilidade de dispor de uma ou duas brácteas e duas séries de coronas de filamentos filiformes. A floração ocorre durante todo o ano, porém seu período ótimo é no mês de setembro, no horário da

manhã, com o período de frutificação ocorrendo entre janeiro e maio (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997).

As plantas são trepadeiras de pequeno porte. Quando jovens apresentam caule cilíndrico e, na forma adulta, desenvolvem uma camada suberosa espessa, cuja característica nomeia esta espécie. Os frutos são de tamanho reduzido (0,6 a 1,5 cm de diâmetro), do tipo baga, com formato oblongo e com polpa carnosa (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2013). Possuem casca de coloração esverdeada quando imaturos e roxo intenso quando amadurecem (FIGURA 2B). As sementes são assimétricas, alveolares e de forma oval, com tamanho aproximado de 3,0 x 2,5 mm (CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

As plantas de *P. suberosa* apresentam grande plasticidade morfológica, podendo ser polimórficas em um mesmo indivíduo. Suas folhas variam entre inteiras ou trilobadas, e apresentam coloração verde (FIGURA 2C), podendo se tornar roxas quando expostas à radiação solar por longos períodos, devido ao acúmulo de antocianinas e derivados fenólicos (BARP et al., 2006). Essas variações fenotípicas dificultam a sua classificação taxonômica, havendo uma vasta sinonímia para os indivíduos da espécie (CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014).

Figura 2 - *Passiflora suberosa* L.



Legenda: A –Flor; B –Fruto; C – Folha.

Fonte: Flora do Brasil 2020. Disponível em:

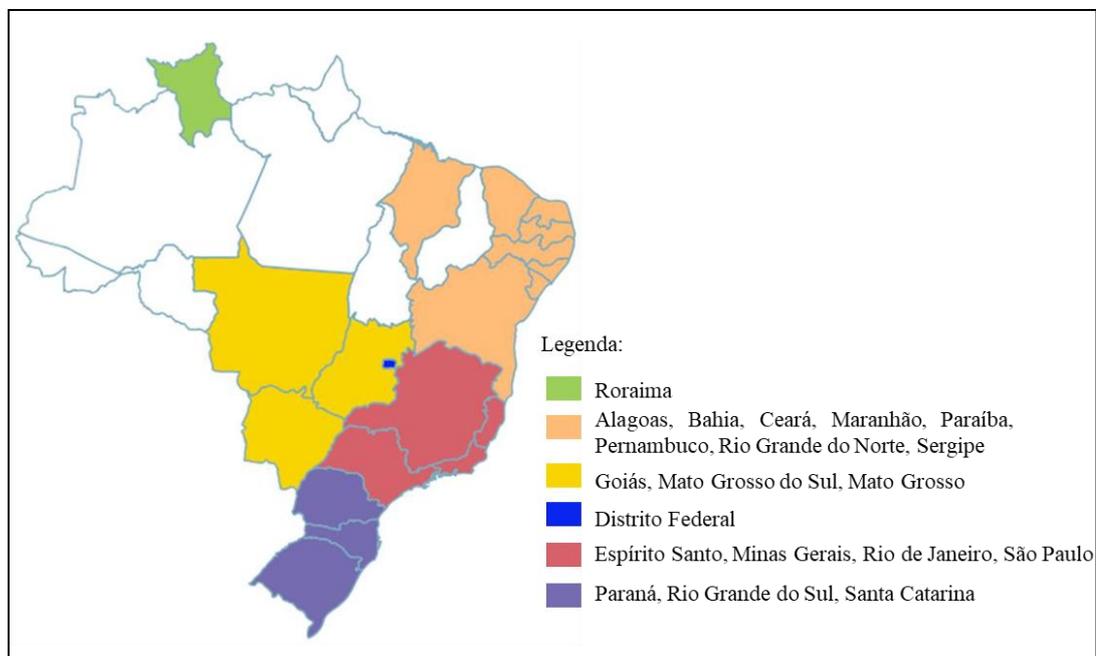
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12564>>. Acesso em: 28 de março de 2018.

Passiflora suberosa é nativa do continente americano, com predomínio nas regiões tropicais da América Central e do Sul (ULMER; MACDOUGAL, 2004). No Brasil, a espécie

pode ser encontrada em biomas altamente impactados por ação antrópica, como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BERNACCI et al., 2015) (FIGURA 3).

Diferindo de outras espécies do gênero, *P. suberosa* é autocompatível (CRUZ et al., 2008) e sua reprodução sexuada depende da polinização por entomofilia e ornitofilia. As abelhas das espécies *Plebeia droryana* e *Augochlorella michaelis*, e a vespa *Mischocyttarus interjectus* são seus agentes polinizadores mais usuais (KOSCHNITZKE; SAZIMA, 1997). Borboletas da espécie *Heliconius charitonia* não são polinizadores de *P. suberosa*, mas apresentam uma relação evolutiva com a espécie, uma vez que usam o pólen e o néctar como fontes nutricionais, e as folhas para deposição de ovos (CRUZ et al., 2008; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Figura 3 - Distribuição geográfica de *Passiflora suberosa* L. no Brasil



Fonte: Flora do Brasil 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12564>>. Acesso em: 28 de março de 2018.

A coloração arroxeadada e o tamanho reduzido dos frutos, além de suas flores exóticas, constituem características que conferem à *P. suberosa* grande potencial ornamental (CERVIL; LINSINGEN, 2008; CRUZ et al., 2008; PORTER-UTLEY, 2014; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Além disso, a espécie possui interesse agrônômico, uma vez que apresenta resistência a patógenos, como o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV) (OTONI et al., 1996) e o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae*. Por essa razão, vem sendo

empregada como porta-enxerto na cultura do maracujá-amarelo (FALEIRO et al., 2005; GARDNER, 1989) e considerada fonte de variabilidade para o melhoramento das espécies cultivadas (FALEIRO et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005).

Ao contrário da maior parte das espécies de *Passiflora*, os registros das atividades farmacológicas de extratos de *P. suberosa* são recentes, tendo sido descritas atividades hipoglicemiante e hipolipidêmica (SUDASINGHE; PEIRIS, 2018), além de antibacteriana, antioxidante e citotóxica (BANDARA; PADUMADASA; PEIRIS, 2018). Adicionalmente, estudos fitoquímicos demonstraram a presença de dois glicosídeos cianogênicos ciclopentenoides, denominados de passisuberosina e epapissuberosina (SPENCER; SEGLER, 1987), além de oito tipos diferentes de antocianinas nos extratos de frutos (KIDOY et al., 1997).

As espécies do gênero *Passiflora*, assim como outras espécies vegetais, produzem diversas substâncias derivadas de processos bioquímicos, chamadas de metabólitos, que apresentam propriedades biológicas de interesse, pois podem ser utilizadas como fármacos, agroquímicos, cosméticos, pigmentos, e nutracêuticos, o que justifica os diversos trabalhos com o gênero.

1.2. Produção de metabólitos secundários *in vitro*

O metabolismo vegetal pode ser dividido entre primário e secundário (ou especial). O metabolismo primário está diretamente ligado ao crescimento, desenvolvimento e reprodução, enquanto que o metabolismo secundário ou especial está relacionado à produção de substâncias que permitem a interação dos vegetais com o meio ambiente e, conseqüentemente, sua melhor adaptação. Essas substâncias exercem funções associadas à defesa contra patógenos e proteção contra radiação ultravioleta e perda de água, além de atuarem na atração de polinizadores. Dessa forma, como muitas dessas substâncias são biologicamente ativas, podem ser exploradas comercialmente como fármacos e cosméticos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; DEWICK, 2002; RAMACHANDRA-RAO; RAVISHANKAR, 2002; RAVEN; EVERT, EICHHORN, 2010).

Durante o século XX, a busca por tratamentos médicos de menor custo e com menos efeitos colaterais levou a um aumento no uso das plantas para fins medicinais (FIRMO et al., 2012). Contudo, a produção de plantas por meio de técnicas tradicionais de cultivo apresenta desvantagens como a dificuldade de adaptação em solos e climas que não são os de origem, a

suscetibilidade a pragas e patógenos, a influência da sazonalidade e de estágios de desenvolvimento da planta, além do extrativismo exagerado aumentar o risco de extinção.

O desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* representa uma alternativa para a produção tradicional de plantas com potencial medicinal, uma vez que permitem a produção massal de mudas como fontes de matéria-prima, de forma contínua e homogênea, com estado fisiológico uniforme e sob condições controladas, independente de variações climáticas, tipos de solo ou fases de crescimento (ANTOIGNONI et al., 2007; GUERRA; NODARI, 2006). Assim, esses sistemas permitem a produção de plantas, células ou órgãos, além de metabólitos secundários, em quantidades que atendam à demanda e, ao mesmo tempo, podem contribuir para a conservação de germoplasma, o melhoramento genético e os estudos acerca das vias bioquímicas envolvidas no processo (BAQUE et al., 2012; MORAIS et al., 2012).

Os sistemas *in vitro* são baseados nas técnicas de cultura de células e tecidos vegetais, que por sua vez se fundamentam na totipotência dessas células, que podem retornar a um estágio similar ao meristemático e, portanto, redefinir seus padrões de diferenciação, podendo regenerar novos órgãos ou indivíduos completos e geneticamente idênticos à matriz doadora, em resposta a sinais específicos (NETO; ANDRADE, 2011).

A produção de plantas *in vitro* a partir de pequenos fragmentos de tecidos, denominados explantes, pode ocorrer por meio da multiplicação de tecidos meristemáticos pré-existentes, da organogênese ou da embriogênese somática (CAMPOS, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006; TERMIGNONI, 2005).

A multiplicação de meristemas ocorre a partir de ápices caulinares ou radiculares, e gemas axilares (HITMI; BARTHOMEUF; SALLANON, 2000; KATOH et al., 2004), que são constituídos por células indiferenciadas e que estão em constante divisão celular, apresentando competência para formar órgãos ou plantas completas. Essa via de regeneração é principalmente empregada na conservação de germoplasma, porque o risco de haver alterações genéticas é mais baixo, uma vez que as plantas seguem o processo natural de desenvolvimento (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GUERRA; NODARI, 2006). Esse sistema também pode ser empregado para a obtenção de plantas livres de vírus, porque as células presentes na região meristemática estão, geralmente, livres de patógenos devido ao isolamento vascular do tecido (HITMI et al., 2000; KATOH et al., 2004).

A embriogênese somática ocorre quando células somáticas originam embriões, sem haver fusão de gametas. Os embriões somáticos apresentam uma estrutura bipolar, com a presença de meristemas apicais e radiculares, o que permite a obtenção de plantas completas sem a necessidade de uma fase de enraizamento, comum nos processos organogênicos (VON

ARNOLD; CLAPHAM, 2008). Além disso, o desenvolvimento desses embriões segue os mesmos estágios observados na embriogênese zigótica (globular, codiforme, torpedo, cotiledonar). A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta ou indireta (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; RIZVI et al., 2013). No processo direto, os embriões surgem diretamente a partir da superfície do explante, enquanto que, de forma indireta, ocorre a formação intermediária de calos, que são massas de células com crescimento desorganizado, a partir das quais os embriões são então formados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006; CAMPOS, 2008).

A organogênese *in vitro* consiste na formação de brotos ou órgãos, a partir de tecidos não meristemáticos. Nos processos organogênicos ocorre, inicialmente, a desdiferenciação do tecido de origem, fazendo com que as células retornem a um estágio similar ao meristemático. Dessa forma, as células sofrem uma reprogramação gênica que possibilita a aquisição de novas competências que resultarão em um processo de rediferenciação para a formação de novos órgãos. Assim como na embriogênese somática, a organogênese pode ocorrer de forma direta ou indireta.

Além da produção de plantas, culturas de órgãos, como as raízes adventícias, ou culturas desorganizadas, como calos e suspensões celulares, também podem ser utilizadas para a produção *in vitro* de metabólitos secundários.

Como as raízes são órgãos naturalmente capazes de produzir e armazenar uma grande variedade de metabólitos, as raízes adventícias produzidas *in vitro* podem apresentar padrões de biossíntese análogos aos encontrados nas raízes de plantas mantidas em condições naturais, além de permitir ainda a modulação desse padrão biossintético (FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999; BAIS et al., 2001). Essa técnica tem sido bastante utilizada para a produção em larga escala de metabólitos com potencial medicinal em diferentes espécies, incluindo *Decalepis arayalpathra* (SUDHA; SEENI, 2001), *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006), *Panax ginseng* C.A. Meyer (KIM et al., 2009), *Morinda citrifolia* (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010), *Hypericum perforatum* L. (CUI et al., 2010, 2011), *Aloe vera* (LEE et al., 2011), *Castilleja tenuiflora* Benth (GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012), *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (YIN et al., 2013), *Arachis hypogaea* (YANG et al., 2015), *Passiflora pohlii* (SIMÃO et al., 2016), *Chrysanthemum cinerariaefolium* (KHAN et al., 2017), *Passiflora foetida* (CARUSO, 2017) e *Cleome rosea* (SIMÕES et al., 2009; CORDEIRO et al., 2015).

A indução de raízes adventícias *in vitro* pode ocorrer por meio da transformação genética com o uso de *Agrobacterium rhizogenes*, uma bactéria presente naturalmente no solo, capaz de infectar células vegetais, resultando na proliferação rizogênica. Essas raízes

apresentam, no geral, estabilidade de síntese de metabólitos associada a altas taxas de multiplicação. Porém, como algumas espécies são recalcitrantes à infecção pela *A. rhizogenes* (SUDHA; SEENI, 2001), o estabelecimento de sistemas de cultura de raízes com base na manipulação das condições de cultura, como luz, temperatura e adição de reguladores de crescimento, é considerado como uma alternativa viável para a produção de metabólitos *in vitro* (MURTHY, HAHN; PAEK, 2008; WU et al., 2006).

Embora o metabolismo vegetal seja, em parte, controlado de maneira tecido-específica, fazendo com que, em algumas espécies, culturas desorganizadas sofram perdas na capacidade de produção e acúmulo de metabólitos (MURTHY, HAHN; PAEK, 2008), nos últimos anos, culturas de calos e suspensões celulares têm sido muito utilizadas para a produção de metabólitos secundários *in vitro* (ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013; ALI et al., 2015; CAI; KNORR; SMETANSKA, 2012; DEEPTHI; SATHEESHKUMAR, 2015; GADZOVSKA-SIMIC, et al., 2012; GONÇALVES; ROMANO, 2013; GUPTA et al., 2013; NAGELLA; MURTHY, 2010; WANG et al., 2015; YUE et al., 2016).

Culturas de calos, assim como outros sistemas *in vitro*, são geralmente induzidas pela adição de reguladores de crescimento no meio de cultura, que são responsáveis por estimular o processo de dediferenciação das células do tecido original. No entanto, algumas vezes, não ocorre a rediferenciação, pois nem todas as células do calo desenvolvem competência para organogênese ou embriogênese somática (CAMPOS, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA; NODARI, 2006; SUGIMOTO; GORDON; MEYEROWITZ, 2011). Os calos que apresentam esse comportamento são chamados de não-morfogênicos.

Além da capacidade morfogênica, os calos podem ser classificados quanto à coloração, consistência e potencial de produção de substâncias de interesse (FUMAGALI et al., 2008). Quanto à consistência, podem ser classificados como friáveis, compactos ou mistos. Os calos friáveis apresentam menor grau de compactação das células, que se destacam com maior facilidade do que as de calos compactos. Calos mistos apresentam estruturas compactas e friáveis (LAKSHMANAN, 2006).

Calos de consistência friável podem ser utilizados para o estabelecimento de culturas de células em suspensão quando inoculados em meio líquido e mantidos sob agitação constante (FUMAGALI et al., 2008; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). As suspensões celulares também podem ser amplamente empregadas para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, uma vez que esse sistema permite, com maior facilidade, a coleta das substâncias liberadas no meio de cultura (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; GUERRA; NODARI, 2006).

A produção de metabólitos *in vitro* pode ser otimizada pela modulação dos parâmetros de cultura, como a composição do meio de cultura, incluindo sais minerais, vitaminas e o tipo e a concentração de reguladores de crescimento, além das condições físicas, como o tipo de frasco e de tampa, a temperatura e as condições de iluminação (ANDRADE, 2002).

Os meios de cultura são geralmente compostos por sais inorgânicos, que são responsáveis por fornecer os macronutrientes (cálcio, enxofre, fósforo, magnésio, nitrogênio e potássio) e os micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco), além de vitaminas hidrossolúveis. Na cultura *in vitro* podem ser também utilizados hormônios vegetais e/ou reguladores de crescimento, substâncias sintéticas que produzem efeitos similares ao dos hormônios naturalmente produzidos pela planta (TAGLIACOZZO, 1998), os quais irão atuar em células-alvo, a fim de desencadear respostas fisiológicas que podem alterar tanto os padrões de desenvolvimento da planta, como as vias de biossíntese de metabólitos (CID; TEIXEIRA, 2014; TERMIGNONI, 2005).

Os tipos de frasco e de tampa utilizados na cultura também podem afetar o desenvolvimento das culturas *in vitro*, uma vez que influenciam as trocas gasosas com o ambiente externo. Frascos de cultura completamente vedados geralmente têm como consequência o acúmulo de gases como etileno e gás carbônico (CO₂) e a saturação de vapor de água interno, diminuindo a transpiração, o que pode resultar na deficiência de elementos minerais e na hiperhidricidade dos propágulos (ANDRADE, 2002; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998; OZAROWSKI; THIEM, 2013).

A temperatura e as condições de iluminação são fatores ambientais que podem influenciar significativamente o desenvolvimento das plantas *in vitro*, bem como a biossíntese de metabólitos secundários. A luz é responsável pelo fototropismo das plantas (SORGATO et al., 2015) e pode influenciar a resposta morfogênica, não dependendo apenas da sua presença ou ausência, mas também da qualidade (comprimento de onda), quantidade (fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo) (LAZZARINI et al., 2017; ROCHA et al., 2010).

Outra possibilidade de modulação da capacidade biossintética é a eliciação, que consiste na adição de substâncias e/ou exposição a condições que interferem no metabolismo do vegetal, simulando condições ambientais desfavoráveis, podendo, inclusive, levar à síntese de substâncias que naturalmente não seriam sintetizadas. Esses eliciadores podem ser abióticos, como metais pesados ou radiação do tipo ultravioleta (UV), ou bióticos, como extratos de fungos, ácido salicílico ou ácido jasmônico. A concentração do eliciador, o momento de adição na cultura, o tempo de contato do eliciador com os tecidos e a densidade de inóculo

são alguns dos fatores a serem considerados (GUNDLACH et al., 1992; NAMDEO, 2007; SAHU; GANGOPADHYAY; DEWANJEE, 2013 YAN et al., 2006).

1.3. Produção *in vitro* de metabólitos secundários em *Passiflora*

Apesar dos diversos trabalhos sobre o desenvolvimento de sistemas *in vitro* para a produção e a conservação de espécies de *Passiflora* (ANAND et al., 2012; ANTONIAZZI et al., 2018; CARVALHO et al., 2014; DIAS et al., 2010; GARCIA et al., 2011a; MACHADO et al., 2010; MERHY, 2014; PACHECO et al., 2012; PAIM PINTO et al., 2010; PAIM PINTO et al., 2011; PINTO et al., 2010; PRAMMANEE et al., 2011; RAGAVENDRAN et al., 2012; RÊGO et al., 2011; ROCHA et al., 2012; ROCHA et al., 2015; ROSA; DORNELAS, 2012; ROSA et al., 2016; SANTOS et al., 2010; SEVERIN et al., 2011; SILVA; CARVALHO, 2014; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2015; SOARES et al., 2012; PACHECO et al., 2016; VIEIRA et al., 2014), há poucos relatos sobre a produção de metabólitos ou substâncias bioativas a partir de plantas e materiais obtidos *in vitro* dessas espécies.

Em *P. alata*, a produção do alcaloide harmiana foi estudada em culturas de calos e de células em suspensão em resposta a 6-benzilaminopurina (BAP), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina. Embora esse alcaloide ocorra naturalmente em suas folhas, sua síntese não foi observada nos sistemas *in vitro* avaliados (MACHADO et al., 2010). Por outro lado, Lugato e colaboradores (2014) relataram a presença de substâncias fenólicas com potencial antioxidante em calos friáveis, culturas de células em suspensão e folhas de plantas *in vitro* ou aclimatizadas de *P. alata*.

A produção de flavonoides foi aumentada em culturas de calos não-morfogênicos de *P. quadrangularis* derivados de explantes foliares, após eliciação por UV-B e cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D (ANTOIGNONI et al., 2007). Em *P. garckeii*, a eliciação de culturas de células em suspensão com extrato de levedura provocou um aumento na capacidade de síntese de substâncias aromáticas (FRACCAROLI et al., 2008).

Mais recentemente, a produção de flavonoides e saponinas foi evidenciada em folhas e raízes de plantas *in vitro* de *P. pohlii*, respectivamente. Além disso, saponinas também foram detectadas em culturas de raízes adventícias obtidas em resposta a diferentes auxinas. Esses materiais apresentaram elevada capacidade antioxidante (SIMÃO et al., 2016).

A morfogênese *in vitro* de algumas espécies do gênero *Passiflora*, incluindo *P. alata*, *P. foetida*, *P. pohlii* e *P. suberosa*, tem sido estudada pelo grupo do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ) nos últimos 13 anos. Esses estudos permitiram o estabelecimento de diferentes sistemas de cultura de tecidos (CARUSO, 2017; FALCÃO, 2011; GARCIA et al., 2011a; PACHECO et al., 2012; MERHY, 2014; LUGATO, 2014; SIMÃO et al., 2016), os quais serviram de base para o desenvolvimento de protocolos para a conservação *in vitro* por crescimento lento e criopreservação (FALCÃO, 2011; GARCIA et al., 2011b; MERHY et al., 2014; VIANNA, 2016; SIMÃO et al., 2018a), além de constituírem sistemas para a produção *in vitro* de metabólitos secundários de interesse farmacológico (LUGATO et al., 2014; SIMÃO et al., 2016; SIMÃO et al., 2018b).

Para *P. suberosa*, já foram estabelecidos sistemas para a produção *in vitro* de plantas e calos morfogênicos e não-morfogênicos, de consistência compacta e friável, em resposta a diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento (GARCIA et al., 2011a). Além disso, foram também estabelecidos protocolos de criopreservação de ápices caulinares utilizando as técnicas de encapsulamento-vitrificação e vitrificação em placas de alumínio (V-Crioplaca) (GARCIA et al., 2011b; VIANNA, 2016). No entanto, apesar de estudos preliminares realizados pelo grupo apontarem a presença de flavonoides em extratos de folhas de plantas obtidas *in vitro* (MERHY et al., 2012; SIMÃO et al., 2018b), ainda não foram realizados estudos fitoquímicos mais amplos com os materiais *in vitro* dessa espécie.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade antioxidante de diferentes materiais obtidos *in vitro* de *Passiflora suberosa* L.

Objetivos específicos:

- Estabelecer sistemas de culturas de raízes adventícias a partir de segmentos radiculares de plantas *in vitro*, avaliando a influência de diferentes tipos e concentrações de auxinas, além de diferentes frascos de cultura;
- Induzir a produção de calos friáveis a partir de explantes foliares excisados de plantas *in vitro*, na presença ou ausência de luz;
- Comparar os perfis fitoquímicos de plantas, calos e culturas de raízes adventícias obtidos *in vitro*, por meio de CCD e CLAE;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos produzidos a partir dos materiais obtidos *in vitro*, por meio dos ensaios de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e CCD-DPPH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultura

Plantas de *P. suberosa* obtidas a partir da germinação *in vitro* e mantidas nos últimos 11 anos no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas (Labmit, NBV/UERJ) (GARCIA et al., 2011a) foram utilizadas como fontes de materiais botânicos para este trabalho. Um exemplar representativo das plantas cultivadas em condições naturais encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ 12783.

Para as culturas *in vitro* foi utilizado o meio basal MSM sólido (MONTEIRO et al., 2000), contendo vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,7%, quando necessário. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C e 1,0 atm). As plantas *in vitro* foram mantidas em meio MSM ½ (meio MSM com metade da concentração de sais e vitaminas, e sacarose a 1,5%), solidificado com ágar a 0,7%, por meio de subculturas de segmentos caulinares contendo de dois a quatro nós, a cada quatro semanas.

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

3.2. Estabelecimento de culturas de raízes adventícias

Segmentos radiculares com cerca de 1,0 cm, contendo o meristema apical da raiz, foram excisados de plantas *in vitro* com aproximadamente 60 dias de cultura e inoculados em frascos *Erlenmeyers* (50 mL) vedados com 2 folhas de papel alumínio e filme de PVC, ou frascos de cultura (10 cm x 6 cm; 250 mL) vedados com tampas de polipropileno transparentes, contendo 30 mL de meio MSM líquido suplementado com diferentes concentrações das auxinas ácido α -naftalenoacético (ANA) (0,54; 2,7; 5,4 μM), ácido indolil-3-butírico (AIB) (0,49; 2,45; 4,9 μM) e ácido indolil-3-acético (AIA) (0,57; 2,85; 5,7 μM). Foram utilizados cinco frascos por tratamento, sendo inoculados cinco explantes por frasco.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, na ausência de luz, sob agitação em mesa agitadora orbital a 100 rpm, por 60 dias (SIMÃO et al., 2016). O acúmulo de

biomassa foi calculado pela aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS), sendo o peso seco determinado após a secagem do material em estufa (45°C) por 24 horas.

3.3. Indução de calogênese a partir de segmentos foliares

Explantos foliares (1,0 cm x 1,0 cm) foram excisados de plantas *in vitro* cerca de 60 dias após a subcultura, inoculados em meio MSM sólido suplementado com picloram (PIC) a 28,9 µM e mantidos na presença ou ausência de luz por 60 dias (GARCIA et al., 2011a). Após esse período, os calos foram transferidos para meio fresco de mesma composição.

3.4. Caracterização fitoquímica

3.4.1. Preparo dos extratos vegetais

Para as análises cromatográficas e avaliação do potencial antioxidante foram preparados extratos de diferentes materiais obtidos *in vitro* (folhas e raízes de plantas *in vitro*, calos friáveis produzidos na presença ou ausência de luz por 60 dias, e raízes adventícias obtidas em resposta a AIA, AIB e ANA, nos diferentes frascos, após 60 dias de cultura).

Os extratos foram preparados em etanol a 40% por 1 hora, em refluxo. Posteriormente foram filtrados, sendo em seguida secos em banho-maria a 90°C. Os extratos foram armazenados sob refrigeração e ressuspensos em metanol, com auxílio de ultrassom para realização das análises fitoquímicas (BIRK et al., 2005; SIMÃO et al., 2016).

3.4.2. Análise por CCD

Para as análises em CCD, amostras dos diferentes materiais foram aplicadas em placas de cromatografia de sílica-gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm}.

Para a análise de flavonoides, a fase móvel foi constituída de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26, v/v). A revelação foi realizada com NP/PEG 4000 (Natural Products/Polietilenoglicol) e visualização em câmara de UV_{365nm} (SIMÃO et al., 2016; WAGNER; BLADT, 2001).

Para a análise de saponinas, a fase móvel utilizada foi composta por clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8, v/v) (WAGNER; BLADT, 2001). As placas foram reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico, e aquecidas a 100°C por 5-10 minutos para a visualização das manchas sob luz visível (SIMÃO et al., 2016).

O R_F das amostras foi calculado conforme a seguinte equação:

$$R_F = \frac{\Delta D \text{ amostra (cm)}}{\Delta D \text{ eluente (cm)}}$$

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

3.4.3. Análise por CLAE-UV-DAD

Os extratos dos diferentes materiais analisados foram diluídos em metanol grau espectroscópico (Tedia®, Brasil) na concentração de 2 mg/mL⁻¹. Em seguida, foram solubilizados sob ultrassom por 15 min, filtrados (Millipore de 0,45 µm, Merck® Alemanha) e submetidos à análise por CLAE em cromatógrafo líquido (ultra) Agilent® 1260 Infinity, equipado com bomba LC-10AD, misturador FCV 10AL, desgaseificador DGU-14A, forno CTO-10AS, controlador SCL-10A e detector de UV com arranjo de diodos (UV-DAD) SPD-M10A. As amostras foram separadas em coluna Thermo-scientific® Hypersil Gold RP18 (250 mm x 4,6 mm com partícula de 5 Å).

Foram utilizadas duas condições de fase móvel, a primeira para determinar o perfil cromatográfico e a segunda para detecção de flavonoides. Para a determinação do perfil cromatográfico, a fase móvel foi constituída por um método em gradiente empregando como fase móvel as soluções A (água ultrapura MilliQ® acidificada com ácido acético glacial a 1%, pH 3,0) e B (acetoneitrila, Tedia®), como descrito no quadro a seguir:

Quadro 3 -Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ[®] acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a determinação do perfil cromatográfico de materiais *in vitro* de *P. suberosa*, 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

A fase móvel utilizada para a detecção de flavonoides também consistiu um método em gradiente empregando como fase móvel as soluções A e B, porém em proporções diferentes do utilizado para análise do perfil fitoquímico (QUADRO 4).

Quadro 4 -Gradiente composto pelas soluções A (água ultrapura MilliQ[®] acidificada com ácido acético glacial a 1 %, com pH 3,0) e B (acetonitrila) para a detecção de flavonoides em materiais *in vitro* de *P. suberosa*, por CLAE-UV-DAD

Gradiente (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0 – 2	95	5
2 – 40	80	20
40 – 50	95	5

A obtenção dos espectros UV ocorreu nos comprimentos de onda de 220, 250, 280, 300, 340, 380, 420 e 480_{nm} para as duas corridas. O fluxo foi de 1 mL/min e volume de injeção de 10 µL.

Essas 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.

3.5. Avaliação do potencial antioxidante

3.5.1. Ensaio DPPH

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

Os extratos de folhas e raízes obtidas de plantas *in vitro* e de calos derivados de segmentos foliares cultivados na presença ou na ausência de luz foram ressuspensos em metanol e diluídos em diferentes concentrações (50, 40, 30, 20, 10 mg/mL). As diluições (25 µL) foram adicionadas a 975 µL de solução metanólica de DPPH e incubadas no escuro por 1 hora. A solução de DPPH com metanol foi utilizada como controle negativo da reação. As leituras de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro a 515_{nm} (Shimadzu UV-B382) e a porcentagem de captura do radical DPPH foi determinada através da seguinte equação:

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

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

Os resultados foram também calculados através da concentração eficaz (CE₅₀), ou seja, a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995). Os valores do CE₅₀ foram calculados por regressão linear dos gráficos, em que o eixo das abscissas representa a concentração dos extratos (mg/mL) e o eixo das ordenadas, os valores da porcentagem de captura de DPPH, calculados pelas médias das triplicatas. O cálculo da CE₅₀ foi efetuado pela equação abaixo:

$$y = -ax + b$$

Onde: $y = 50$ e $x = \text{CE}_{50}(\text{mg/mL})$

5. DISCUSSÃO

Técnicas de cultura de tecidos vegetais representam uma alternativa para atender a demanda da produção de plantas para fins comerciais, além de constituírem importantes ferramentas para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a conservação e para a produção de substâncias bioativas *in vitro* (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Embora o gênero *Passiflora* venha sendo bastante estudado devido ao potencial agrônomo, ornamental e medicinal de suas espécies, existem alguns relatos sobre o estabelecimento *in vitro* de espécies silvestres (CARVALHO et al., 2012; DA SILVA et al., 2009; DORNELAS; VIEIRA, 1994; GARCIA et al., 2011a; LOMBARDI et al., 2007; MERHY, 2014; MONTEIRO et al., 2000; PERDOMO, 2016; PIPINO et al., 2008; SIMÃO et al., 2016; SOARES et al., 2012). Esses sistemas *in vitro* visam, de um modo geral, à produção de plantas, calos, suspensões celulares e raízes adventícias e foram desenvolvidos a partir de diferentes tipos de explantes, em resposta, principalmente, a fitorreguladores das classes das auxinas e citocininas (PACHECO et al., 2016).

Um estudo anterior com *P. suberosa* resultou no desenvolvimento de protocolos para a obtenção de plantas e calos a partir de explantes caulinares e foliares, em resposta a diferentes reguladores de crescimento (GARCIA et al., 2011a). Dessa forma, em continuidade a esse estudo, novas abordagens biotecnológicas foram desenvolvidas, neste trabalho, visando ao estabelecimento de culturas de raízes adventícias, assim como a investigação da composição fitoquímica e do potencial antioxidante dos diferentes materiais obtidos *in vitro*.

A morfogênese *in vitro* é influenciada por diversos fatores, como o meio de cultura ou o tipo de frasco e de vedação utilizados para o cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; OZAROWSKI; THIEM, 2013). Para o estabelecimento de culturas de raízes adventícias de *P. suberosa* foram avaliadas a influência de diferentes frascos de cultura, além de tipos e concentrações de auxinas. A maior biomassa de raízes adventícias foi obtida em frascos de cultura vedados com tampas de polipropileno, quando comparada com a observada em raízes cultivadas em *Erlenmeyers* vedados com dupla camada de folhas de alumínio. Além disso, os padrões morfogênicos também diferiram nos dois tipos de frasco testados, sendo as raízes obtidas em frascos de cultura, mais finas, alongadas e ramificadas, independente do regulador de crescimento utilizado.

Camolesi e colaboradores (2009) estudaram a influência do tamanho do frasco na micropropagação *in vitro* de *Musa acuminata* e verificaram que houve um maior crescimento

dos materiais quando cultivados em frascos de maior volume (500 mL). A vedação dos frascos também é um fator que deve ser considerado, uma vez que também exerce uma influência direta sobre os explantes, devendo impedir a contaminação e o ressecamento do material, além de permitir que as trocas gasosas ocorram de forma correta, evitando que ocorra um acúmulo de CO₂ e falta de oxigênio no microambiente interno do frasco de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PIERIK, 1987; SCHUELTER et al., 2015). Em *Olea europaea* L., o uso de PVC para vedação de frascos de cultura mostrou-se mais adequado para o desenvolvimento do sistema radicular da espécie, quando comparado ao uso de tampas rígidas, sem orifícios (PINHEIRO et al., 2013).

A presença de auxinas nos meios de cultura tem sido associada, principalmente, ao alongamento, à dominância apical, ao desenvolvimento do sistema vascular, ao gravitropismo e ao fototropismo, além da rizogênese e da formação de calos *in vitro*. Dessa forma, a influência de diferentes concentrações das auxinas AIA, AIB e ANA para a obtenção de culturas de raízes adventícias de *P. suberosa* foi avaliada, pela primeira vez, neste trabalho. Como essas auxinas estão envolvidas, entre outros processos, na indução e desenvolvimento das raízes laterais, têm sido amplamente empregadas no estabelecimento de protocolos de culturas de raízes adventícias *in vitro*, a partir de diferentes explantes (CORDEIRO et al., 2015; FRANÇA et al., 2018; LI et al., 2009, 2016; POP et al., 2011; SIMÃO et al., 2016; SIMÕES et al., 2009; TAKÁČ et al., 2016; VIEHMANNNOVA et al., 2016; ZOLMAN et al., 2000).

O desenvolvimento de culturas de raízes adventícias de *P. suberosa* ocorreu, de forma mais significativa, quando o cultivo foi realizado em frascos de cultura e na presença de ANA, especialmente na concentração mais elevada (5,4 µM). Esses resultados corroboram os observados para *Puya berteroniana* (VIEHMANNNOVA et al., 2016), em que houve o estabelecimento de culturas de raízes adventícias em resposta a ANA, ou AIB, sendo que as melhores taxas de rizogênese foram obtidas nas maiores concentrações testadas.

Apesar das vantagens da utilização de cultura de raízes adventícias para a produção de metabólitos secundários, ainda são poucos os trabalhos dessa natureza com espécies do gênero *Passiflora*. Em *P. pohlii*, culturas de raízes adventícias obtidas em resposta a AIA a 2,85 µM apresentaram elevada atividade antioxidante, associada à presença de saponinas (SIMÃO et al., 2016). Em *P. foetida*, as raízes obtidas em meios suplementados com ANA a 2,7 µM ou AIB a 4,9 µM apresentaram a produção de saponinas e alcaloides indólicos (CARUSO, 2017).

Os materiais *in vitro* produzidos neste trabalho, incluindo plantas, calos e culturas de raízes adventícias obtidas em frascos de cultura ou *Erlenmeyers* em resposta a diferentes auxinas, foram analisados quanto ao seu perfil fitoquímico e à sua capacidade antioxidante.

A CCD foi utilizada para a detecção preliminar de possíveis saponinas e flavonoides nos extratos de materiais obtidos *in vitro* de *P. suberosa*, por ser uma metodologia de baixo custo e fácil realização e interpretação dos resultados, além de permitir uma rápida obtenção de resultados através de uma análise simultânea de amostras diferentes (BIRK; PROVENSI; GOSMANN, 2005). Nessas análises, foi possível observar a presença de flavonoides em extratos de folhas de plantas *in vitro*, corroborando os resultados recentes de Bandara, Padumadasa e Peiris (2018), que detectaram a presença de flavonoides em extratos de folhas de plantas de *P. suberosa* mantidas em condições naturais, também utilizando a técnica de CCD. Além disso, a presença de saponinas foi detectada em todos os extratos testados. No trabalho de Simão (2015), saponinas foram encontradas em extratos de raízes *in vitro* e *in vivo* para outra espécie do gênero, *P. pohlii*.

A técnica de CLAE e suas variações mais atuais, incluindo CLUE, tem sido bastante utilizada para a detecção e quantificação de substâncias bioativas em espécies do gênero *Passiflora* (AMARAL et al., 2019; GOMES et al., 2017; GOSMANN et al., 2011; SIMIRGIOTIS et al., 2013; ZERAIK; YARIWAKE, 2010; ZUCOLOTTO et al., 2012). Neste trabalho, a análise cromatográfica dos extratos de folhas de plantas de *P. suberosa* obtidas *in vitro* indicou a presença de três substâncias. Por outro lado, calos mantidos na presença ou ausência de luz apresentaram perfis cromatográficos distintos, com padrões biossintéticos diferentes dos apresentados pelas folhas de plantas *in vitro*, seus explantes originais. Esses resultados sugerem que houve uma modulação da biossíntese de substâncias bioativas associada ao processo de indução de calogênese. Além disso, os cromatogramas dos extratos de raízes de plantas *in vitro* e de raízes adventícias obtidas em diferentes condições apresentaram um sinal de absorção em comum, com tempo de retenção semelhante, indicando se tratar da mesma substância. Esses resultados, associados aos observados anteriormente nas análises por CCD, sugerem que essa substância pertence, provavelmente, ao grupo das saponinas.

Outro aspecto estudado neste trabalho foi a avaliação do potencial antioxidante dos diferentes materiais de *P. suberosa* obtidos *in vitro*. Para isso, foi escolhido o ensaio de captura do radical DPPH, amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante de folhas (BANDARA; PADUMADASA; PEIRIS, 2016, 2018; COLOMEU et al., 2014; DA SILVA et al., 2013; FERRERES et al., 2007; FILHO et al., 2018; RAMAIYA; BUJANG;

ZAKARIA, 2014;SAPTARINI; WARDATI; JULIAWATI, 2013; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; SUNITHA; DEVAKI, 2009), frutos (ALI et al., 2010; GIL et al., 2014; HARTANTO; LISTER; FACHRIAL, 2019; LÓPEZ-VARGAS et al., 2013; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; SIMIRGIOTIS et al., 2013; ROTILI et al., 2013; WONG et al., 2014; XIONG et al., 2019;ZERAIK et al., 2011), sementes (MALACRIDA; JORGE, 2012) e materiais obtidos *in vitro* de espécies de *Passiflora* (ANTOIGNONI et al. 2007; LUGATO et al., 2014; SIMÃO et al., 2016).

O ensaio DPPH é baseado na capacidade de redução do radical livre DPPH, que possui coloração arroxeadada, levando à formação de 2-(4-hidroxifenil)-2-fenil-1picrilhidrazina, com coloração amarela, pela ação antioxidante das substâncias presentes no extrato vegetal. Assim, é possível realizar quantificação do processo de redução espectrofotometricamente (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995, SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

A capacidade antioxidante de *P. suberosa* foi recentemente investigada por Bandara, Padumadasa e Peiris (2018), também utilizando o ensaio de captura do radical DPPH, que verificaram que extratos aquosos de folhas apresentaram maior atividade antioxidante, quando comparados aos extratos metanólicos do mesmo material vegetal. Esses resultados foram associados à presença de diferentes substâncias, como as proantocianidinas. Vale ressaltar que, em um trabalho anterior, esses mesmos autores já haviam verificado uma baixa atividade antioxidante nos extratos metanólicos de folhas da espécie (BANDARA; PADUMADASA; PEIRIS, 2016). No presente trabalho, foi observado, no geral, um baixo potencial antioxidante nos materiais *in vitro* de *P. suberosa* analisados.

Apesar do ensaio de captura de DPPH ser amplamente utilizado, a determinação espectrofotométrica da capacidade do sequestro de radicais livres não permite identificar as substâncias responsáveis pela ação antioxidante (CIESLA et al., 2012). Logo, a associação entre o ensaio DPPH e a técnica de CCD tem sido utilizada como uma alternativa para a identificação das substâncias presentes em extratos vegetais com atividade antioxidante (JESIONEK; MAJER-DZIEDZIC; CHOMA, 2015; MASOKO; ELOFF, 2007).

Os trabalhos que descrevem o uso da técnica de CCD-DPPH para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais, em sua maioria, correlacionam o potencial antioxidante à presença de substâncias fenólicas, como ácidos fenólicos ou flavonoides, nos extratos, uma vez que essas substâncias atuam de forma a sequestrar radicais livres, pois possuem uma alta capacidade de doação de hidrogênio ou elétrons (CIESLA et al., 2012).

Neste trabalho, raízes *in vitro* e calos cultivados na presença de luz de *P. suberosa*, apresentaram baixa atividade antioxidante em relação aos demais extratos (folhas *in vitro* e calos cultivados na ausência de luz). A baixa capacidade antioxidante observada no ensaio de DPPH em extratos de calos obtidos na presença de luz foi corroborada pela análise qualitativa por CCD-DPPH, uma vez que não foram observadas manchas indicativas de atividade antioxidante nas regiões referentes aos flavonoides detectados anteriormente nestes extratos. Porém, nas condições específicas para saponinas, foram detectadas manchas indicativas de ação antioxidante nos extratos de folhas de plantas *in vitro* e de raízes adventícias cultivadas em frascos de cultura na presença de AIA a 0,57 μM , AIB a 4,9 μM e ANA (2,7 e 5,4 μM), ou em frascos do tipo *Erlenmeyer* em resposta a ANA 5,4 μM . Dessa forma, é possível sugerir que a atividade antioxidante observada nos extratos analisados está, provavelmente, relacionada à presença de saponinas.

A capacidade de sequestrar radicais livres apresentada pelas saponinas já foi descrita por outros autores (ASHRAF et al., 2015; CHEN et al., 2015; FRANCIS et al., 2002; SIMÃO et al., 2018; SUR et al., 2001). Além disso, as saponinas também têm outras atividades biológicas associadas, como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética e antitumoral (CHEN et al., 2015; NICKEL et al., 2016; PUENTE-GARZA et al., 2017; SIMÃO et al., 2018; VUONG et al., 2015).

O estabelecimento de culturas de raízes adventícias descrito, pela primeira vez, neste trabalho foi realizado com sucesso para *P. suberosa*, principalmente utilizando frascos de cultura e meios suplementados com ANA. As análises cromatográficas desses e de outros materiais obtidos *in vitro* (folhas, raízes e calos) se mostraram eficientes para a detecção de flavonoides e saponinas. Adicionalmente, as análises do potencial antioxidante dos diferentes materiais constataram uma relação positiva com a presença dessas substâncias nos extratos analisados, embora as amostras tenham apresentado baixa atividade antioxidante. Esses resultados são bastante promissores, uma vez que demonstram, pela primeira vez, o potencial de diferentes sistemas biotecnológicos da espécie para a produção de substâncias bioativas.

CONCLUSÕES

- O uso de ANA permitiu a proliferação de raízes adventícias a partir de segmentos radiculares de *P. suberosa*, independentemente do tipo de frasco utilizado;
- Frascos de cultura se mostraram mais adequados para a produção de raízes adventícias de *P. suberosa*, quando comparados aos frascos do tipo *Erlenmeyer*;
- Análises por CCD indicaram a presença de flavonoides apenas em extratos de folhas de plantas *in vitro*, enquanto saponinas foram detectadas em todos os materiais analisados (folhas e raízes de plantas *in vitro*, calos e culturas de raízes adventícias);
- Análises por CLAE confirmaram a presença de flavonoides em extratos de folhas de plantas *in vitro*, e revelaram a presença de uma substância comum a todos os extratos de raízes analisados, com o mesmo tempo de retenção;
- Apesar de ter sido detectada uma baixa atividade antioxidante em todos os materiais *in vitro* testados, o extrato de folhas de plantas *in vitro* apresentou o melhor resultado, o qual foi relacionado à presença de saponinas nos extratos, evidenciada pelos ensaios de CCD-DPPH.

PERSPECTIVAS

- Realizar a análise fitoquímica do meio de cultura isolado de culturas de raízes adventícias obtidas em frascos de cultura e *Erlenmeyers*;
- Comparar o perfil fitoquímico e a avaliação antioxidante dos materiais *in vitro* com materiais cultivados em condições naturais;
- Identificar a substância em comum detectada nas análises por CLAE de todos os extratos de raízes de *P. suberosa*;
- Avaliar outras atividades farmacológicas dos extratos de materiais *in vitro* de *P. suberosa*;
- Avaliar a influência da eliciação para a produção de substâncias bioativas nos diferentes materiais *in vitro* de *P. suberosa*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira, volume 2**. 5ª edição, Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf> (acesso em abril de 2018).
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALI, M. A.; DEVI, L. I.; NAYAN, V.; CHANU, K. V.; RALTE, L. Antioxidant Activity of Fruits Available in Aizawl Market of Mizoram, India. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v.1, n. 2, p. 76-81, 2010.
- ALI, M.; ABBASI, B. H.; ALI, G. S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 1099-1106, 2015.
- ALI, M.; ABBASI, B. H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400–406, 2013.
- AMARAL, R. G.; GOMES, S. V. F.; LUCIANDO, M. C. S.; PESSOA, C.; ANDRADE, L.; SEVERINO, P.; BRANDÃO, G. C.; BOMFIM, L. M.; SOARES, M. B. P. S.; BEZERRA, D. P.; DAVID, J. M.; CARVALHO, A. A. Cytotoxic potential of 14 *Passiflora* species against cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, p. 157-166, 2019.
- ANAND, S. P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 87-91, 2012.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 119-128, 1993.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v.78, p. 345-352, 2007.
- ANTONIAZZI, C. A.; DE FARIA, R. B.; DE CARVALHO, P. P.; MIKOVSKI, A. I.; DE CARVALHO, I. F.; DE MATOS, E. M.; ...; OTONI, W. C. *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Scientia horticultrae**, v. 238, p. 408-415, 2018.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Anatomia vegetal. p. 350-352, 2013.

ARGENTIERI, M. P.; LEVI, M.; GUZZO, F.; AVATO, P. Phytochemical analysis of *P assiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolinderived flavonoids with antioxidant properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 1603-1612, 2015.

ARUNG, E. T.; KASUMA, I. W.; CHRISTY E. O.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Evaluation of medicinal plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis. **The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer**, v. 63, p. 473-480, 2009.

ASADUJJAMAN, M.; MISHUK, A. U.; HOSSAIN, M. A.; KARMAKAR, U. K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 2, p. 121-126, 2014.

ASHRAF, A.; SARFRAZ, R. A.; MAHMOOD, A.; UD DIN, M. Chemical composition and in vitro antioxidant and antitumor activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 241-248, 2015.

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.

AVULA, B.; WANG, Y. H.; RUMALLA, C. S.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. Simultaneous determination of alkaloids and flavonoids from aerial parts of *Passiflora* species and dietary supplements using UPLC-UV-MS and HPTLC. **Natural product communications**, v. 7, n. 9, p. 1177-1180, 2012.

BAIS, H. P.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. **In vitro Cell Dev Biol-Plant**, v. 37(6): p. 730–741, 2001.

BALLESTEROS-VIVAS, D.; ALVAREZ-RIVERA, G.; IBÁÑEZ, E.; PARADA-ALFONSO, F.; CIFUENTES, A. Integrated strategy for the extraction and profiling of bioactive metabolites from *Passiflora mollissima* seeds combining pressurized-liquid extraction and gas/liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2019.

BANDARA, K. R. V.; PADUMADASA, C.; PEIRIS, D. C. Potent antibacterial, antioxidant and toxic activities of extracts from *Passiflora suberosa* L. leaves. **PeerJ**, v. 6, p. e4804, 2018.

BANDARA, K. R. V.; PADUMADASA, C.; PEIRIS, L. D. C. Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Passiflora suberosa* L. Leaf Extracts. In: **Proceedings of International Forestry and Environment Symposium**. 2016.

BAQUE, M. A.; MOH, S.; LEE, E.; ZHONG, J.; PAEK, K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1255–1267, 2012.

BAQUE, M. D.; HAHN, E.; PAEK, K. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morindacitrifolia* as affected by auxin and light quality. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p.71–80, 2010.

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.

BARP, E. A.; SOARES, G. L. G.; GOSMANN, G.; MACHADO, A. M.; VECCHI, C.; MOREIRA, G. R. P. Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae): induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 3, p. 853-862, 2006.

BERNACCI, L.C. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 3, p. 247-274, 2003.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. Passifloraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105868>>. 2015.

BIRK, C. D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H. TLC fingerprint of flavonoids and saponins from *Passiflora* species. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 28, n. 14, p. 2285-2291, 2005.

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.

BORELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Antiinflammatory Activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytoterapy Research**, v. 10, n.1, p.104-106, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUSILACCHI, H.; SEVERIN, C.; GATTUSO, M.; AGUIRRE, A.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S. Field Culture of Micropropagated *Passiflora caerulea* L. Histological and Chemical Studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.7, n.5, p. 257-263, 2008.

CAI, Z.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isooleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 29-34, 2012.

CAMOLESI, M. R.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J.; MARTINS, A. N. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação in vitro da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, 2009.

CAMPOS, A. C. Organogênese indireta de maracujazeiro nativo. 107f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2008.

CARUSO, R. S. Estabelecimento de culturas de raízes adventícias e avaliação fitoquímica de *Passiflora foetida* L. **Trabalho de Conclusão de Curso** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 49p, 2017.

- CARVALHO, M. A. D. F.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; HERRERA, R. C.; PORTO, J. M. P.; VARGAS, D. P.; ALVES, E. Induction and morpho-ultrastructural analysis of organogenic calli of a wild passionfruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 851-859, 2014.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; PEIXOTO VARGAS, D.; PADOVANI PORTO, J. M.; CRAVO HERRERA, R.; STEIN, V. C. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* NE Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, 2012.
- CERQUEIRA-SILVA, C.; JESUS, O.; SANTOS, E.; CORREA, R.; SOUZA, A. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 14122-14152, 2014.
- CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v.45, p. 1-92, 1997.
- CERVIL, A. C.; LINSINGEN, L. V. Sinopse taxonômica das Passifloraceae Juss. no complexo de cerrado (savana) no estado do Paraná – Brasil. **Iheringia, Série Botânicas**, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 145-157, 2008.
- CHEN C.; YOU, L. J.; ABBASI, A. M.; FU, X.; LIU, R. H. Optimization for ultrasound extraction of polysaccharides from mulberry fruits with antioxidant and hyperglycemic activity *in vitro*. **Carbohydrate polymers**, v. 130, p. 122-132, 2015.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. Brasília: **EMBRAPA**, 325p, 2014.
- CIEŚLA, Ł.; KRYSZEŃ, J.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 70, p. 126-135, 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.
- CORDEIRO, L. S.; SIMÕES-GURGEL, C.; ALBARELLO, N.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae) using the V cryo-plate technique. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 688-695, 2015.
- CRUZ, T. V.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C., BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S. Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 4, p. 875-879, 2008.
- CUI, X.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.; PAEK, K. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4708-4716, 2010.

- CUI, X.; MURTHY, H.N.; JIN, Y.; YIM, Y.; KIM, J.; PAEK, K. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10072–10079, 2011.
- DA 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.
- DA SILVA, M. L.; PINTO, D. L. P.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 99, n. 1, p. 47-54, 2009.
- DA SILVA, V. A.; ALMEIDA, T. S.; DE OLIVEIRA, J. E.; MILAGRE, H. M.; NASCIMENTO, I. R. Cromatografia em Camada Delgada. 41 p, 2014.
- DAMATTO JUNIOR, E. R.; LEONEL, S.; PEDROSO, C. J. Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 188-190, 2005.
- DE LAVOR, É. M.; LEAL, A. E. B. P.; FERNANDES, A. W. C.; DE ALMEIDA RIBEIRO, F. P. R.; DE MENEZES BARBOSA, J.; SILVA, M. G.;...; DE MENEZES, I. R. A. Ethanol extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast.(Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytomedicine**, v. 47, p. 58-68, 2018.
- DE PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.
- DEEPTHI, S.; SATHEESHKUMAR, K. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 3, p. 483-493, 2015.
- DEWICK, P. M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. **John Wiley & Sons**, 507p, 2002.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora* A Review Update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.
- DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative anxiolytic activity profile of various Preparations of *Passiflora incarnate* Linnaeus: A Comment on Medicinal Plants Standardization. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, v. 8, n. 3, p. 283–291, 2002.
- DIAS, D. M. R.; SANTA CATARINA, C.; BARROS, R. S.; FLOH, E. I. S.; OTONI, W. C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant growth regulation**, v. 62, n. 1, p. 9-19, 2010.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, p. 211-217, 1994.

DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEG, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371–374, 2005.

ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and anticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 940-949, 2011.

EMIN, B.; BALASUBRAMANIAM, A.; MANIVANNAN, R.; JOSE, J.; SENTHIL, K. N. Antibacterial activity of methanolic root extract of *Passiflora foetida* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 1, p. 38-40, 2010.

FALCÃO, E. **Cultura de tecidos e conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.

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.

FILHO, A. A. M.; KAMEZAKI, A. K.; RIBEIRO, P. E.; DE MELO, A. G. R.; FERNANDEZ, I. M.; DOS SANTOS, R. C.; CHAGAS, P. C. Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activity of Leaves *Passiflora foetida*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 241-246, 2018.

FIRMO, W. D. C. A.; DE MENEZES, V. D. J. M.; DE CASTRO PASSOS, C. E.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, 2012.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. *Passiflora*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105868>>. Acesso em: 26 Abr. 2018.

FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. “Radicle” biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends Plant Sci**, v. 4(6), p.220–226, 1999.

FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; GUZZO, F.; LEVI, M.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 2031–2036, 2008.

FRANÇA, J. M.; VENIAL, L. R.; COSTA, E. B.; SCHMILDT, E. R.; SCHMILDT, O.; BERNARDES, P. M.; ...; ALEXANDRE, R. S. Morphophysiology, Phenotypic and Molecular Diversity of Auxin-induced *Passiflora mucronata* Lam.(Passifloraceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1799-1814, 2018.

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

FRYE, A.; HAUSTEIN, C. Extraction, Identification, and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of *Passiflora*. **American Journal of Undergraduate Research**, v.6, n.3, 2007.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOLI, G.J. & OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspedosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(4), p. 627-641, 2008.

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.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (*Passifloraceae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 1, p. 47-54, 2011a.

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

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. Plant tissue culture procedure-background. Plant propagation by tissue culture. **Springer Netherlands**. p.1-28, 2008.

GIL, M.; RESTREPO, A.; MILLÁN L.; ALZATE, L.; ROJANO, B. Microencapsulation of Banana Passion Fruit (*Passiflora tripartita* var. *mollissima*): A New Alternative as a Natural Additive as Antioxidant. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 671-682, 2014.

GOMES, S. V.; PORTUGAL, L. A.; DOS ANJOS, J. P.; DE JESUS, O. N.; DE OLIVEIRA, E. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28-35, 2017.

GÓMEZ-AGUIRRE, Y.A.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; TREJO-TAPIA, G. Adventitious root cultures of *Castilleja tenuiflora* Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 188-195, 2012.

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.

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, A.C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CBAB, v.1, p. 183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de Biotecnologia, CCA/UFSC, Edição Steinmacher, 2006.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M. J.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 6, p. 2389-2393, 1992.

GUPTA, K.; GARG, S.; SINGH, J.; KUMAR, M. Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp. and its up-scaling through bioreactor. **3 Biotech**, 2013.

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

HARTANTO, S.; LISTER, I. N. E.; FACHRIAL, E. A Comparative Study of Peel and Seed Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) as Anti Collagenase. **American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)**, v. 54, n. 1, p. 42-48, 2019.

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

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 10, p. 417-426, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal de Culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, 2017.

JESIONEK, W.; MAJER-DZIEDZIC, B.; CHOMA, I. M. Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS, and TLC-DPPH. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, n. 11, p. 1147-1153, 2015.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Empresa Brasileira de Agropecuária – (EMBRAPA). Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 670 p., 2005.

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.

KHAN, SHAMSHAD A.; VERMA, P.; BANERJEE, S.; CHATERJEE, A.; TANDON, S.; KALRA, A.; RAHMAN, L. Pyrethrin accumulation in elicited hairy root cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. **Plant Growth Regulation**, v. 81, n. 3, p. 365-376, 2017.

KIDOY, L.; NYGARD, A.M.; ANDERSON, O.M.; PEDERSEN, A.T.; AKSNES, D.W.; KIREMIRE, B.T. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora suberosa*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.10, p.49-54, 1997.

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

KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 20, n.2, p. 119-126, 1997.

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.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; WANG, L.; ELLIOTT, A.; GROF, C. P.; BERDING, N.; SMITH, G. R. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant cell reports**, v. 25, n. 10, p. 1007-1015, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; DUARTE, A. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas – Revisão, 2017.

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

LI, S. W.; SHI, R. F.; LENG, Y.; ZHOU, Y. Transcriptomic analysis reveals the gene expression profile that specifically responds to IBA during adventitious rooting in mung bean seedlings. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 43, 2016.

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

LOIZZO, M. R.; LUCCI, P.; NÚÑEZ, O.; TUNDIS, R.; BALZANO, M.; FREGA, N. G.;...; PACETTI, D. Native Colombian fruits and their by-products: phenolic profile, antioxidant activity and hypoglycaemic potential. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 89, 2019.

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

LOPES, M. W.; TIYO, R.; ARANTES, V. P. Utilização De *Passiflora incarnata* No Tratamento Da Ansiedade. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 29, n. 2, 2018.

LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant

properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756–763, 2013.

LUGATO, D. Cultura de tecidos e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora alata* Curtis. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)** - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

LUGATO, D.; SIMÃO, M. J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 118, n. 2, p. 339-346, 2014.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.

MACHADO, M.W.; NETO, C.S.; SALGADO, J.; ZAFFARI, G.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; CORILO, Y.E.; EBERLIN, M.N.; BIAVATTI, M.W. Search for Alkaloids on Callus Culture of *Passiflora alata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.4, p.901-910, 2010.

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.

MASOKO, P.; ELOFF, J.N. Screening of twenty-four south african combretum and six Terminalia species (Combretaceae) for antioxidant activities. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p. 231-239, 2007.

MCCULLAGH, M.; PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H. Use of ion mobility mass spectrometry to enhance cumulative analytical specificity and separation to profile 6-C/8-C-glycosylflavone critical isomer pairs and known–unknowns in medicinal plants. **Phytochemical Analysis**, 2019.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 083-091, 2011.

MERHY, T. S. M. **Tissue culture, *in vitro* conservation and assessment of genetic stability of *Passiflora pohlii* Mast.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.

MERHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation of *Passiflora pohlii* Nodal Segments and Assessment of Genetic Stability of Regenerated Plants. **CryoLetters**, v. 35, n. 3, p. 204-215, 2014.

MERHY, T. S. M.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Avaliação da produção de vitexina em diferentes sistemas *in vitro* de *Passiflora suberosa* L. II Jornada Fluminense de Produtos Naturais – Arraial do Cabo – RJ, 2012.

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.

- MONTEFUSCO-PEREIRA, C. V.; CARVALHO, M. J.; BOLETI, A. P. A.; TEIXEIRA, L.S.; MATOS, H. R.; LIMA, E.S. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1367–1378, 2013.
- MONTEIRO, A. C. B. A.; HIGASHI, E. N.; GONÇALVES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 527-531, 2000.
- 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.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.
- MORRONE, M. S.; ASSIS, A. M.; ROCHA, R. F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A. C.; COSTA, G. M.; ZUCOLOTTI, S. M.; CASTELLANOS, L. H.; RAMOS, F. A.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F. *Passiflora manicata* (Juss.) aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.
- MÜLLER, S. D. Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá Doce. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade do Vale Itajaí, Itajaí. 2006.
- MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.399–403, 2005.
- MÜLLER, V.; CHAVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTI, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARADI, C. R. M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against *Herpes simplex* virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970-974, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N., HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Adventitious roots and secondary metabolism. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 711-716, 2008.
- NAGELLA, P.; MURTHY, H.N. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of with an olide A. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6735–6739, 2010.
- NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacogn Rev**, v. 1, n. 1, p. 69-79, 2007.

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

NETO, S. P. S.; ANDRADE, S. R. M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 409-434, 2011.

NICKEL, J.; SPANIER, L. P.; BOTELHO, F. T.; GULARTE, M. A.; XHELBIG, E. Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd grains. **Food chemistry**, v. 209, p. 139-143, 2016.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v. 43, n. 246, p. 157-164, 1996.

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

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

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 937-947, 2013.

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

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

PAIM PINTO, D. L.; DE ALMEIDA BARROS, B.; VICCINI, L. F.; DE CAMPOS, J. M. S.; DA SILVA, M. L.; OTONI, W. C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, n. 1, p. 71-79, 2010.

PAIM PINTO, D. L.; DE ALMEIDA, A. M. R.; RÊGO, M. M.; DA SILVA, M. L.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 3, p. 521-530, 2011.

PARFITT, K. Martindale: The complete drug reference. 32^a. London: Pharmaceutical Press, 2315p. 1999.

- 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. S.; PAIKRAO, H. M. Bioassay Guided Phytometabolites Extraction for Screening of Potent Antimicrobials in *Passiflora foetida* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 137-142, 2012.
- PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético. **Planaltina – Distrito Federal: Embrapa Cerrados**, p. 457-463, 2005.
- PERDOMO, I. C. Produção de fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante de extrato de calos de *Passiflora setacea* e *passiflora tenuifila* (passifloraceae) cultivados *in vitro*. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, 2016.
- 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.
- PIERIK, R. L. M. IN VITRO CULTURE OF HIGHER PLANTS AS A TOOL IN THE PROPAGATION OF HORTICULTURAL CROPS. In: **International Symposium on Propagation of Ornamental Plants 226**. p. 25-40, 1987.
- PINHEIRO, M. V.; BOLZAN MARTINS, F.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese in vitro de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, 2013.
- PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n. 1, p. 28-33, 2010.
- PIPINO, L.; BRAGLIA, L.; GIOVANNINI, A.; FASCELLA, G.; MERCURI, A. *In vitro* regeneration of *Passiflora* species with ornamental value. **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p. 45-49, 2008.
- PONZILACQUA, B.; ROTTINGHAUS, G. E.; LANDERS, B. R.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of medicinal herb and Brazilian traditional plant extracts on *in vitro* mycotoxin decontamination. **Food Control**, v. 100, p. 24-27, 2019.
- POP, T. I.; PAMFIL, D.; BELLINI, C. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. 1, p. 307-316, 2011.
- PORTER-UTLEY, K. A revision of *Passiflora* L. subgenus *Decaloba* (DC.) Rehb. supersection *Cieca* (Medik.) J. M. MacDougal & Feuillet (Passifloraceae). **PhytoKeys**, v.43, p.1–224, 2014.
- PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop protection**, v. 30, n. 11, p. 1425-1429, 2011.

- PUENTE-GARZA, C. A.; MEZA-MIRANDA, C.; OCHOA-MARTÍNEZ, D.; GARCÍA-LARA, S. Effect of in vitro drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 115, p. 400-407, 2017.
- PURICELLI, L. A.; DELL'AICA, I.; SARTOR, L. B.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *Passiflora foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 302-304, 2003.
- QURESHI, S.; RAI, M. K.; AGRAWAL, S.C. *In vitro* evaluation of inhibitory nature of extracts of 18-plant species *Chindawara* against 3-keratinophilic fungi. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 39, p. 56-60, 1997.
- 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.
- RAGAVENDRAN, C.; KAMALANATHAN, D.; REENA, G.; NATARAJAN, D. *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. 2012.
- RAMACHANDRA-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.; 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, 2014.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 7^oEd, 830p, 2010.
- RAZIA, M.; BEULAH, SIVARAMAKRISHNAN S. Phytochemical, GC-MS, FT-IR analysis and antibacterial activity of *Passiflora edulis* of Kodaikanal region of Tamilnadu. **World J Pharm Pharm Sci**, v. 3, p. 435-441, 2014.
- REGINATTO, F. H.; DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two South Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 348-51, 2006.
- REGINATTO, F. H.; KAUFFMAN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Steroidal and thiterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12.p. 32-36, 2001.
- REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E.P. Assay of Quadranguloside, the Major Saponin of Leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**.v.15, p.195–197, 2004.
- RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C.; PEDROZA, C. M. Variation of gynogenic ability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. **Plant breeding**, v. 130, n. 1, p. 86-91, 2011.

- 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.
- RIZVI, M. Z.; DAS, S.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic Embryogenesis in Monocots. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M.P. (Eds.). Somatic Embryogenesis and Gene Expression. New Delhi: **Narosa Publishing House**, p. 18-34, 2013.
- ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from *in vitro* cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 3, p. 1087-1098, 2015.
- ROCHA, D. I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DA SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 747-758, 2012.
- ROCHA, P. S. G. D.; OLIVEIRA, R. P. D.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. D. Light-emitting diodes and BAP concentrations in the *in vitro* strawberry multiplication. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.
- ROSA, Y. B. C. J.; DORNELAS, M. C. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 1, p. 91-99, 2012.
- ROSA, Y. B. C. J.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M.C. *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant** 52, 64–71, 2016.
- 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 anti glycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 719–724, 2007.
- SAHU, R.; GANGOPADHYAY, M.; DEWANJEE, S. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 5, p. 1473-1481, 2013.
- SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.

- SALGADO, J. M.; BOMBARDE, T. A. D.; MANSI, D. N.; PIEDADE, S. M. S.; MELETTI, L. M. M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glycaemic control in diabetic rat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v.30 n.3, 2010.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.**Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C. D.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagation of *Passiflora setacea* DC. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.
- SANTOSH, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, A. S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 3, n. 1, p. 112-115, 2011.
- SAPTARINI, N. M.; WARDATI, Y.; JULIAWATI, R. Antioxidant Activity of Extract and Fraction of Yellow Passion Fruit (*Passiflora flavicarpa*) Leaves.**International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 194-196, 2013.
- 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.
- SCHUELTER, A. R.; DA LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; DE SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183-190, 2015.
- SEVERIN, C.; BUENO, M., SANTÍN, F.; Giubileo, M. G. Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 73-79, 2011.
- SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of chemistry**, v. 10, p. S1409-S1421, 2017.
- SILVA, C. V.; DE OLIVEIRA, L. S.; LORIATO, V. A. P.; DA SILVA, L. C.; DE CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; ...; OTONI, W. C. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passionfruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 107, n. 3, p. 407-416, 2011.
- SILVA, G. M.; DA CRUZ, A. C.; OTONI, W. C.; PEREIRA, T. N.; ROCHA, D. I.; DA SILVA, M. L. Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 5, p. 539-545, 2015.
- SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; MELETTI, L.M.M.; PASCHOAL, J.A.R.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.

SILVA, T. C. R.; CARVALHO, C. R. Vertical heterogeneity of DNA ploidy level assessed by flow cytometry in calli of *Passiflora cincinnata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 2, p. 158-165, 2014.

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 cultura de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii*. **Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)** - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

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

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

SIMÃO, M. J.; FONSECA, E.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 2, p. 419-430, 2016.

SIMIRGIOTIS, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E. 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, n. 2, p. 1672-1692, 2013.

SIMÕES, C. Estudos biotecnológicos e avaliação do potencial farmacológico de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Tese de doutorado**- Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 100p. 2009.

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

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. *In vitro* establishment and micropropagation of *Passiflora foetida* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. SPE, p. 138-142, 2012.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Meiotic behaviour and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 129-137, 2003.

SORGATO, J. C.; ROSA, Y. B. C. J.; SOARES, J. S.; LEMES, C. S. R.; SOUSA, G. G. D. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 231-237, 2015.

SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades, Cultivo. **Piracicaba: Fealq**, v. 3, 1997.

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.

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

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.

SUDASINGHE, H. P.; PEIRIS, D. C. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. **PeerJ**, v. 6, p. e4389, 2018.

SUDHA, C. G.; SEENI, S. Establishment and analysis of fast-growing normal root culture of *Decalepis arayalpathra*, a rare endemic medicinal plant. **Current Science**, v. 81, n. 4, 2001.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEYEROWITZ, E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 4, p. 212-218, 2011.

SUNITHA, M.; DEVAKI, K. Antioxidant Activity of *Passiflora edulis* Sims Leaves. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 3, p. 310-311, 2009.

SUR, P.; CHAUDHURI, T.; VEDASIROMONI, J. R.; GOMES, A.; GANGULY, D. K. Antiinflammatory and antioxidant property of saponins of tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] root extract. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 2, p. 174-176, 2001.

TAGLIACOZZO, G. M. D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. **TOMBOLATO, AFC, COSTA, AMM (Coords) Micropropagação de plantas ornamentais. Bol. Téc. Instit. Agron. Campinas**, n. 174, p. 1-72, 1998.

TAKÁČ, T.; OBERT, B.; ROLČÍK, J.; ŠAMAJ, J. Improvement of adventitious root formation in flax using hydrogen peroxide. **New biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 728-734, 2016.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. UFRGS, 182 p. 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB. v.2. p.537-548, 1999.

TSUCHIYA, H.; 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.; MCDUGAL, J. M. *Passiflora* passionflowers of the world. **Portland Timber Press**, 430 p., 2004.

VAGULA, J. M.; VISENTAINER, J. V.; LOPES, A. P.; MAISTROVICZ, F. C.; ROTTA, E. M.; SUZUKI, R. M. Antioxidant activity of fifteen seeds from fruit processing residues by different methods. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 41, p. e35043, 2019.

VANDERPLANK, V. A Revision of *Passiflora* Section *Dysosmia*. **Curti's Botanical Magazine**, v. 30 n. 4, p. 317, 2013.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v. 78, p. 112–119, 2007.

VIANNA, M. G. **Criopreservação de ápices caulinares de *Passiflora suberosa* L. com a técnica de vitrificação em crioplaca e avaliação de crioinjúrias nas membranas celulares.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

VIEHMANNOVA, I.; CEPKOVA, P. H.; VITAMVAS, J.; STREBLOVA, P.; KISILOVA, J. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 125, n. 2, p. 293-302, 2016.

VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; DA SILVA, L. C.; DE CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 6, p. 738-745, 2014.

VON ARNOLD, S.; CLAPHAM, D. Spruce Embryogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 427, p. 31-47, 2008.

VUONG, QUAN V.; HIRUN, S.; CHUEN, T. L.; GOLDSMITH, C. D.; MURCHIE, S.; BOWYER, M. C.;...; SCARLETT, C. J. Antioxidant and anticancer capacity of saponin-enriched *Carica papaya* leaf extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 169-177, 2015.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. **Springer**. 2^a Ed, 2001.

WANG, C.; XU, F.; SHANG, J.; XIAO, H.; FAN, W.; DONG, F.; HU, J.; ZHOU, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 812-817, 2013.

WANG, J.; QIAN, J.; YAO, L.; LU, Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 5, 2015.

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

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.

WONG, Y.S.; SIA, C. M.; KHOO, H. E.; ANG, Y. K.; CHANG, S. K.; CHANG, S. K.; YIM, H. S. Influence of extraction conditions on antioxidant properties of passion fruit (*Passiflora*

edulis) peel. **Acta Scientiarum Polonorum - Technologia alimentaria**, v. 13, n. 3, p. 257-265, 2014.

WU, C.; DEWIR, Y.H.; HAHN, E.; PAEK, K. 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.

XIONG, F.; LI, X.; ZHENG, L.; HU, N.; CUI, M.; LI, H. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Passiflora edulis* Sims peel under different degradation methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 46-52, 2019.

YAN, Q.; SHI, M.; NG, J.; WU, J. Y. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Plant science**, v. 170, n. 4, p. 853-858, 2006.

YANG, T., FANG, L.; NOPO-OLAZABAL, C.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, L.; BALMACEDA, C.; MEDINA-BOLIVAR, F. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 15, p. 3942-3950, 2015.

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.

YOCKTENG, R.; D'EECKENBRUGGE, G. C.; SOUZA-CHIES, T. T. *Passiflora*. In: C. KOLE (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits*, p. 129-171, 2011.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1229-1234, 2000a.

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

YUE, W.; MING, Q. L.; LIN, B.; RAHMAN, K.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; QIN, L. P. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 215-232, 2016.

ZERAIK, M. L. Estudo analítico dos flavonoids 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.; PEREIRA, C. M. A.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.459-471, 2010.

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

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Analysis of Passion Fruits Rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidante (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 541-545, 2010.

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.

ZOLMAN, B. K.; YODER, A.; BARTEL, B. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. **Genetics**, v. 156, p. 1323-1337, 2000.

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

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