



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

Danielle Simone de Carvalho Lugato

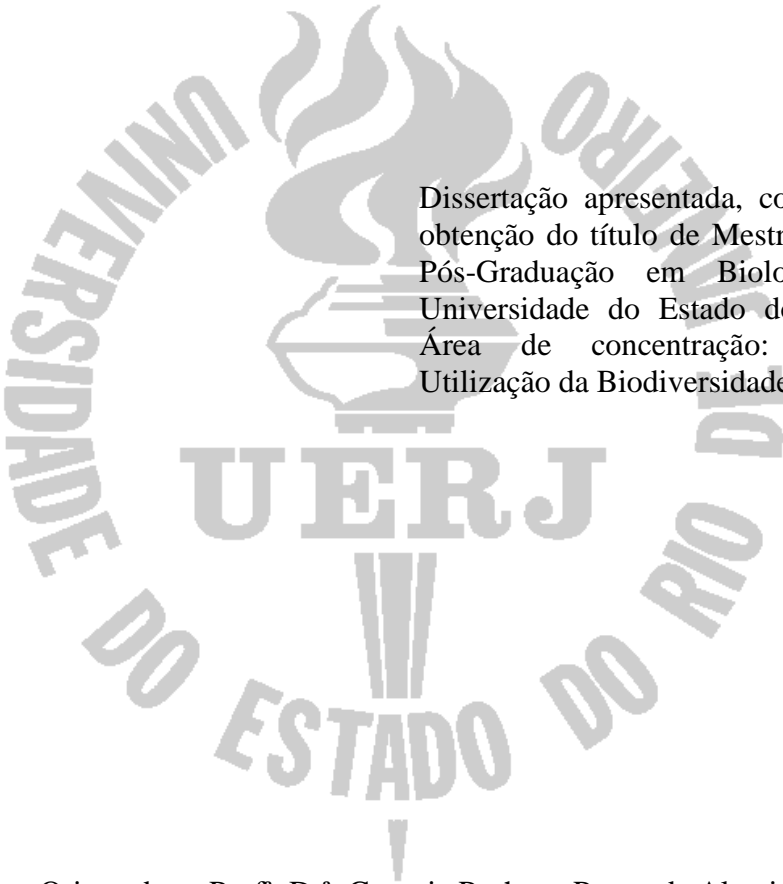
Cultura de tecidos e análise do potencial antioxidante de
Passiflora alata Curtis

Rio de Janeiro

2012

Danielle Simone de Carvalho Lugato

**Cultura de tecidos e análise do potencial antioxidante de
Passiflora alata Curtis**



Dissertação apresentada, como requisito 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. Dr^a. Georgia Pacheco Peters de Almeida

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

Rio de Janeiro

2012

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

L951 Lugato, Danielle Simone de Carvalho.
Cultura de tecidos e avaliação do potencial antioxidante de
Passiflora alata Curtis / Danielle Simone de Carvalho Lugato – 2012.
84f.

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

1. Passiflora - Dissertações. 2. Maracujá - Dissertações. 3. Fenois –
Dissertações. I. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. II. Oliveira,
Elisabeth Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

634.776.3

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

Assinatura

Data

Danielle Simone de Carvalho Lugato

Cultura de tecidos e análise do potencial antioxidante de

***Passiflora alata* Curtis**

Dissertação apresentada, como requisito 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.

Aprovado em: 15 de junho de 2012.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rachel Fátima Gagliardi Araújo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – IBRAG-UERJ

Prof^a. Dr^a. Cláudia Simões Gurgel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – IBRAG-UERJ

Prof. Dr. Celso Luiz Salgueiro Lage

Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI

Prof^a. Dr^a. Maite Vaslin de Freitas Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Maria Lúcia Carneiro Vieira

Universidade de São Paulo – USP

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo Gélío Júnior

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus pela vida, por direcionar o meu caminho e permitir que eu conheça pessoas que são uma grande benção (Provérbios 27:17).

À minha amada família, que faz a minha vida ter sentido e compartilha os momentos agradáveis e difíceis na vida. Em especial, ao meu esposo e amigo Júnior.

À minha querida orientadora Georgia. Não sei por onde começo Gê ... Queria agradecer por sempre se mostrar acessível para me fornecer orientação e apoio. Acho que aquilo que aprendi com você vai além das páginas desta dissertação e não tem como encontrar em nenhuma bibliografia. Agradeço a Deus pela dádiva de ter conhecido você, pelos seus conselhos, dedicação, compromisso e amizade.

À minha co-orientadora Beth, pelas discussões e reflexões pautadas em sua experiência que resultaram em ideias fundamentais para o resultado deste trabalho. Obrigada também pela confiança, paciência e pela visão acertada que me ensinou muito sobre o que é ser uma mestranda.

À Renatinha, por compartilhar sua experiência essencial para os resultados aqui obtidos. Fico feliz de dar continuidade ao lindo projeto iniciado por você. Continue sendo uma pessoa simples, alegre e extremamente competente. Você é um exemplo para mim!

Aos colegas de pós-graduação: Bianka, Jamine, Liane, Thiago, Leonardo e Gabriel pela troca de ideias dentro e fora das reuniões, auxílio no desenvolvimento das técnicas utilizadas e pela convivência agradável no laboratório.

Em especial, aos IC's que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho. Agradeço aos alunos Joerg, Ana, Juliana, Mariela, e entre “um meio de cultura e outro”, Marcela. Obrigada pela ajuda prestada, pelo companheirismo que impede de nos sentirmos sós em momentos de intenso trabalho, e pelo CAFÉ (Essa foi especial para a Mari!).

À toda equipe do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ, que contribuiu de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

À todos os professores da Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UERJ, que auxiliaram na construção do meu conhecimento durante a realização do curso.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UERJ pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Prof^a. Conceição Santos, do Departamento de Biologia Celular da UERJ, pela disponibilização e ajuda com o espectrofotômetro.

Ao Prof. Sebastião do HRJ pela ajuda no registro do espécime.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pela disponibilidade de utilização estufa B.O.D.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar na avaliação deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

O desejo do saber gera o ímpeto. Todo ímpeto é cego, salvo quando há conhecimento. Todo conhecimento é vão, salvo quando há trabalho. Todo trabalho é vazio, salvo quando há amor. Quando trabalhas com amor, estás unido a ti próprio, aos outros e a Deus.

Gibran

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Biotecnologia Vegetal (Departamento de Biologia Celular e Departamento de Biologia Vegetal), com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

LUGATO, Danielle Simone de Carvalho. **Cultura de tecidos e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora alata* Curtis**. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Passiflora alata Curtis, comumente conhecida como maracujá-doce, é uma das espécies do gênero *Passiflora* cultivadas comercialmente, sendo consumida *in natura* devido ao seu gosto adocicado. Ela também é utilizada em todo o mundo como ornamental e na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de diferentes estratégias para a cultura *in vitro* de *P. alata* e a análise da produção de substâncias antioxidantes nos materiais obtidos *in vitro*, em comparação com as plantas *in vivo*. Diferentes tratamentos visando à quebra da dormência das sementes foram avaliados para a germinação *in vitro* ou *in vivo*, além da incubação das sementes sob tipos distintos de luz. Para o estabelecimento das culturas primárias, apices caulinares e segmentos nodais das plântulas derivadas da germinação *in vitro* foram cultivados em meio MSM ½. A taxa de alongamento dos brotos e o número de nós por brotos das culturas primárias foram aumentados pela adição de água de coco ao meio. Plantas derivadas dessas culturas foram utilizadas como fontes de explantes nodais, internodais e foliares. O potencial morfogênico de sementes sem tegumento foi também avaliado. Calos friáveis foram induzidos a partir de segmentos nodais e foliares na presença de PIC, e aqueles obtidos a partir de folhas em meio suplementado com PIC a 28,9 µM foram selecionados para o estabelecimento de culturas de células em suspensão. Após o desenvolvimento de diferentes estratégias *in vitro* para *P. alata*, folhas de plantas *in vivo* foram utilizadas para a avaliação de parâmetros que afetam a extração de substâncias antioxidante. O potencial antioxidante foi determinado pelo ensaio DPPH e o conteúdo de fenóis totais foi determinado utilizando o método Folin-Ciocalteu. Após o desenvolvimento do protocolo de extração, a atividade antioxidante dos diferentes materiais *in vitro* foi também avaliada. A eficiência antirradicalar variou entre os sistemas de cultura estudados, sendo diretamente proporcional ao conteúdo de fenóis totais dos extratos. Esses resultados indicam que as estratégias para cultura *in vitro* de *P. alata* desenvolvidas neste trabalho representam alternativas para a multiplicação de plantas e produção de substâncias fenólicas com ação antioxidante.

Palavras-chave: *Passiflora alata*. Cultura *in vitro*. Potencial antioxidante. Fenóis totais.

ABSTRACT

Passiflora alata Curtis, commonly known as sweet passion fruit, is one of the commercially cultivated species of the genus *Passiflora*, being consumed *in natura* due to its sweet taste. It is also used worldwide as an ornamental and in folk medicine. The goal of this work was the establishment of different strategies for *in vitro* culture of *P. alata* and the analysis of the production of antioxidant substances by *in vitro* materials, in comparison with *in vivo*-grown plants. Different treatments aiming at seed dormancy breakage were evaluated for *in vitro* or *in vivo* germination, in addition to the incubation of seeds under distinct types of light. For the establishment of primary cultures, shoot tips and nodal segments excised from plantlets derived from *in vitro* germination were cultured on MSM ½. Shoot elongation rate and number of nodes per shoot of the primary cultures were improved by adding coconut water to the medium. Plants derived from these cultures were used as sources of nodal, internodal and leaf explants. The morphogenic potential of decoated seeds was also evaluated. Friable calluses were induced from nodal and leaf segments in the presence of PIC, and those obtained from leaves on medium supplemented with 28.9 µM PIC were selected for the establishment of cell suspension cultures. After the development of different *in vitro* strategies for *P. alata*, leaves of *in vivo* plants were used for the evaluation of the distinct parameters affecting the extraction of antioxidant substances. The antioxidant potential was determined by the DPPH assay and total phenolic content of the extract was determined using the Folin-Ciocalteu method. Following the development of the extraction protocol, the antioxidant activity of the different *in vitro* materials was also evaluated. The antiradicalar efficiency varied among the culture systems, being directly proportional to the total phenolic content of the extracts. These results indicate that the strategies of *in vitro* culture of *P. alata* developed in this study represent an alternative to plant multiplication and production of phenolic substances with antioxidant action.

Keywords: *Passiflora alata*. *In vitro*. Culture. Antioxidant potential. Total phenolics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | | |
|--------|------|--|----|
| Figura | 1 - | Hábito de <i>Passiflora alata</i> | 19 |
| Figura | 2 - | <i>Passiflora alata</i> L | 20 |
| Figura | 3 - | Curva padrão de DPPH..... | 30 |
| Figura | 4 - | Curva padrão do ácido gálico..... | 32 |
| Figura | 5 - | Plantas de <i>P. alata</i> obtidas a partir da germinação <i>in vivo</i> de sementes embebidas em GA ₃ e não escarificadas..... | 33 |
| Figura | 6 - | Germinação <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> sob diferentes tipos de luz, após 30 dias de cultura em meio MS ½..... | 35 |
| Figura | 7 - | Regeneração <i>in vitro</i> a partir de ápices caulinares e segmentos nodais excisados de plântulas derivadas da germinação <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> , após 60 dias de cultura em meio MSM ½..... | 36 |
| Figura | 8 - | Desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos caulinares de <i>P. alata</i> cultivados em diferentes meios por 60 dias..... | 37 |
| Figura | 9 - | Plantas de <i>P. alata</i> obtidas <i>in vitro</i> e transferidas para condições <i>ex vitro</i> | 38 |
| Figura | 10 - | Aclimatização de plantas de <i>P. alata</i> obtidas <i>in vitro</i> | 39 |
| Figura | 11 - | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos caulinares de <i>P. alata</i> , após 60 dias de cultura..... | 40 |
| Figura | 12 - | Formação de calos a partir de segmentos foliares e caulinares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> , após 60 dias de cultura..... | 42 |
| Figura | 13 - | Acúmulo de biomassa de calos friáveis de <i>P. alata</i> obtidos a partir de segmentos internodais e segmentos nodais inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura na presença de luz..... | 43 |
| Figura | 14 - | Acúmulo de biomassa de calos friáveis formados a partir de segmentos foliares de <i>P. alata</i> inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura..... | 44 |
| Figura | 15 - | Cultura de células em suspensão obtida a partir de calos friáveis derivados de folhas de <i>P. alata</i> cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 µM, mantida na ausência de luz..... | 45 |
| Figura | 16 - | Acúmulo de biomassa em suspensões celulares de <i>P. alata</i> cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 µM por 30 dias..... | 46 |
| Figura | 17 - | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de sementes de <i>P. alata</i> cultivadas em meio MSM suplementado com BAP por 30 dias..... | 48 |

| | | | |
|--------|------|--|----|
| Figura | 18 - | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de sementes de <i>P. alata</i> , após 30 dias de cultura..... | 49 |
| Figura | 19 - | Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos em diferentes proporções etanol:água..... | 50 |
| Figura | 20 - | CE ₅₀ de extratos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidas com diferentes proporções etanol:água..... | 51 |
| Figura | 21 - | Rendimento dos extratos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos em diferentes proporções etanol:água..... | 51 |
| Figura | 22 - | Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos (80%) de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos em diferentes períodos de maceração..... | 52 |
| Figura | 23 - | CE ₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos após diferentes períodos de maceração..... | 53 |
| Figura | 24 - | Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos após diferentes períodos de maceração..... | 53 |
| Figura | 25 - | Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos (80%) de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos com diferentes proporções solvente: tecido (mL/g)..... | 54 |
| Figura | 26 - | Representação gráfica da CE ₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos por diferentes proporções solvente:tecido (mL/g)..... | 55 |
| Figura | 27 - | Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos por diferentes proporções de solvente:tecido (mL/g)..... | 55 |
| Figura | 28 - | Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos após diferentes números de extrações..... | 56 |
| Figura | 29 - | CE ₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos após diferentes números de extrações..... | 56 |
| Figura | 30 - | Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas <i>in vivo</i> de <i>P. alata</i> obtidos após diferentes extrações..... | 57 |
| Figura | 31 - | Relação entre conteúdo de fenóis totais e potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de <i>P. alata</i> | 60 |
| Figura | 32 - | Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de <i>P. alata</i> | 61 |
| Quadro | 1 - | Principais constituintes químicos presentes em folhas de <i>Passiflora alata</i> | 21 |

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|--------|-----|---|----|
| Tabela | 1 - | Efeito de diferentes tratamentos para quebra de dormência na porcentagem de germinação e na altura das plantas obtidas, após 60 dias sob condições <i>in vivo</i> | 31 |
| Tabela | 2 - | Efeito do tipo de luz na germinação <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> após 30 dias de cultura em meio MS ½..... | 34 |
| Tabela | 3 - | Efeito de diferentes suplementações ao meio de cultura MSM ½ no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>P. alata</i> , após 30 dias de cultura..... | 36 |
| Tabela | 4 - | Formação de calos a partir de explantes caulinares e foliares de <i>P. alata</i> cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA ou PIC por 60 dias..... | 41 |
| Tabela | 5 - | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de sementes de <i>P. alata</i> cultivadas em meio MSM suplementado com diferentes reguladores de crescimento após 30 dias de cultura..... | 48 |
| Tabela | 6 - | Potencial antioxidante, eficiência antiradicalar e conteúdo fenólico de extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de <i>P. alata</i> obtidos de materiais <i>in vivo</i> e produzidos <i>in vitro</i> | |

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Abs = Absorvância

AIA = ácido indol 3-acético

ANA = ácido 1-naftaleno acético

ANOVA = Análise de variância

BAP = 6-benzilaminopurina

DPPH = 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

EAG = Equivalência do Ácido Gálico

GA₃ = ácido giberélico

HRJ = Herbário do Rio de Janeiro

ha = hectare

IBA = ácido indol-butírico

KIN = cinetina

MS = meio de Murashige & Skoog

MS ½ = meio de Murashige & Skoog com metade das concentrações de sais minerais e vitaminas.

MSM = meio MS modificado por Monteiro *et al.*, 2000

MSM ½ = meio MSM com metade das concentrações de sais minerais e vitaminas.

NaCO₃ = Carbonato de sódio

NaOCl = Hipoclorito de Sódio

nm = nanômetro

pH = potencial de hidrogênio

PIC = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico; picloram

rpm = Rotação por minuto

UV = Ultravioleta

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 | OBJETIVOS | 25 |
| 2 | METODOLOGIA | 26 |
| 2.1 | Material vegetal e condições de cultura | 26 |
| 2.2 | Germinação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 26 |
| 2.3 | Estabelecimento de culturas primárias | 27 |
| 2.4 | Aclimatização | 27 |
| 2.5 | Indução de calogênese | 27 |
| 2.6 | Estabelecimento de cultura de células em suspensão | 28 |
| 2.7 | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de sementes | 28 |
| 2.8 | Avaliação do potencial antioxidante | 29 |
| 2.8.2 | <u>Ensaio DPPH</u> | 29 |
| 2.8.3 | <u>Determinação do conteúdo fenólico</u> | 31 |
| 2.9 | Análise estatística | 32 |
| 3 | RESULTADOS | 33 |
| 3.1 | Germinação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 33 |
| 3.2 | Estabelecimento das culturas primárias | 35 |
| 3.3 | Aclimatização | 37 |
| 3.4 | Indução de calogênese | 38 |
| 3.5 | Cultura de células em suspensão | 45 |
| 3.6 | Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de sementes | 47 |
| 3.7 | Avaliação da potencial antioxidante | 50 |
| 3.7.1 | <u>Otimização da extração de substâncias antioxidantes</u> | 50 |
| 3.7.1.1 | Diferentes proporções etanol:água..... | 50 |
| 3.7.1.2 | Período de maceração..... | 52 |
| 3.7.1.3 | Diferentes proporções solvente:tecido..... | 54 |
| 3.7.1.4 | Número de extrações..... | 56 |
| 3.7.2 | <u>Potencial antioxidante e dosagem de fenóis totais</u> | 57 |
| 4 | DISCUSSÃO | 62 |
| 5 | CONCLUSÕES | 70 |
| | REFERÊNCIAS | 71 |

INTRODUÇÃO

Gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae e está dividido em quatro subgêneros que reúnem cerca de 520 espécies com distribuição tropical e subtropical. O subgênero *Passiflora* é o mais diverso com, aproximadamente, 236 espécies distribuídas principalmente na América do Sul, sendo muitas nativas do Brasil, cujo maior centro de distribuição geográfica situa-se no Centro-Norte (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O nome popular, maracujá, dado aos representantes do gênero, vem da designação das tribos Tupi e Guarani, sendo derivado de Mara-Cuia, que significa “comida em forma de cuia” (LEONEL; PEDROSO, 2005). Suas flores são popularmente conhecidas como flor da Paixão devido à relação de sua morfologia com os símbolos da Paixão de Cristo (SOUZA; MELETTI, 1997).

As plantas são trepadeiras, herbáceas ou lenhosas, expandindo-se, geralmente, por gavinhas axilares, com folhas inteiras ou lobadas, de forma muito variável. Suas flores são geralmente grandes e vistosas, com formas e colorações variadas. Os frutos são arredondados ou ovóides, com casca espessa e coloração variando de acordo com a espécie. As sementes são envolvidas por um arilo mucilaginoso (CERVI, 1997).

Apesar do grande número de espécies, apenas algumas alcançaram o cultivo comercial, com destaque para o maracujá-amarelo ou azedo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), o maracujá-roxo (*P. edulis*), e o maracujá-doce (*P. alata*). O agronegócio mundial de maracujá produz aproximadamente 718.000 toneladas ao ano e ocupa cerca de 50.000 hectares de área colhida, sendo cerca de 70% desse total produzido no Brasil, principalmente na região Nordeste, seguido do Equador e Colômbia (IBGE, 2009).

No Brasil destaca-se a utilização das plantas para atendimento aos mercados de frutas frescas ou de produtos processados industrialmente para a fabricação de sucos, doces e sorvetes. O valor do suco e da polpa é devido ao seu sabor e conteúdo de ácido ascórbico, açúcar, caroteno, riboflavona e minerais (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A utilização ornamental de algumas espécies é crescente, devido ao colorido exuberante e à forma exótica de suas flores, enquanto que a utilização medicinal já é bem estabelecida, com base nas propriedades calmantes de um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas de muitas espécies (SOUZA; MELETTI, 1997).

Na medicina popular, as folhas de maracujá são utilizadas desde o século XIX, para o tratamento de ansiedade, insônia e irritabilidade. Estudos farmacológicos com diversas espécies de *Passiflora* comprovaram essas e outras atividades biológicas. As propriedades ansiolíticas e sedativas de extratos hidroalcoólicos e aquosos já foram confirmadas através de testes *in vivo* (SOULIMANI *et al.*, 1997; PETRY *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.* 2008; SAMPATH *et al.*, 2011; ASLANARGUN *et al.*, 2012; SINGH, SINGH & GOEL, 2012). Além disso, já foram também relatadas no gênero atividades diurética, analgésica (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011), antioxidante (TALCOTT *et al.*, 2003; MULLER *et al.*, 2005; CAZARIN *et al.*, 2011; SATHISH; SAHU; NATARAJAN, 2011; MALACRIDA; JORGE, 2012), anti-inflamatória (BORELLI *et al.*, 1996; MONTANHER *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2007; BENICÁ *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2011; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011), vermífuga, febrífuga, antiblenorrágica, hipnótica, abortiva (SOUZA; MELETTI, 1997), anti-hiperglicêmica (SALGADO *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2011; BARBALHO *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2012), antimelanogênica (MATSUI *et al.*, 2010), anti-hipertensiva (PATEL *et al.*, 2011), hipolipidêmica (BARBALHO *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2012), antitumoral (SILVA, *et al.*, 2012), imunoestimulante (SILVEIRA *et al.*, 2011) e antifúngica (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Produtos de utilidade terapêutica derivados de espécies do gênero são conhecidos internacionalmente, estando alguns inscritos em compêndios oficiais, como nas farmacopeias Brasileira, Britânica, Indiana, Americana, Helvética, Egípcia, Francesa, Alemã e Suíça (PARAFITT, 1999; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). As principais substâncias utilizadas são alcaloides e flavonoides. Os principais alcaloides encontrados nas folhas e caules são do tipo harmânico (POETHKE; SCHWARZ; GERLACH, 1970; BENNATI, 1971; LOHDEFINK; KATING, 1974; LUTOMSKI; MALEK, 1975; OGA *et al.*, 1984; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; TSUCHIYA *et al.*, 1999), enquanto que os flavonoides, principalmente os C-glicosídeos, podem ser encontrados em várias partes das plantas, predominantemente nas folhas e frutos (ULUBELEN; OKSUZ; MABRY, 1982; OGA *et al.*, 1984; MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; REGINATTO *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2004; BIRK; PROVENSÍ; GOSMMAN, 2005; MULLER *et al.*, 2005; FERRERES *et al.*, 2007; BARBALHO *et al.*, 2011). Além disso, são também encontradas saponinas (REGINATTO *et al.*, 2001; REGINATTO *et al.*, 2004), carotenoides (TALCOTT

et al., 2003; WONDRAČEK, 2012) e várias outras substâncias de interesse, como aminoácidos, vitaminas e minerais (ZIBADI *et al.*, 2007).

Passiflora alata

Passiflora alata Curtis, também conhecida popularmente como maracujá-doce, maracujá-de-refresco, maracujá-do-grande, maracujá-alado, maracujá-guaçu ou maracujá-de-comer (JUNQUEIRA *et al.*, 2005), pertence ao subgênero *Passiflora*, série *Quadrangulares* (ULMER; MACDOUGAL, 2004). É uma espécie heliófita e seletiva higrófito, que ocorre principalmente em florestas tropicais costeiras, sendo nativa da América do Sul e encontrada no Brasil, Argentina, Peru e Paraguai (BERNARCCI; MELETTI; SOARES-SCOTT, 2003).

As plantas são trepadeiras, glabras, com caules quadrangulares de arestas aladas, gavinhas axilares robustas, estípulas lanceoladas e folhas ovadas inteiras (7 a 15 cm de comprimento e 5 a 10 cm de largura) (Figura 1). As flores são grandes (10 a 12 cm de diâmetro), hermafroditas, homoclamídeas e pentâmeras, com sépalas e pétalas carmim na face adaxial, e corona com filamentos bandeados de branco e de roxo (Figura 2 A). Os estames, em número de cinco, são unidos pela base, inseridos no topo do androginóforo, junto à inserção do ovário. Os três estiletos iniciam-se no centro superior do ovário, que é súpero (CERVI, 1997).

A floração ocorre entre agosto e março, tendo como principal polinizador as abelhas do gênero *Xylocopa*, comumente conhecidas como mamangavas. A frutificação ocorre entre dezembro e maio. Os frutos são ovais ou periformes, de coloração amarela a laranja quando maduros (Figura 2 B), com grande variação no formato e tamanho. As sementes são cordadas e faveoladas, em geral com 7 a 8 cm de comprimento (Figura 2 C). O arilo é sulcoso, de coloração bege e sabor doce, com baixa acidez (CERVI, 1997).

O maracujá-doce, uma das espécies mais comercializadas de maracujá, apresenta frutos com polpa de sabor doce acidulado, próprios para consumo *in natura* (JUNQUEIRA *et al.*, 2005), que apresentam melhor rendimento na produção de sucos, quando comparado ao maracujá-amarelo. Além disso, possui grande aceitação no mercado europeu devido à baixa acidez e outras características agrônômicas (VASCONCELLOS *et al.*, 1993). No entanto, é pouco conhecido e consumido no Brasil, apesar de sua origem local. Sua área cultivada no país é cerca de 1400 ha, um volume bem pequeno (3%) em relação à área total ocupada pela cultura de maracujá. (MACIEL *et al.*, 2009).

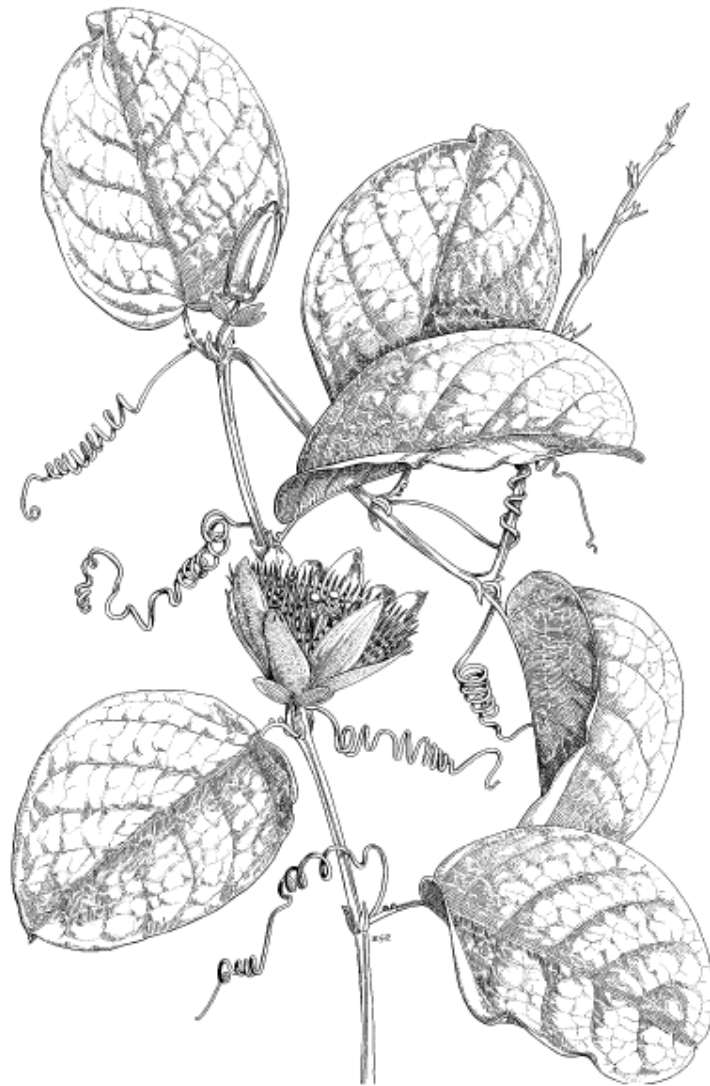


Figura 1 - Hábito de *Passiflora alata*. Fonte: Cervi, 1997.

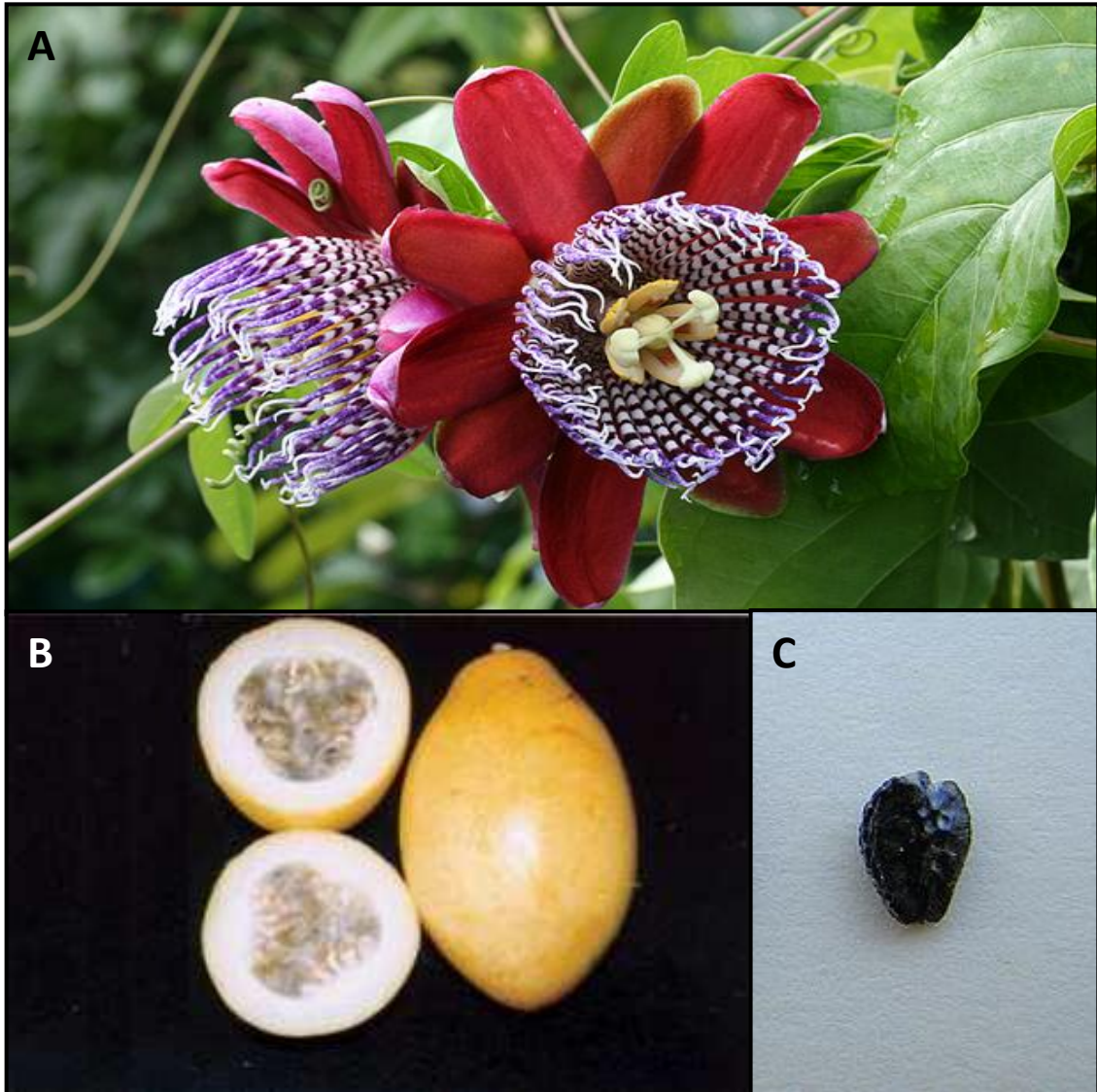


Figura 2 - *Passiflora alata* L. A - Flor; B - Fruto; C - semente.

Foto: www.lyricsdog.eu, www.todafruta.com.br, www.flickr.com.

Passiflora alata possui ainda potencial ornamental devido à beleza de suas flores e valor medicinal, sendo uma droga oficial da farmacopeia brasileira, com indicações contra nervosismo, histerismo, neurastenia, perturbações da menopausa e insônia (FARMACOPEIA, 1977).

Extratos preparados a partir de diferentes partes da planta já demonstraram atividades ansiolítica, sedativa (OGA *et al.*, 1984; PETRY *et al.*, 2001; DE PARIS *et al.*, 2002; DOYAMA *et al.*, 2005; REGINATO *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008; PROVENSINI *et*

al., 2008; SLOMP *et al.*, 2010), diurética, analgésica (OGA *et al.*, 1984), antioxidante (RUDNICKI *et al.*, 2007a; VARGAS *et al.*, 2007; ZERAIK *et al.*, 2010, 2011), anti-inflamatória (LORENCINI *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2011) e antihiperlipidêmica (VILELLA *et al.*, 2011). Além disso, é também utilizada na indústria de cosméticos, sendo objeto de uma patente registrada (GESZTESI; DA LUZ, 2007).

Paralelamente às investigações sobre as atividades biológicas, diversos estudos fitoquímicos realizados nas últimas décadas resultaram na identificação da composição química de alcaloides (LUTOMSKI; MALEK, 1975), saponinas (REGINATTO *et al.*, 2001; DOYAMAA *et al.*, 2005; BIRK; PROVENSÍ; GOSMMAN, 2005) e polifenóis, entre os quais destacam-se os flavonoides C-glicosídeos, como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (ULUBELEN *et al.* 1982; OGA *et al.*, 1984; MORAES *et al.*, 1997; PETRY *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2004; MULLER *et al.*, 2005; BOEIRA *et al.*, 2010; ZUCOLOTTI *et al.*, 2012) (Quadro 1).

QUADRO 1- Principais constituintes químicos presentes em folhas de *Passiflora alata*.

| Constituinte | Tipo de extrato | Referência |
|----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 2-xilosil-vitexina | Metanólico | ULUBELEN <i>et al.</i> (1982) |
| Flavonoides C-glicosídeos | Hidroalcoólico | OGA <i>et al.</i> (1984) |
| Flavonoides C-glicosídeos | Hidroalcoólico | MORAES <i>et al.</i> (1997) |
| Flavonoides C-glicosídeos | Hidroalcoólico | PETRY <i>et al.</i> (2001) |
| Saponina (Quadranguloside) | Hidroalcoólico | REGINATO <i>et al.</i> (2001) |
| Flavonoides e Saponinas | Etanólico | BIRK <i>et al.</i> (2005) |
| Flavonoides C-glicosídeos | Aquoso | PEREIRA <i>et al.</i> (2004) |
| Flavonoides e Saponinas | Metanólico | DOYAMA <i>et al.</i> (2005) |
| Flavonoides totais | Aquoso | BARBOSA <i>et al.</i> (2008) |
| Flavonoides totais | Hidroalcoólico | CHABARIBERI <i>et al.</i> (2009) |
| Flavonoides e Saponinas | Etanólico | BOEIRA <i>et al.</i> (2010) |
| Flavonoides C-glicosídeos | Aquoso | ZUCOLOTTI <i>et al.</i> (2012) |

Produção de substâncias bioativas *in vitro*

A obtenção de uma substância bioativa pode ocorrer diretamente a partir das plantas ou pela produção de análogos sintéticos. Entretanto, a produção de análogos sintéticos pode ser limitada devido a estrutura complexa de algumas substâncias, tornando o processo dependente da extração direta das fontes naturais (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002). Porém, a qualidade e a quantidade de produtos naturais pode ser influenciada por variações sazonais, ontogenia, condições tróficas e estresse (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Dessa forma, a propagação vegetativa de plantas-matrizes com características desejáveis constitui uma opção para produzir substâncias de interesse. Neste contexto, a utilização de técnicas biotecnológicas oferece a possibilidade de obtenção de material botânico de alta qualidade, de forma contínua e uniforme, garantindo a utilização racional da biodiversidade e evitando danos ecológicos (FRANÇA, 2010). Os métodos biotecnológicos, particularmente através de técnicas de cultura *in vitro*, têm sido amplamente estudados e incluem o cultivo de células, tecidos ou órgãos em meio nutritivo, sob condições assépticas, em ambiente controlado.

A produção de plantas *in vitro* baseia-se na totipotência das células vegetais, que podem formar todos os tipos celulares de um novo indivíduo, idêntico à planta matriz, quando cultivadas em condições apropriadas. Este processo pode ocorrer por diferentes vias morfogênicas, incluindo a proliferação a partir de meristemas pré-existentes, a organogênese e a embriogênese somática (GEORGE, 2008).

A proliferação de tecidos meristemáticos pré-existentes pode ocorrer a partir de células encontradas nos ápices caulinares, radiculares ou segmentos nodais, que contêm meristemas apicais ou gemas axilares. Esse sistema é adequado para conservação de germoplasma e produção de plantas livres de vírus, pois, geralmente, as células meristemáticas estão livres de patógenos devido ao isolamento do tecido vascular. Além disso, esse sistema reduz os riscos de variação somaclonal, já que reproduz o processo natural, ocorrendo sem as etapas de desdiferenciação e rediferenciação (HITMI *et al.*, 2000; KATOH *et al.*, 2004).

A organogênese consiste na formação de gemas ou raízes adventícias a partir de tecidos diferenciados, compreendendo as fases de desdiferenciação, na qual células diferenciadas retornam a um estágio similar ao meristemático, adquirindo novas competências, e rediferenciação na qual ocorre a formação de novos órgãos (AHLOOWALIA *et al.*, 2002).

A embriogênese somática é um processo de regeneração que consiste na formação de embriões a partir de células somáticas. Os embriões somáticos são estruturas bipolares, com padrão de desenvolvimento semelhante ao dos embriões zigóticos. Tanto a organogênese

quanto a embriogênese somática podem ocorrer de forma direta, com formação das estruturas diretamente a partir do tecido de origem, ou de forma indireta, quando surgem a partir de calos, que consistem em agregados celulares que se originam da proliferação desordenada a partir de tecidos ou órgãos.

Além da produção de plantas, os sistemas *in vitro* incluem as culturas desorganizadas, como as culturas de calos e de células em suspensão. A indução de calos *in vitro* ocorre a partir de estímulos, principalmente a presença de fitorreguladores, que modificam o estado quiescente do tecido especializado para um estado de intensa proliferação celular que dá origem a uma massa de células indiferenciadas ou pouco diferenciadas. Os calos podem diferir em aparência, cor, compactação, potencial morfogênico e produção de metabólitos. Além disso, calos friáveis não morfogênicos constituem fontes de materiais para o estabelecimento de culturas de células em suspensão (GEORGE, 2008).

As culturas em suspensão são constituídas por células isoladas ou pequenos aglomerados de células dispersos em um meio líquido, sob agitação. Essas culturas são de grande interesse para a produção de metabólitos devido à possibilidade de produção em larga escala num curto período de tempo (GUERRA; NODARI, 2006; GEORGE, 2008).

Diversos sistemas de cultura *in vitro* já foram descritos para espécies do gênero *Passiflora*. O primeiro trabalho foi publicado no final dos anos 60 por Nakayama (1966), que estabeleceu o cultivo de *P. caerulea* para avaliação da ação de citocininas e auxinas na indução de gemas e raízes, respectivamente. Desde então, diversos protocolos foram estabelecidos para outras espécies, incluindo a produção de plantas por desenvolvimento meristemático (DREW, 1991; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; RIBAS *et al.*, 2002; ISUTSA, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2007), organogênese direta (DORNELAS; VIEIRA, 1994; KAWATA *et al.*, 1995; FARIA; SEGURA, 1997 a, b; OTAHOLA, 2000; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; LOMBARDI *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2011; ROSA; DORNELAS, 2012), organogênese indireta (MOURAD-AGHA; DEXHEIMER, 1979; KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW *et al.*, 1991; MONTEIRO *et al.*, 2000; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; GARCIA *et al.*, 2011), embriogênese somática (ANTHONY *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2009), cultura de calos (ANTOIGNONI *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011) e cultura de células em suspensão (GUZZO *et al.*, 2004).

O sistema de propagação mais estudado para o gênero é a organogênese, obtida preferencialmente em resposta à citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), em diferentes concentrações (DREW, 1991; DORNELAS; VIEIRA, 1994; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; VIEIRA; DORNELAS, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2000; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; FERNANDO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2010). Para otimização do alongamento *in vitro* em *P. edulis* foram utilizados água de coco e GA₃ (DORNELAS; VIEIRA, 1994; TREVISAN; MENDES, 2005; RIBAS *et al.*, 2002). Além disso, com objetivo de obter plantas livres de clorose, Monteiro *et al.* (2000) sugeriram modificações no meio de cultura basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com redução e eliminação de alguns minerais, resultando na formulação conhecida como MSM, a qual vem sendo bastante utilizada para a cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora*.

Os primeiros estudos sobre a cultura *in vitro* de *P. alata* foram realizados por Desai & Mehta (1985), que avaliaram o efeito da alteração dos níveis de poliaminas durante a morfogênese *in vitro*. Os trabalhos seguintes incluíram a regeneração a partir de explantes de segmentos nodais cultivados em meio MS suplementado com uma combinação de cinetina (KIN) e ácido indol 3-acético (AIA) (DREW, 1991) ou em meio WPM suplementado com ácido indol-butírico (IBA) (RODRIGUEZ *et al.*, 2007), além da obtenção de plantas transgênicas visando resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (PINTO, 2010) e a produção de alcaloides durante o processo de calogênese em *P. alata*, na presença de precursores foi analisada por Machado *et al.* (2010).

Estudos sobre a produção de substâncias bioativas em sistemas de cultura *in vitro* de *Passiflora* foram relatados por Antognoni *et al.* (2007), que analisaram a produção de flavonoides em calos não morfogênicos derivados de explantes foliares de *P. quadrangulares* cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D, e elicitados por U.V. Em *P. garckeii*, a elicitação de culturas de células em suspensão com extrato de levedura resultou em um aumento de compostos aromáticos (FRACCAROLI *et al.*, 2008).

Tendo em vista os resultados já alcançados com espécies do gênero e o potencial farmacológico de *P. alata*, diferentes sistemas de cultura *in vitro* foram desenvolvidos neste trabalho, sendo também avaliado o potencial antioxidante de extratos de materiais obtidos *in vitro*, em comparação com os derivados de plantas mantidas *in vivo*.

1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estabelecimento de metodologias de cultura de tecidos para *P. alata* e a avaliação do potencial antioxidante de extratos de plantas mantidas *in vivo* e do material obtido *in vitro*. Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar a germinação de sementes em condições *in vivo* e *in vitro*;
- Estabelecer culturas primárias a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro*;
- Desenvolver sistemas de cultura *in vitro* a partir de sementes, segmentos nodais, internodais e foliares excisados de plantas *in vitro*;
- Determinar o potencial antioxidante e o conteúdo fenólico dos diferentes materiais.

2 METODOLOGIA

2.1 Material vegetal e condições de cultura

Sementes de *P. alata* foram retiradas de frutos maduros, obtidos comercialmente. O arilo foi removido manualmente, em água corrente, e as sementes colocadas para secar à sombra, sobre papel toalha, por 24 horas. Em exemplar representativo de *P. alata* encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro H. RJ: 11.774.

Foram utilizados os meios basais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MSM (MONTEIRO *et al.*, 2000), contendo vitaminas do meio MS e sacarose a 3%, utilizando-se ágar a 0,7% como agente solidificante. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados em diferentes concentrações, antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121 °C e 1,0 atm).

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

2.2 Germinação *in vivo* e *in vitro*

Sementes de *P. alata*, sem o arilo, foram lavadas com detergente sob água corrente, descontaminadas em solução de hipoclorito de sódio a 1,0% por 40 minutos, sob agitação, e lavadas com água destilada estéril três vezes. Para quebra de dormência, as sementes foram distribuídas entre duas camadas de três folhas de papel de filtro Whatman® n°1 umedecidas com solução de GA₃ a 2,5%, na proporção de 2,5 vezes o peso do substrato, e incubadas sob fotoperíodo de 16h por sete dias (FERREIRA *et al.*, 2005). Após esse período, as sementes foram escarificadas mecanicamente com o auxílio de bisturi.

Para a germinação *in vivo*, as sementes foram transferidas para substrato Top Garden Floreira® e mantidas em casa de vegetação. Para avaliar a influência dos tratamentos de embebição e escarificação na germinação *in vivo*, os controles foram diretamente transferidos para o substrato após descontaminação e comparados com os tratamentos, após 60 dias.

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas em meio MS semi-sólido, com metade da concentração de sais e vitaminas (MS ½), e transferidas para estufa B.O.D., onde foram mantidas sob regime de temperaturas alternadas (30 °C por 8h e 20 °C por 16h), com fotoperíodo de 8h (OSIPI; NAKAGAWA, 2005). As culturas foram mantidas sob luz

fluorescente branca ou lâmpadas fluorescentes monocromáticas azul (424-491 nm) ou vermelha (447-700 nm). A porcentagem de germinação, assim como a altura das plântulas, o número de nós e o número de folhas foram avaliados após 30 dias de incubação.

2.3 Estabelecimento de culturas primárias

Ápices caulinares e segmentos nodais foram excisados de plântulas axênicas derivadas da germinação *in vitro* e inoculados em meio MSM ½, visando ao estabelecimento de culturas primárias. Para o alongamento dos brotos, segmentos caulinares (2,0 cm) contendo dois nós foram excisados das culturas primárias e inoculados em meio MSM ½ suplementado com água de coco (5% ou 10%) e/ou caseína hidrolisada a 500 mg/L (Sigma-Aldrich). A altura dos brotos, o número de nós e de folhas e a porcentagem de formação de raízes foram avaliados após 60 dias de cultura.

2.4 Aclimatização

Plantas completas obtidas após 90 dias de cultivo *in vitro* foram retiradas dos frascos e submetidas à lavagem do sistema radicular para retirada do meio de cultura. Antes da transferência para condições *ex vitro*, foram realizadas medições das alturas das plantas, além do número de nós e de folhas. Em seguida, quinze plantas foram transferidas para bandejas de isopor contendo o substrato Top Garden Floreira® e mantidas em câmara de vidro coberta (80 cm x 40 cm x 40 cm) a 25 °C ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa controlada entre 90 e 95%. Visando à redução da umidade relativa dentro das câmaras, a tampa foi gradualmente aberta após a segunda semana e completamente removida 30 dias após o transplante. A aclimatização foi avaliada pelos parâmetros taxa de sobrevivência, altura (cm), número de nós e o número de folhas, durante um período de 30 dias após a transferência.

2.5 Indução de calogênese

Segmentos nodais (0,5 cm), internodais (1,0 cm) e foliares (2,0 cm) excisados de culturas primárias com 60 dias de cultura foram inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) (5,4; 10,7; 15,9; 21,2 e 26,8

μM) ou picloram (PIC) (4,1; 8,2; 12,3; 16,4; 20,7; 28,9 e 41,4 μM) e mantidos na presença de luz por 60 dias. Foram realizadas subculturas do material para meio fresco com a mesma composição do meio inicial, a cada 30 dias. O acúmulo de biomassa foi avaliado por meio da aferição dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS). O peso seco foi aferido após secagem em estufa a 45 °C por 24 horas.

2.6 Estabelecimento de culturas de células em suspensão

Para o estabelecimento de culturas de células em suspensão, foram utilizados calos friáveis formados a partir de segmentos foliares cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM , obtidos na presença ou ausência de luz, 60 dias após a inoculação. Para iniciar as culturas em suspensão, 3,0 g de calos foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL tampados com papel alumínio, contendo 30 mL de meio líquido com a mesma composição salina e hormonal utilizada para sua produção. As culturas foram incubadas sob agitação, em mesa giratória orbital (Innova 2300) a 100 rpm e mantidas a 28 °C \pm 2 °C na presença ou ausência de luz. Para determinação da cinética de crescimento, as culturas foram filtradas a vácuo em papel de filtro (Whatman® nº1). O acúmulo de biomassa foi estimado pela quantificação do PF e PS. A massa seca foi determinada após a secagem das células a 60 °C até peso constante. As amostras foram filtradas à vácuo em intervalos de 2-3 dias durante um período de 30 dias e cada ponto da curva de crescimento representa a média de três determinações independentes. Após o estabelecimento da curva de crescimento, as subculturas foram realizadas sempre na fase exponencial.

2.7 Morfogênese *in vitro* a partir de sementes

Após a descontaminação, sementes com o tegumento parcialmente retirado foram inoculadas em meio MSM suplementados com diferentes concentrações de BAP (4,4, 8,8 e 17,6 μM), ANA (5,4, 10,7 e 21,2 μM), PIC (4,1, 8,3 e 16,4 μM), e 2,4 diclorofenoxyacético (2,4-D) (4,5, 9,0 e 18,1 μM), além de uma combinação de BAP a 4,4 μM e 2,4-D a 18,1 μM (SILVA *et al.*, 2009) e mantidas na presença ou ausência de luz por 30 dias.

2.8 Avaliação do potencial antioxidante

2.8.1 Preparo de extratos vegetais

As amostras de folhas de plantas mantidas em casa de vegetação foram trituradas em moinho após secagem em estufa a 45 °C por 48 horas. A maceração nas soluções em diferentes concentrações de etanol foi realizada sob agitação em mesa giratória orbital (Innova 2300) a 110 rpm 28 °C ± 2 °C, na ausência de luz. Visando à determinação das condições mais adequadas para a extração de substâncias antioxidantes, foram avaliados os seguintes parâmetros envolvidos na preparação dos extratos: i) proporções etanol:água como solvente de extração (100, 80, 60, 40 e 20%), ii) período de maceração (2, 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min), iii) proporção solvente:tecido (10, 20, 30 e 40 mL de solvente por grama de tecido) e iv) diferentes números de extrações (1, 2, 3 e 4 extrações).

Os extratos foram filtrados e secos em evaporador rotatório (Marconi – M120). Todos os extratos foram caracterizados quanto ao rendimento (peso do extrato seco / massa seca x 100%) e potencial antioxidante pelo método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich).

Após a otimização da extração, foi realizada a comparação do potencial antioxidante de extratos de folhas de campo com os de diferentes materiais obtido *in vitro*.

2.8.2 Ensaio DPPH

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado através da capacidade de captura do radical DPPH (Sigma - Aldrich®), utilizando-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995) e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998). Primeiramente, foi construída uma curva de calibração preparada com solução metanólica de DPPH nas concentrações entre 10 e 60 µM, em triplicata, utilizando metanol como branco. A equação da reta na curva de calibração do DPPH foi $y = 0,0103x - 0,0033$ ($R^2 = 0,9994$), onde x = concentração de DPPH (µM) e y = absorvância (Figura 3). Em seguida, os extratos foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em, no mínimo, três concentrações. As diluições (25 µL) foram adicionadas a 975 µL de solução metanólica de DPPH a 60 µM e incubadas no escuro por 2 h. A solução metanólica de DPPH a 60 µM (975 µL) adicionada a metanol (25 µL) foi utilizada como controle negativo. As leituras de absorvância foram efetuadas em

espectrofotômetro (duplo-feixe - B382), a 515 nm, sendo a porcentagem de captura do radical determinada conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ DPPH sequestrado} = \frac{(A_c - A_a)}{A_c} \times 100$$

Onde: **Ac** = Absorvância do controle negativo
Aa = Absorvância da amostra

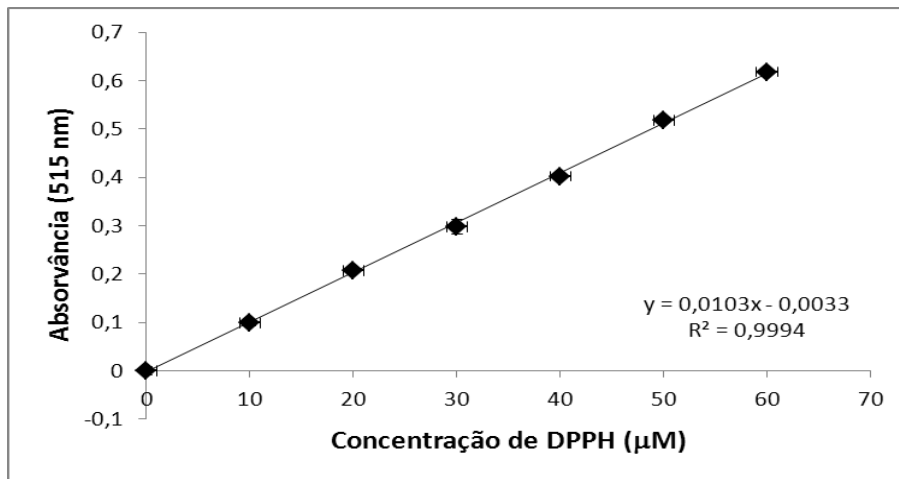


Figura 3 - Curva padrão de DPPH.

Os resultados foram também expressos por meio do cálculo da concentração eficaz (CE_{50}), 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 CE_{50} foram calculados por regressão linear dos gráficos, em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos ($g L^{-1}$) e o eixo das ordenadas, os valores de absorvância calculados pelas médias das triplicatas. O cálculo da CE_{50} foi efetuado pela equação abaixo:

$$y = -ax + b$$

Onde: **y** = Absorvância do controle / 2

$$x = CE_{50} (g L^{-1})$$

Para determinação da cinética de reação, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro em diferentes intervalos (5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 1080 e 1120 min), até as leituras de absorvância atingirem um valor estável. O tempo necessário para atingir a fase estacionária da reação na CE_{50} (T_{CE50}) foi utilizado para análise da eficiência antirradicalar (EA), que avalia o poder antioxidante envolvendo a análise dos parâmetros CE_{50} e T_{CE50} pela fórmula abaixo:

$$EA = 1/ CE_{50} \times T_{CE50}$$

Onde: **EA = Eficiência antirradicalar**

CE_{50} = Concentração mínima necessária para reduzir em 50% a atividade do radical DPPH.

T_{CE50} = Tempo necessário para a reação atingir um valor de absorvância estável na concentração correspondente ao CE_{50} .

A capacidade de seqüestro do radical DPPH, tendo como base a eficiência antirradicalar (EA), foi classificada em baixa ($EA < 1$), média ($EA > 1$ e ≤ 5), alta ($EA > 5$ e ≤ 10) ou super alta ($EA > 10$), segundo Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

2.8.3 Determinação do conteúdo fenólico

O conteúdo fenólico total dos extratos hidroalcoólicos foi avaliado utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu (HOLLAND *et al.*, 2011). Amostras dos extratos (90 μ L), em três diferentes concentrações, foram misturadas a uma solução do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma - Aldrich®) a 10% em água destilada. Após 5 minutos, foi adicionado $NaCO_3$ (2%) e a reação foi incubada a 25 °C, no escuro, por 2 h, sendo a leitura das absorvâncias efetuada em espectrofotômetro (duplo-feixe - B382) a 765 nm.

Os resultados foram comparados à curva de calibração obtida com ácido gálico, elaborada nas concentrações entre 20 e 160 mg/L (Figura 4). O conteúdo fenólico total dos

extratos foi expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG), em mg/g de extrato seco. A curva padrão de ácido gálico foi representada pela equação: $y = 0,0101x + 0,0216$, onde x = concentração de polifenóis correspondente a ácido gálico e y = absorvância.

Os resultados obtidos nas três concentrações foram comparados com o potencial antioxidante expresso em DPPH reduzido (%) em gráficos de regressão linear, visando à correlação entre conteúdo fenólico e atividade antioxidante (RUDNICKI *et al.*, 2007a).

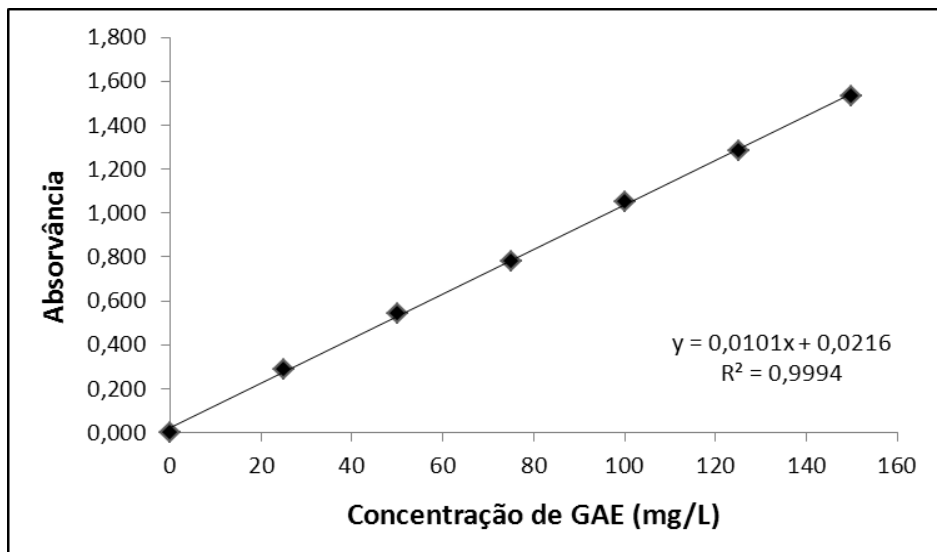


Figura 4 - Curva padrão do ácido gálico.

2.9 Análise estatística

Os experimentos de cultura de tecidos foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de dez explantes. A determinação do potencial antioxidante e do conteúdo fenólico foram realizados duas vezes, em triplicatas. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA), do teste de comparação Tukey-Kramer. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para testar a correlação entre potencial antioxidante e conteúdo de fenóis totais, com o auxílio do programa Graphpad InStat, sendo considerada significativa as diferenças com valores de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Germinação *in vivo* e *in vitro*

A maior porcentagem de germinação *in vivo* (60%) foi obtida em sementes embebidas em GA₃ por sete dias e não submetidas à escarificação mecânica, quando comparadas com os outros tratamentos (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 1 – Efeito de diferentes tratamentos para quebra de dormência na porcentagem de germinação e na altura das plantas obtidas, após 60 dias sob condições *in vivo*

| Tratamento | Germinação (%) | Altura (cm) |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------|
| Sem escarificação | 40 | 3,87 ± 0,20 ^a |
| Com escarificação | 5 | 4,00 ± 0,00 ^a |
| Sem escarificação + GA ₃ | 60 | 3,87 ± 0,27 ^a |
| Com escarificação + GA ₃ | 0 | - |

Os resultados expressam média ± erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

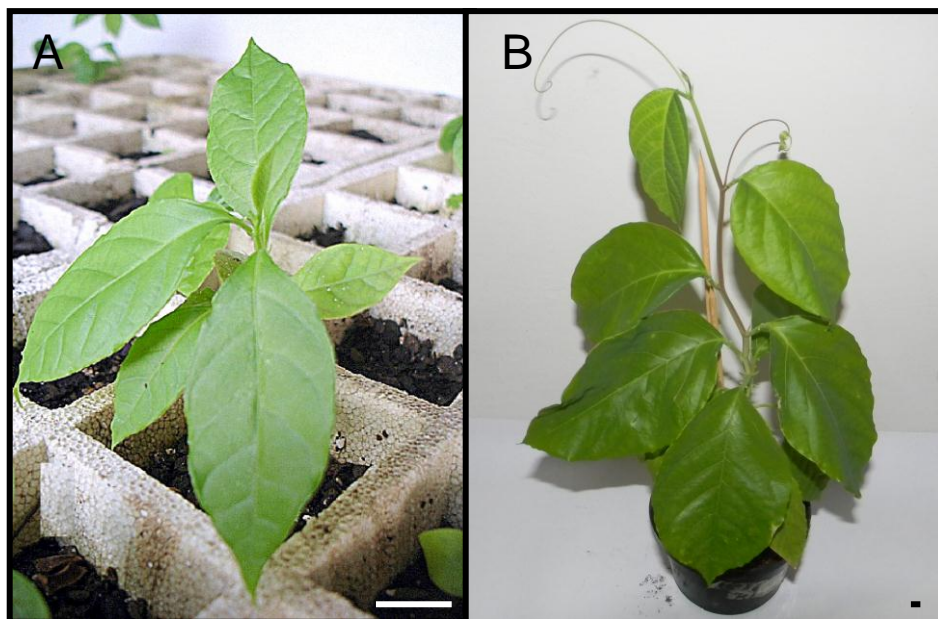


Figura 5 - Plantas de *P. alata* obtidas a partir da germinação *in vivo* de sementes embebidas em GA₃ e não escarificadas, após 60 (A) e 120 (B) dias da sementeira. Barra = 1cm.

Sementes inoculadas em meio MS ½ e mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, a 25 °C, apresentaram baixa porcentagem de germinação (20%) após 60 dias de cultura (dados não mostrados). Dessa forma, visando à otimização da germinação *in vitro*, as sementes foram escarificadas mecanicamente, tratadas com GA₃ e incubadas sob diferentes tipos de luz e regime de temperaturas alternadas por 30 dias.

A incubação sob os diferentes tipos de luz resultou em porcentagens de germinação similares, entre 55 e 60% (Tabela 2). Entretanto, as plântulas tiveram taxas de crescimento distintas, apresentando diferentes alturas após 30 dias de cultura (Tabela 2). Plântulas obtidas sob luz vermelha apresentaram alturas maiores que as desenvolvidas nas outras condições estudadas (Tabela 2, Figura 6). No entanto, essa característica foi relacionada apenas ao alongamento do hipocótilo. Por outro lado, plântulas incubadas sob luz branca apresentaram maior número de nós e de folhas (Tabela 2), sendo esta condição considerada a melhor forma de incubação para estabelecimento de culturas primárias.

A formação de plântulas anormais, com pouco desenvolvimento do hipocótilo, ausência de raízes ou de cotilédones, ocorreu em frequências de 5, 15 e 25% sob as luzes branca, azul e vermelha, respectivamente.

Tabela 2 - Efeito do tipo de luz na germinação *in vitro* de *P. alata* após 30 dias de cultura em meio MS ½

| Tipo de luz | Germinação (%) | Altura (cm) * | Número de nós * | Número de folhas * |
|-------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Branca | 60 | 3,67±0,3 ^a | 1,82±0,1 ^a | 2,70±0,3 ^a |
| Azul | 60 | 4,47±0,5 ^a | 1,42±0,1 ^b | 1,94±0,4 ^b |
| Vermelha | 55 | 6,83±0,4 ^b | 1,44±0,2 ^b | 1,72±0,5 ^b |

Os resultados expressam média ± erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

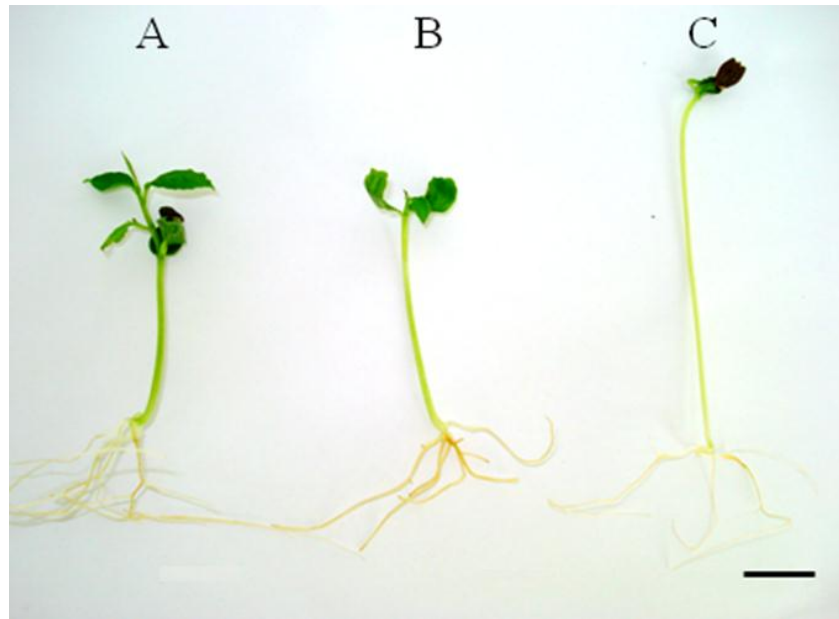


Figura 6 - Germinação *in vitro* de *P. alata* sob diferentes tipos de luz, após 30 dias de cultura em meio MS $\frac{1}{2}$. Plântulas derivadas da germinação *in vitro* sob luz branca (A), azul (B) e vermelha (C). Barra = 1cm.

3.2 Estabelecimento das culturas primárias

Plântulas derivadas da germinação *in vitro* sob luz branca foram utilizadas como fontes de explantes para o estabelecimento de culturas primárias, 60 dias após a semeadura. Ápices caulinares e segmentos nodais originaram brotos por amplificação meristemática, com frequências de 100 e 84%, respectivamente, após 60 dias de cultura em meio MSM $\frac{1}{2}$ (Figura 7). Entretanto, como esses brotos apresentavam alturas reduzidas após 60 dias de cultura, sua utilização como fontes de explantes era bastante limitada.

Dessa forma, visando à otimização do processo de alongamento *in vitro*, segmentos caulinares foram cultivados na presença de água de coco e caseína hidrolisada. Explantes cultivados em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco 10% apresentaram alturas significativamente maiores, independente da presença de caseína hidrolisada (Tabela 3, Figura 8). Entretanto, os brotos obtidos em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco a 10%, na ausência de caseína, apresentaram folhas mais vigorosas que os obtidos nos outros tratamentos (Figura 8 C). A presença de caseína hidrolisada teve uma influência negativa na formação de raízes e no aspecto das folhas, além de aumentar a frequência de formação de calos na base dos brotos (Figura 8 - D, E, F).

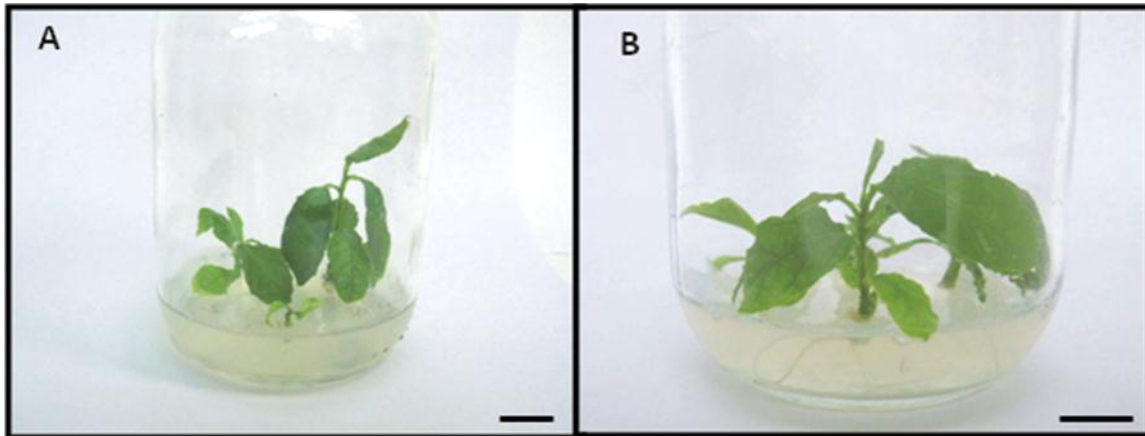


Figura 7 - Regeneração *in vitro* a partir de ápices caulinares (A) e segmentos nodais (B) excisados de plântulas derivadas da germinação *in vitro* de *P. alata*, após 60 dias de cultura em meio MSM ½. Barra = 1cm.

Tabela 3 - Efeito de diferentes suplementos ao meio de cultura MSM ½ no desenvolvimento *in vitro* de *P. alata*, após 30 dias de cultura

| Meio de cultura | Altura (cm) | Nº de nós | Nº de folhas | Formação de raízes (%) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| MSM ½ | 3,37±0,4 ^b | 5,68 ±0,8 ^c | 3,75±1,0 ^a | 46,5 |
| MSM ½ + AC 5% | 3,69±0,3 ^b | 8,02 ±0,6 ^b | 4,22±0,6 ^a | 37 |
| MSM ½ + AC 10% | 5,91±0,6 ^a | 10,27±0,4 ^a | 5,50±0,8 ^a | 50 |
| MSM ½ + CH | 2,36±0,2 ^b | 4,90±0,3 ^c | 1,00±0,6 ^b | 0 |
| MSM ½ + AC 5% + CH | 6,64±0,4 ^a | 10,00±0,4 ^a | 7,00±0,7 ^c | 29 |
| MSM ½ + AC 10% + CH | 5,09±0,5 ^a | 9,21±0,7 ^{a,b} | 5,00±0,6 ^a | 20 |

AC – água de coco / CH – caseína hidrolisada

Os resultados expressam média ± erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

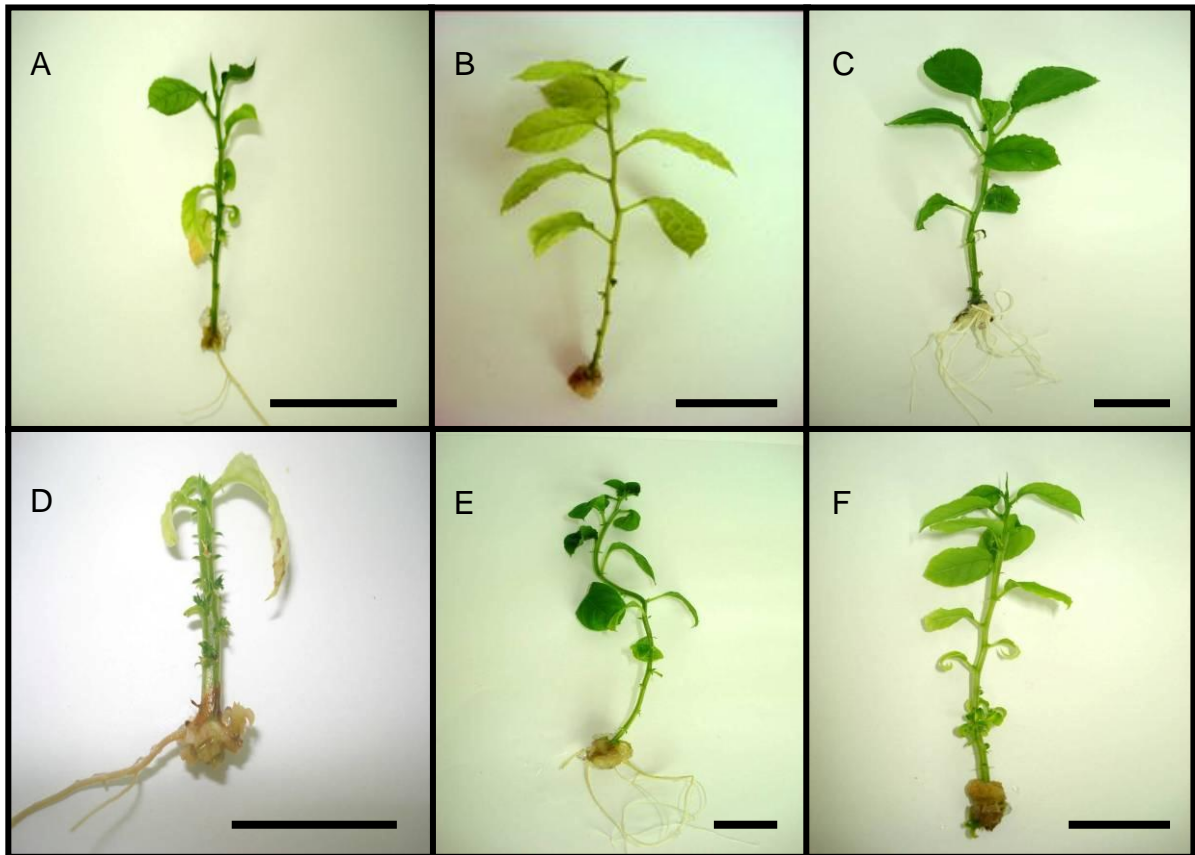


Figura 8 - Desenvolvimento *in vitro* de segmentos caulinares de *P. alata* cultivados em diferentes meios por 60 dias. A) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$; B) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco a 5%; C) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco a 10%; D) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com caseína hidrolisada a 500mg/L; E) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco a 5% e caseína hidrolisada a 500 mg/L; F) Planta obtida em meio MSM $\frac{1}{2}$ suplementado com água de coco a 10% e caseína hidrolisada a 500mg/L. Barra = 1cm.

3.3 Aclimatização

A sobrevivência das plantas de *P. alata* submetidas ao processo de aclimatização (Figura 9) foi obtida com uma eficiência de 86%, após trinta dias da transferência para condições *ex vitro* (Figura 10 A). Não foram observadas diferenças em relação à altura e ao número de nós durante o processo de aclimatização (Figura 10 B e C), embora tenha sido observado um grande índice de queda de folhas (Figura 10 D).



Figura 9 - Plantas de *P. alata* obtidas *in vitro* e transferidas para condições *ex vitro*. Barra = 1cm.

3.4 Indução de calogênese

Segmentos caulinares excisados de culturas primárias de *P. alata* e cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA apresentaram formação de calos em frequências de 100%, após 60 dias de cultura (Tabela 4, Figura 11). A calogênese teve início após o 10º dia de cultura, com a formação de calos friáveis verdes a partir das extremidades dos explantes, independente da concentração de ANA testada. Após 30 dias de cultura, os calos apresentaram aspecto mais compacto, com a presença de algumas regiões arroxeadas, principalmente em resposta às concentrações mais altas (21,2 e 26,8 μM). Calos derivados de segmentos internodais apresentaram ainda a formação de raízes em resposta a todas as concentrações de ANA testadas (Figura 11 A e D), enquanto que os obtidos a partir de segmentos nodais só apresentaram desenvolvimento de raízes em resposta a ANA a 4,5, 5,4 e 21,2 μM (Figura 11 F). Explantes foliares não apresentaram morfogênese nas concentrações estudadas.

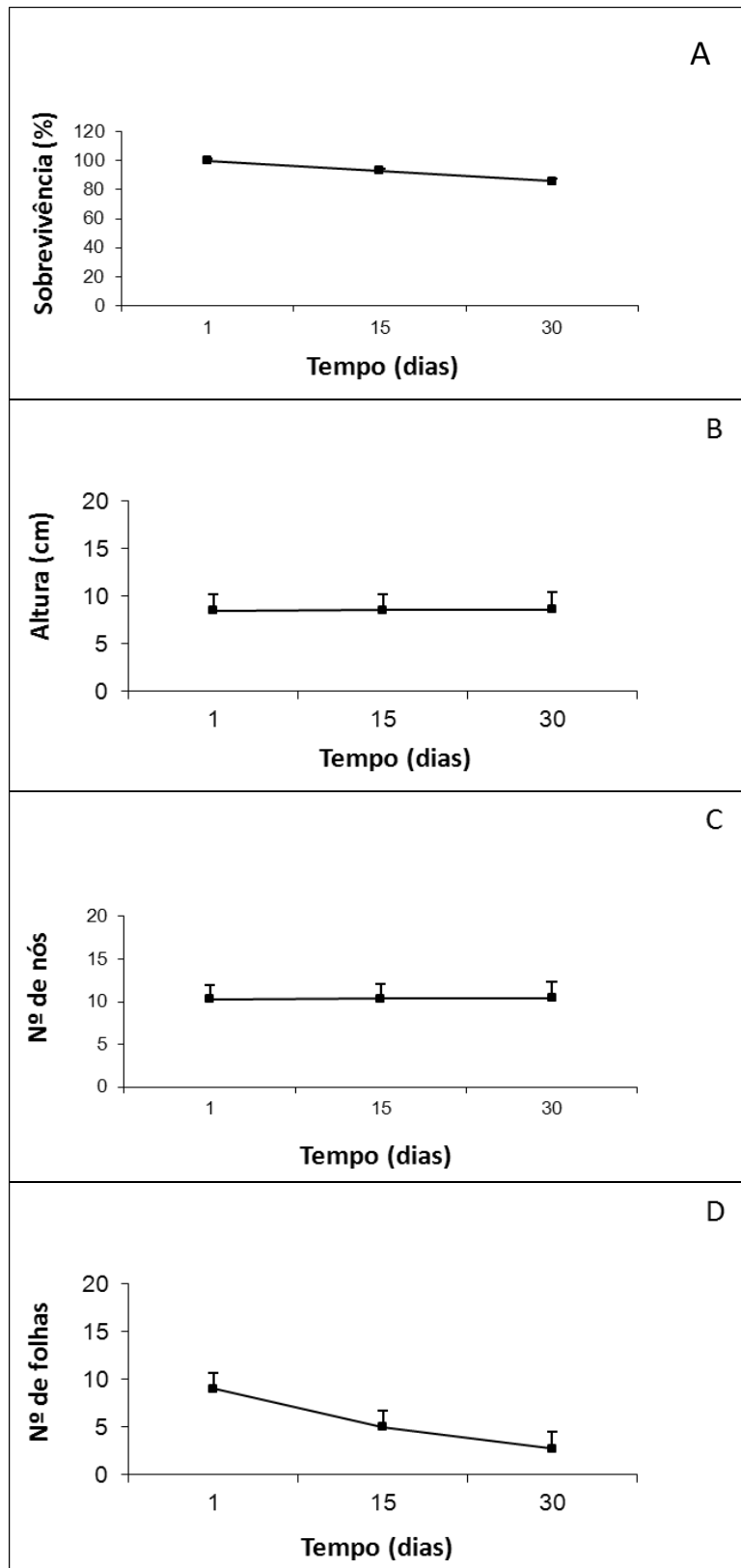


Figura 10 - Aclimatização de plantas de *P. alata* obtidas *in vitro*. A) Sobrevivência; B) Altura; B) Número de nós; C) Número de folhas. Os resultados expressam média \pm erro padrão.

Em meio suplementado com diferentes concentrações de PIC, segmentos internodais também apresentaram a formação de calos após 10 dias de cultura, em frequências de 100%. A formação de calos friáveis amarelos ocorreu a partir das extremidades dos explantes, em todas as concentrações testadas. No entanto, após 30 dias, os calos tornavam-se esverdeados, principalmente em resposta as menores concentrações de PIC (4,1, 8,3 e 12,3 μM). Após 50 dias, esses calos passaram a apresentar um aspecto misto, com a presença de algumas regiões arroxeadas. Em meios suplementados com PIC a 28,7 e 41,41 μM , foram obtidos calos de aspecto mais friável e homogêneo (Figura 12 A). Esses calos foram então pesados, sendo o maior acúmulo de biomassa observado naqueles obtidos na presença de PIC a 41,4 μM (Figura 13 A).

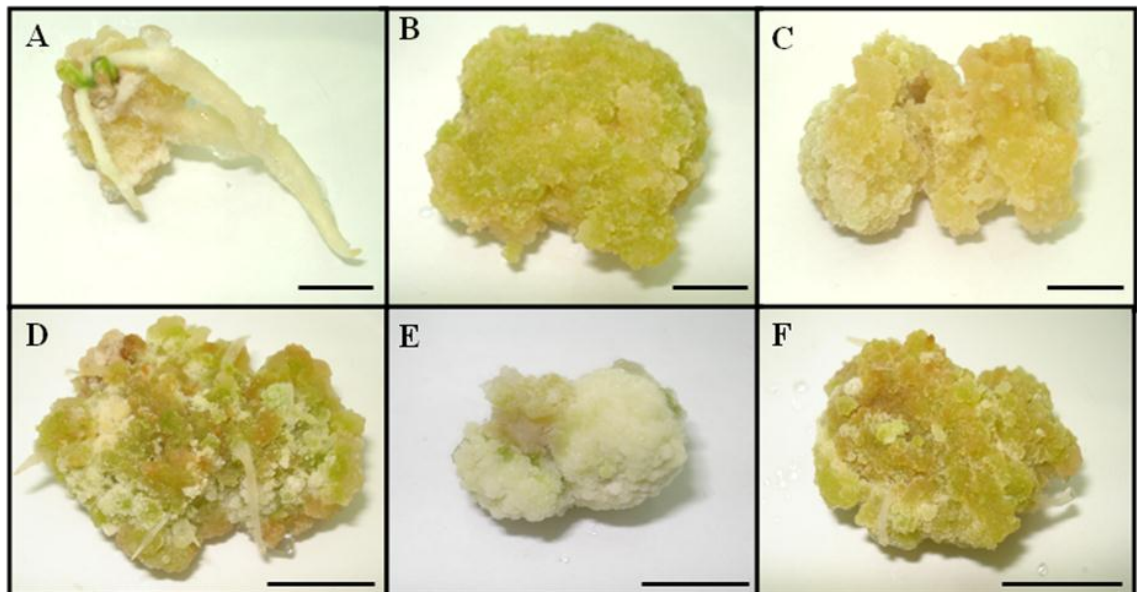


Figura 11 - Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos caulinares de *P. alata*, após 60 dias de cultura. A) Formação de calo e raízes a partir de segmento internodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 4,5 μM ; B) Calo misto formado a partir de segmento nodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 4,5 μM ; C) Calo friável formado a partir de segmento internodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 5,4 μM ; D) Início da formação de raízes a partir de calos derivados de segmento internodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 15,9 μM ; E) Calo misto originado a partir de segmento internodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 26,8 μM ; F) Calo misto formado a partir de segmento nodal cultivado em meio MSM suplementado com ANA a 21,2 μM . Barra = 1cm.

Tabela 4 - Formação de calos a partir de explantes caulinares e foliares de *P. alata* cultivados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA ou PIC por 60 dias.

| Regulador de crescimento | Calogênese (%) | | | Tipo de calo | | |
|--------------------------|----------------|-----|-------|--------------|----------|---------|
| | Entrenó | Nó | Folha | Entrenó | Nó | Folha |
| ANA 5,4 μ M | 100 | 100 | 0 | Friável | Misto | - |
| ANA 10,7 μ M | 100 | 100 | 0 | Friável | Compacto | - |
| ANA 15,9 μ M | 100 | 100 | 0 | Misto | Compacto | - |
| ANA 21,2 μ M | 100 | 100 | 0 | Misto | Misto | - |
| ANA 27,0 μ M | 100 | 100 | 0 | Misto | Compacto | - |
| PIC 4,1 μ M | 100 | 100 | 100 | Misto | Friável | Friável |
| PIC 8,3 μ M | 100 | 100 | 100 | Misto | Friável | Friável |
| PIC 12,3 μ M | 100 | 100 | 100 | Misto | Friável | Friável |
| PIC 16,4 μ M | 100 | 100 | 100 | Friável | Friável | Friável |
| PIC 20,7 μ M | 100 | 100 | 100 | Friável | Friável | Friável |
| PIC 28,7 μ M | 100 | - | 100 | Friável | - | Friável |
| PIC 41,41 μ M | 100 | - | 100 | Friável | - | Friável |

Segmentos nodais e foliares também apresentaram 100% de calogênese em resposta às diferentes concentrações de PIC testadas. A formação de calos friáveis amarelos teve início no 5º dia de cultura a partir da base dos explantes. Os calos obtidos a partir de segmentos nodais em resposta às menores concentrações (4,1 e 8,3 μ M) apresentaram oxidação e necrose após 30 dias de cultura. Calos friáveis obtidos nas demais concentrações apresentaram grande crescimento após 60 dias de cultura (Figura 12 B), sem diferenças estatísticas em relação ao acúmulo de biomassa (Figura 13 B). Por outro lado, os calos obtidos a partir de segmentos foliares, apresentaram o maior acúmulo em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μ M, na presença ou ausência de luz (Figura 14 A e B). Além disso, esses calos apresentaram diferença na coloração após 240 dias de cultura, tornando-se mais amarelos.

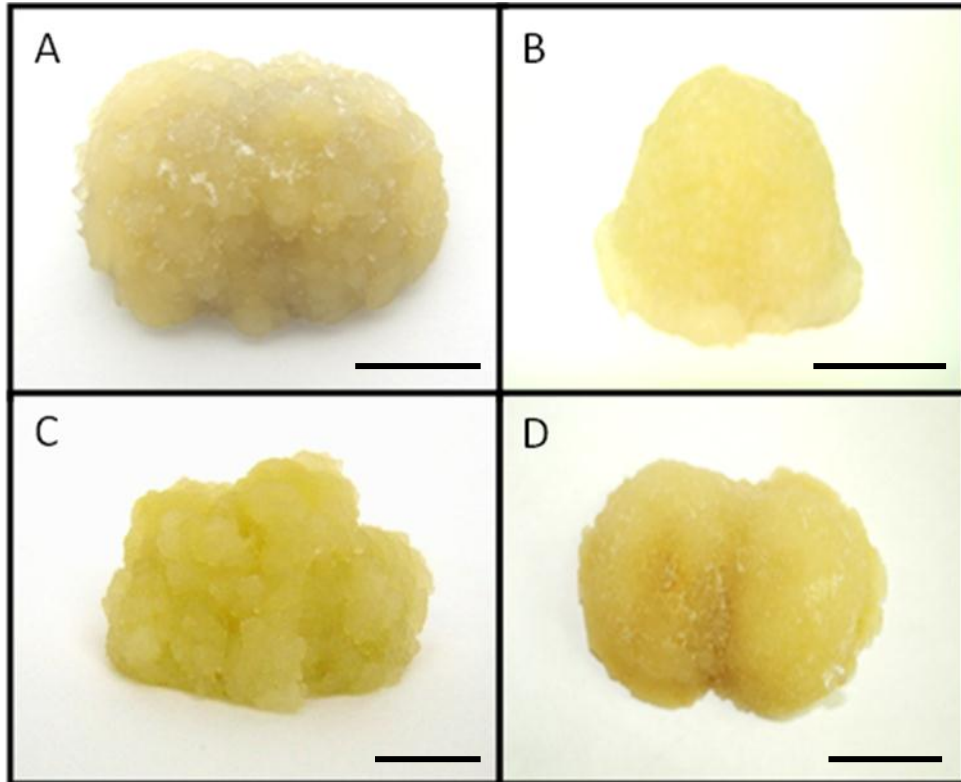


Figura 12 - Formação de calos a partir de segmentos foliares e caulinares excisados de plantas *in vitro* de *P. alata*, após 60 dias de cultura. A) Calo friável obtido do cultivo de segmento internodal em meio MSM suplementado com PIC a $41,41 \mu\text{M}$ com 60 dias de cultura; B) Calo friável a partir de segmento nodal em meio MSM suplementado com PIC a $20,7 \mu\text{M}$ com 60 dias de cultura; C) Calo friável obtido do cultivo de segmento foliar em meio MSM suplementado com PIC a $28,9 \mu\text{M}$ com 60 dias de cultura, na presença de luz; D) Calo friável obtido do cultivo de segmento foliar em meio MSM suplementado com PIC a $28,9 \mu\text{M}$ com 60 dias de cultura, na ausência de luz. Barra = 1cm.

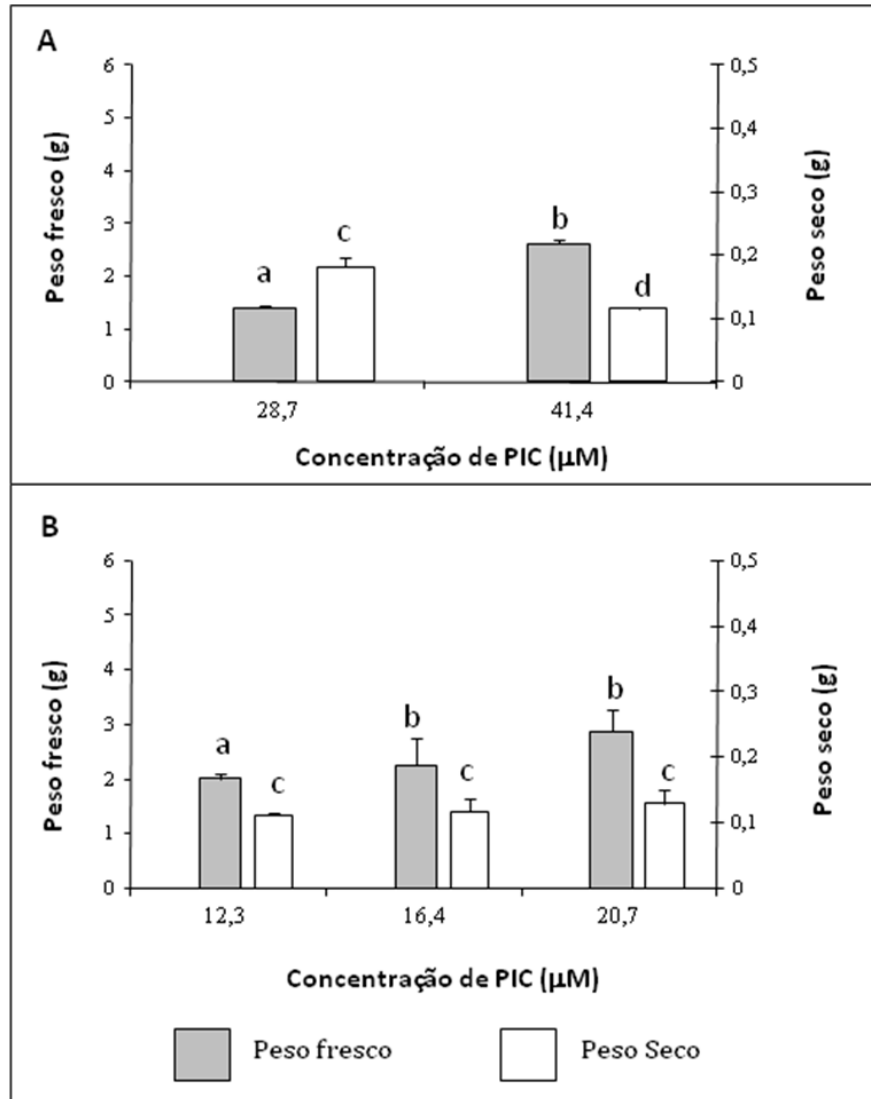


Figura 13 - Acúmulo de biomassa de calos fríaveis de *P. alata* obtidos a partir de (A) segmentos internodais e (B) segmentos nodais inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura na presença de luz. Os resultados expressam média \pm erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

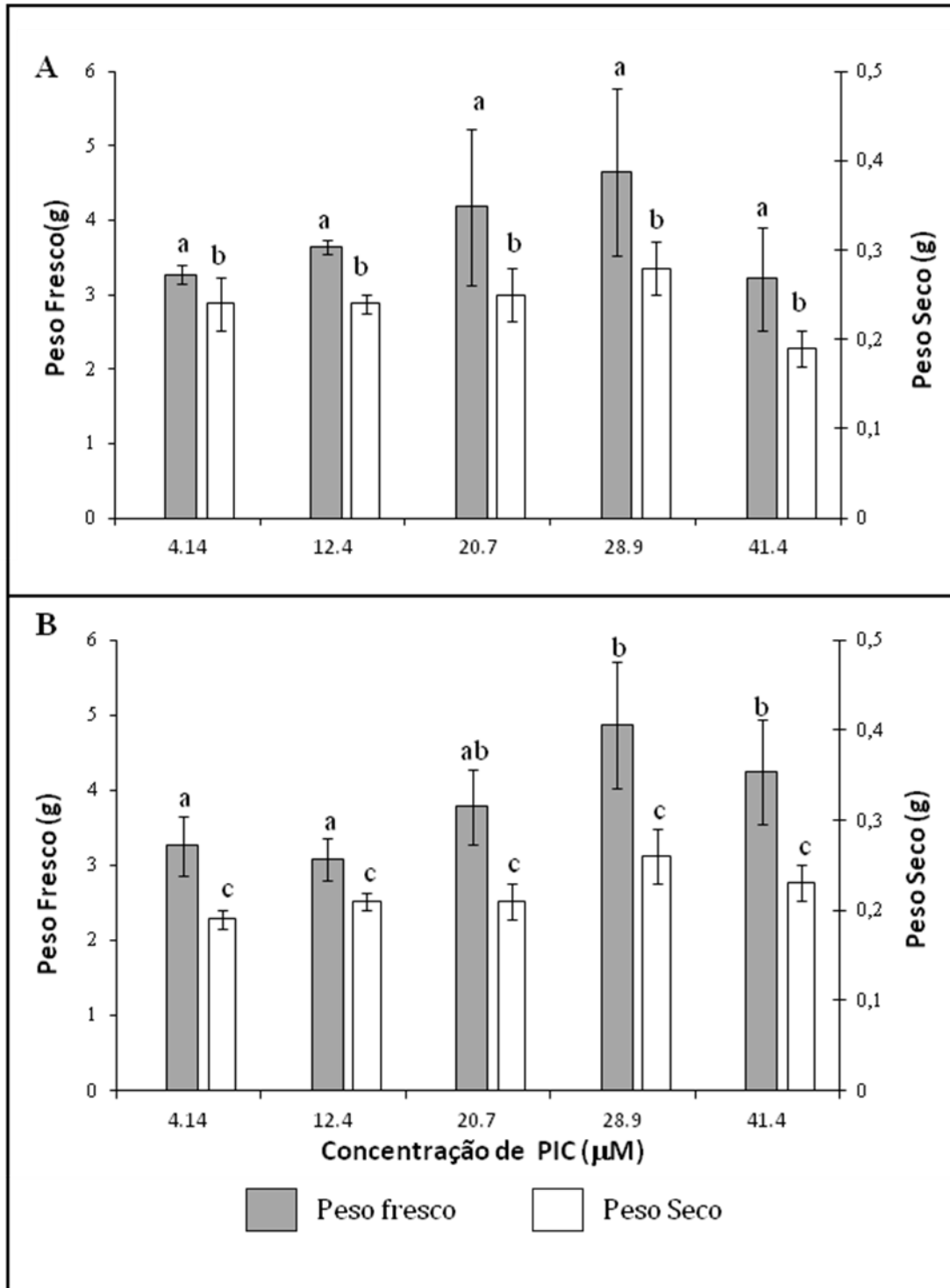


Figura 14 - Acúmulo de biomassa de calos fráveis formados a partir de segmentos foliares de *P. alata* inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de PIC, após 60 dias de cultura. A) Na ausência de luz; B) Na presença de luz. Os resultados expressam média \pm erro padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

3.5 Cultura de células em suspensão

Calos friáveis obtidos a partir de explantes foliares cultivados em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM após 60 dias de cultura, na presença ou ausência de luz foram utilizados para o estabelecimento de culturas de células em suspensão (Figura 15). Os padrões de crescimento das culturas incubadas em ambas as condições são apresentados na figura 16. Suspensões celulares mantidas na presença de luz atingiram a fase exponencial após três dias de cultura. Esse padrão foi mantido até o 15º dia, quando as culturas aumentaram em 3 vezes a biomassa acumulada (Figura 16 A). Por outro lado, culturas mantidas no escuro apresentaram a fase exponencial entre 15º e 24º dia de cultura, também com biomassa aumentada em três vezes (Figura 16 B). Após a fase exponencial, as culturas mostraram decréscimo na densidade de células. As suspensões celulares foram mantidas por três meses (seis subculturas), mostrando o mesmo padrão de crescimento, sem apresentar oxidação.



Figura 15 - Cultura de células em suspensão obtida a partir de calos friáveis derivados de folhas de *P. alata* cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM , mantida na ausência de luz. Barra = 1cm

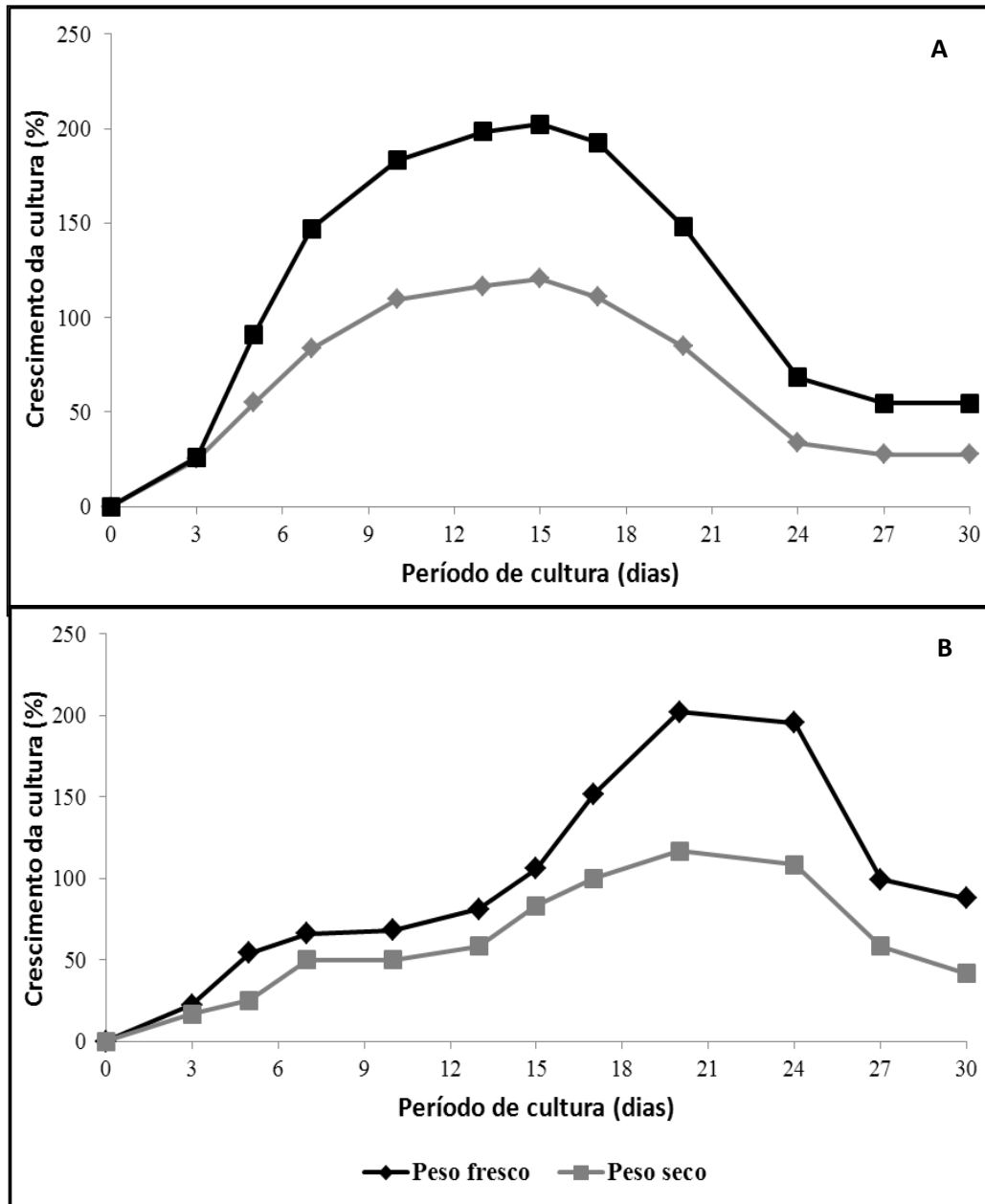


Figura 16 - Acúmulo de biomassa em suspensões celulares de *P. alata* cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM por 30 dias. A - Na presença de luz; B - Na ausência de luz.

3.6 Morfogênese *in vitro* a partir de sementes

Diferentes respostas morfogênicas foram obtidas a partir de sementes cultivadas em meio MSM suplementado com diferentes reguladores de crescimento, após remoção parcial do tegumento.

Sementes inoculadas em meios suplementados com BAP apresentaram diferentes porcentagens de germinação, de acordo com a concentração e a condição de incubação utilizada. Na presença de luz, a germinação ocorreu apenas em resposta a BAP a 4,4 e 8,8 μM , em frequências de 40 e 10%, respectivamente, com o desenvolvimento de plântulas normais (Figura 17 A). Em meio suplementado com BAP a 17,6 μM , ocorreu apenas o desenvolvimento de cotilédones (Figura 17 B). Por outro lado, na ausência de luz, foram obtidas plântulas com aspecto estiolado em resposta a todas as concentrações testadas, em frequências distintas (Tabela 5, Figura 17 C).

A formação de calos foi observada após 10 dias de cultura em resposta a PIC, ANA ou 2,4-D, utilizados isoladamente ou em associação com BAP, tanto na presença como na ausência de luz. Em meios suplementados com PIC, a calogênese ocorreu em frequências entre 37 e 60% (Tabela 5), com a formação de calos friáveis, amarelados (Figura 18 A), exceto na concentração de 16,4 μM , que induziu a formação de calos mucilaginosos, na ausência de luz (Figura 18 B).

Sementes inoculadas em meios suplementados com ANA desenvolveram calos friáveis, com a formação de raízes e cotilédones (Figura 18 C). Além disso, foi observada a formação de plântulas em resposta a ANA a 5,4 μM , independente da presença de luz.

A presença de 2,4-D, utilizado isoladamente ou em associação com BAP, induziu a formação de calos friáveis, em frequências distintas. A maior taxa de calogênese (60%) ocorreu em meio MSM suplementado 2,4-D a 18,1 μM em associação com BAP a 4,4 μM , na presença de luz (Figura 18 D). Em meios suplementados com 2,4-D a 9,0 μM , os calos apresentaram a formação de raízes (Figura 18 E), enquanto que na presença de 2,4-D a 18,1 μM , foi observado o desenvolvimento de calos esverdeados (Figura 18 F). Não foram obtidas respostas morfogênicas na presença de 2,4-D a 4,5 μM (Tabela 5).

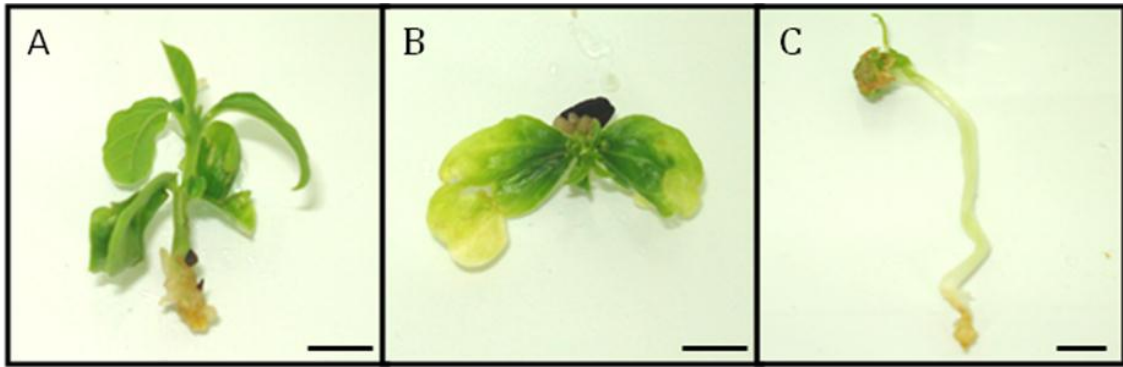


Figura 17 - Morfogênese *in vitro* a partir de sementes de *P. alata* cultivadas em meio MSM suplementado com BAP por 30 dias. A) Plântula formada a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com BAP a 4,4 μM e mantida na presença de luz; B) Desenvolvimento de cotilédones a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com BAP a 17,6 μM e mantida na presença de luz; C) Plântula estiolada formada a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com BAP a 4,4 μM e mantida na ausência de luz. Barra = 1cm.

Tabela 5 - Morfogênese *in vitro* a partir de sementes de *P. alata* cultivadas em meio MSM suplementado com diferentes reguladores de crescimento, após 30 dias de cultura

| Meio de cultura | Claro | | Escuro | |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Calogênese (%) | Germinação (%) | Calogênese (%) | Germinação (%) |
| MSM + 2,4-D 4,5 μM | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MSM + 2,4-D 9,0 μM | 10 | 0 | 0 | 0 |
| MSM + 2,4-D 18,1 μM | 30 | 0 | 13 | 0 |
| MSM+2,4-D18,1 +BAP4,4 μM | 60 | 0 | 60 | 0 |
| MSM +ANA 5,4 μM | 10 | 20 | 23 | 7 |
| MSM +ANA 10,7 μM | 0 | 0 | 20 | 0 |
| MSM +ANA 21,2 μM | 13 | 0 | 13 | 0 |
| MSM + PIC 4,1 μM | 60 | 0 | 53 | 0 |
| MSM + PIC 8,3 μM | 37 | 0 | 53 | 0 |
| MSM + PIC 16,4 μM | 57 | 0 | 33 | 0 |
| MSM + BAP 4,4 μM | 0 | 40 | 0 | 20 |
| MSM + BAP 8,8 μM | 0 | 10 | 0 | 30 |
| MSM + BAP 17,6 μM | 0 | 0 | 0 | 20 |

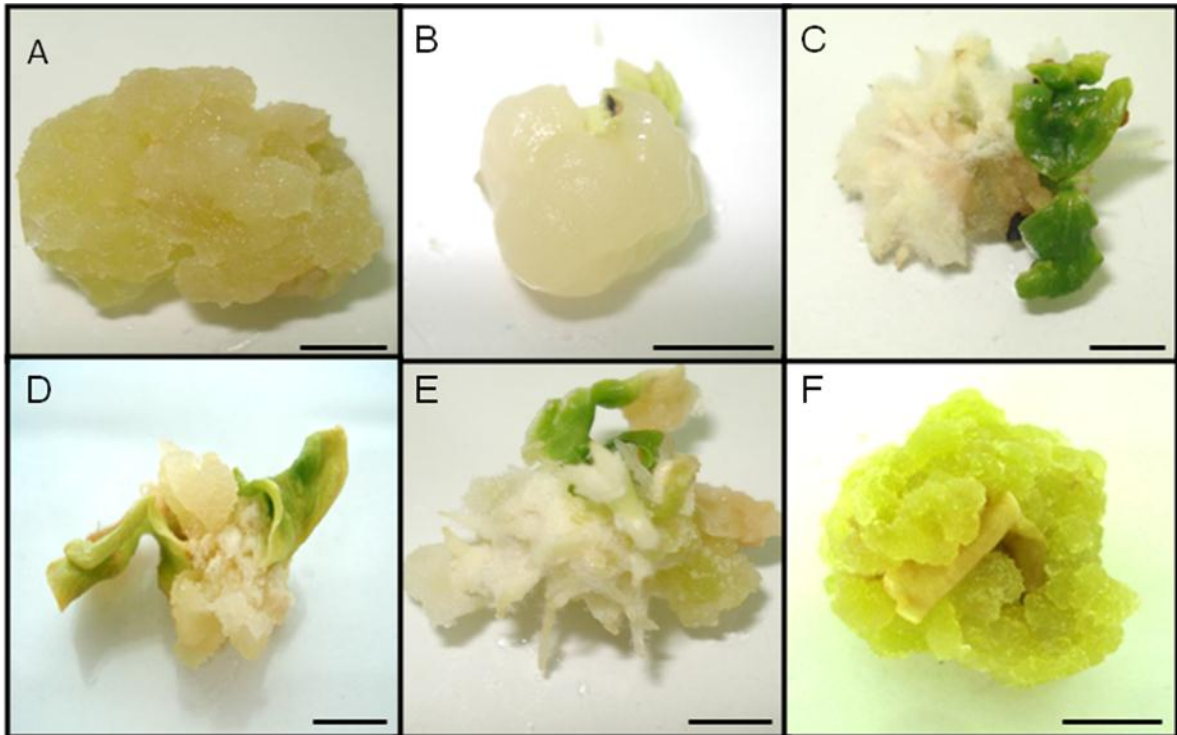


Figura 18 - Morfogênese *in vitro* a partir de sementes de *P. alata*, após 30 dias de cultura. A) Calo friável formado a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com PIC a 4,1 μM e mantida na presença de luz; B) Calo mucilaginoso formado a partir de sementes em meio MSM suplementado com PIC a 16,4 μM , na ausência de luz; C) Desenvolvimento de cotilédones e calos rizogênicos a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com ANA a 21,2 μM , na presença de luz; D) Calo friável e desenvolvimento de cotilédones a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado 2,4-D a 18,1 μM em associação com BAP a 4,4 μM , na presença de luz; E) Desenvolvimento de cotilédones e calo rizogênico a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com 2,4 D a 9,0 μM , na presença de luz; F) Calo friável formado a partir de semente inoculada em meio MSM suplementado com 2,4-D a 18,1 μM e mantida na presença de luz. Barra. Barra = 1cm.

3.7 Avaliação do potencial antioxidante

3.7.1 Otimização da extração de substâncias antioxidantes

3.7.1.1 Diferentes proporções etanol:água

A avaliação dos extratos de folhas de plantas de campo de *P. alata* obtidos com diferentes proporções etanol:água revelaram a existência de substâncias com potencial antioxidante, evidenciadas pela redução do radical DPPH, em todas as amostras testadas (Figura 19). Os valores de CE_{50} (Figura 20) variaram de $5,2 \text{ g L}^{-1}$ (100% etanol) a $9,7 \text{ g L}^{-1}$ (20% etanol), sendo observada maior atividade sequestrante em extratos com maior proporção de etanol (100 e 80%) (Figuras 19 e 20). Entretanto, extratos obtidos com 80% de etanol tiveram um rendimento 4 vezes acima do extrato 100% etanólico e, por isso, foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos (Figura 21).

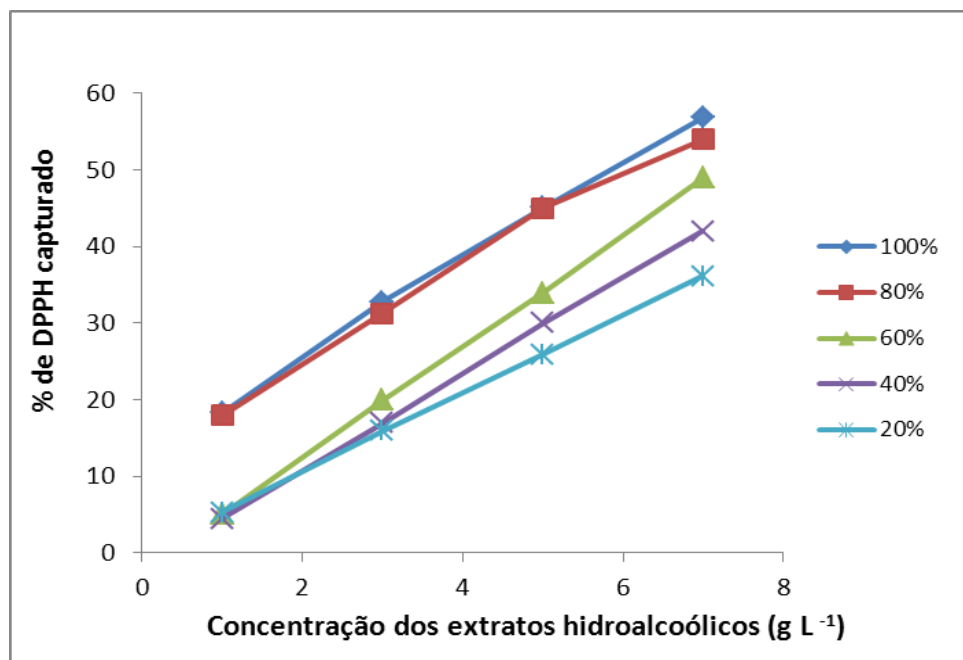


Figura 19 - Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos em diferentes proporções etanol:água.

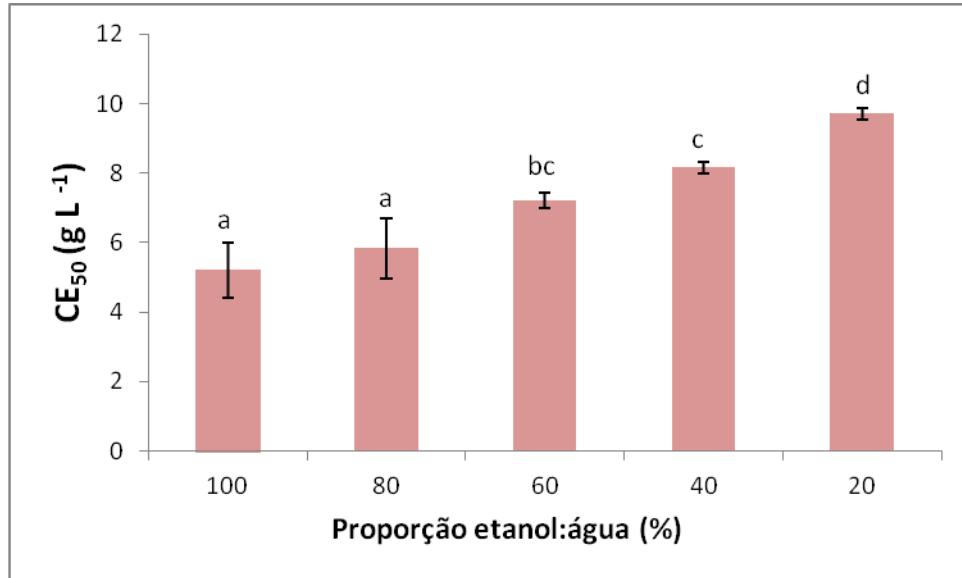


Figura 20 - CE₅₀ de extratos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidas com diferentes proporções etanol:água. Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

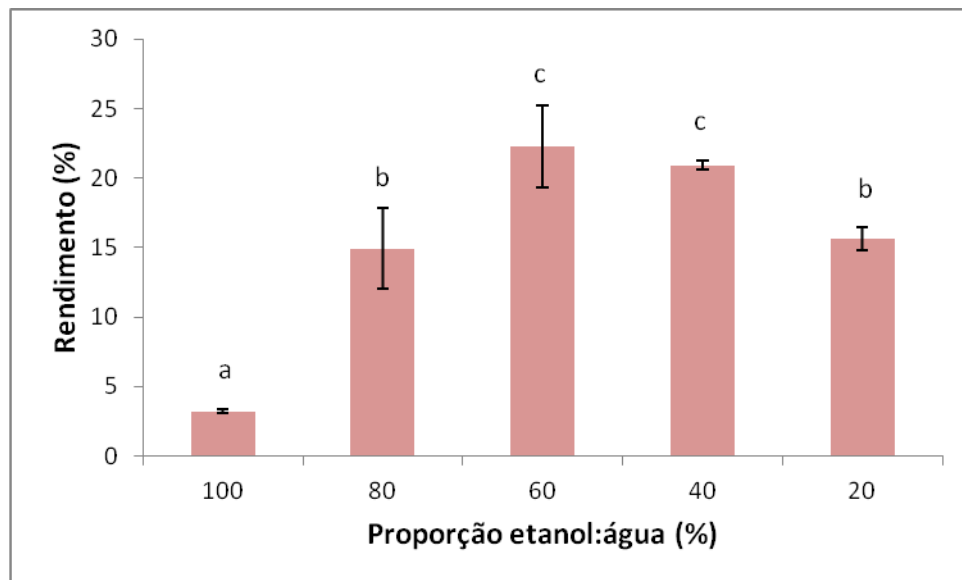


Figura 21 - Rendimento dos extratos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos em diferentes proporções etanol:água. Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

3.7.1.2 Período de maceração

O período de maceração influenciou a extração de substâncias antioxidantes e o rendimento dos extratos (Figuras 22 e 24). Entre os tempos avaliados (2, 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min), o menor valor de CE_{50} ($3,65 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$) e a maior porcentagem de DPPH sequestrado a 7 mg/mL (88%) ocorreram em extratos obtidos com 15 minutos de maceração, embora nas condições testadas neste trabalho não tenha ocorrido diferença estatística significativa nos valores de CE_{50} em relação aos períodos de 5 e 120 minutos (Figuras 22 e 23)

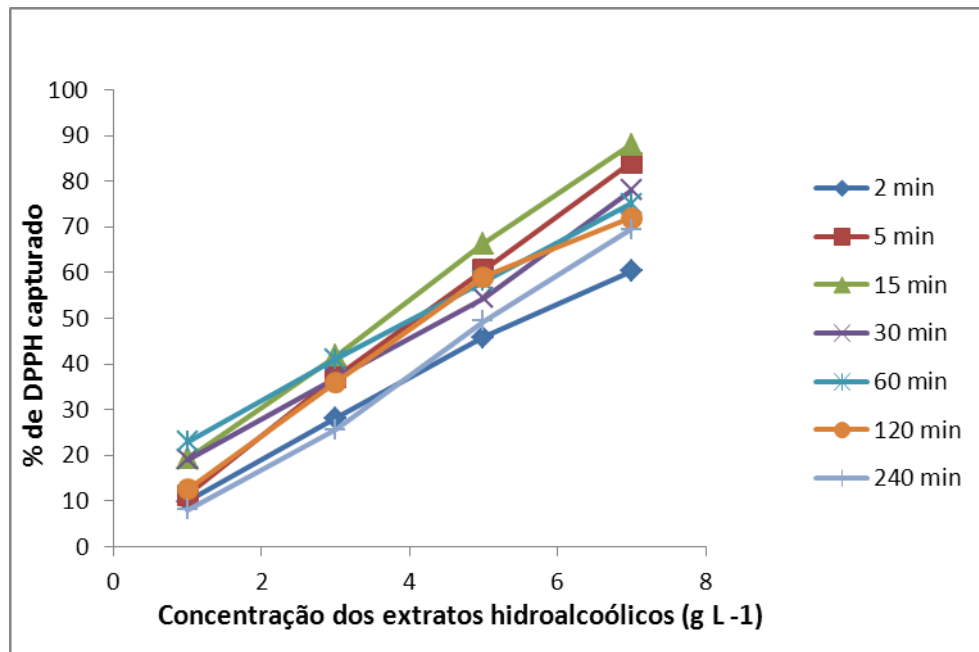


Figura 22 - Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos (80%) de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos em diferentes períodos de maceração.

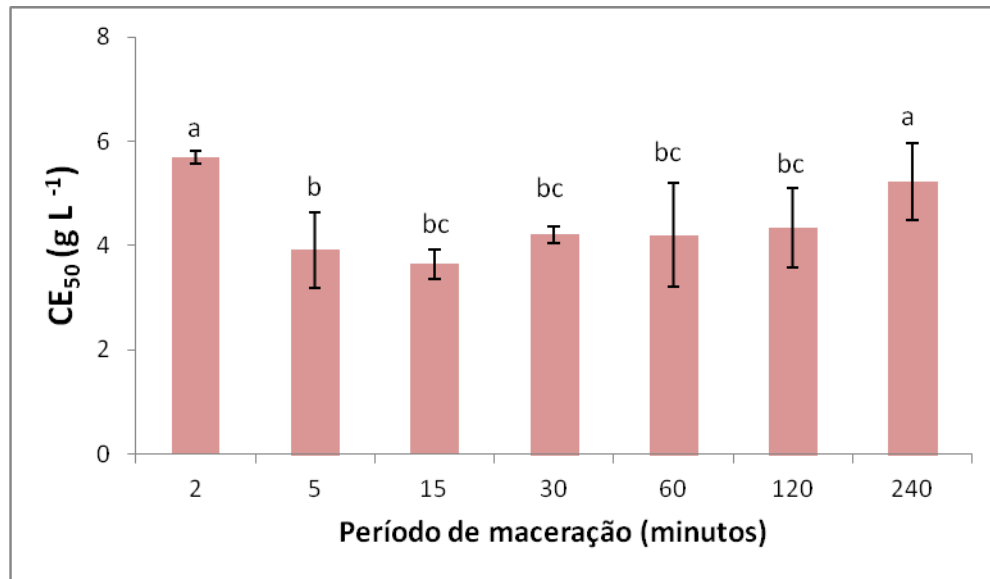


Figura 23 - CE₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos após diferentes períodos de maceração. Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

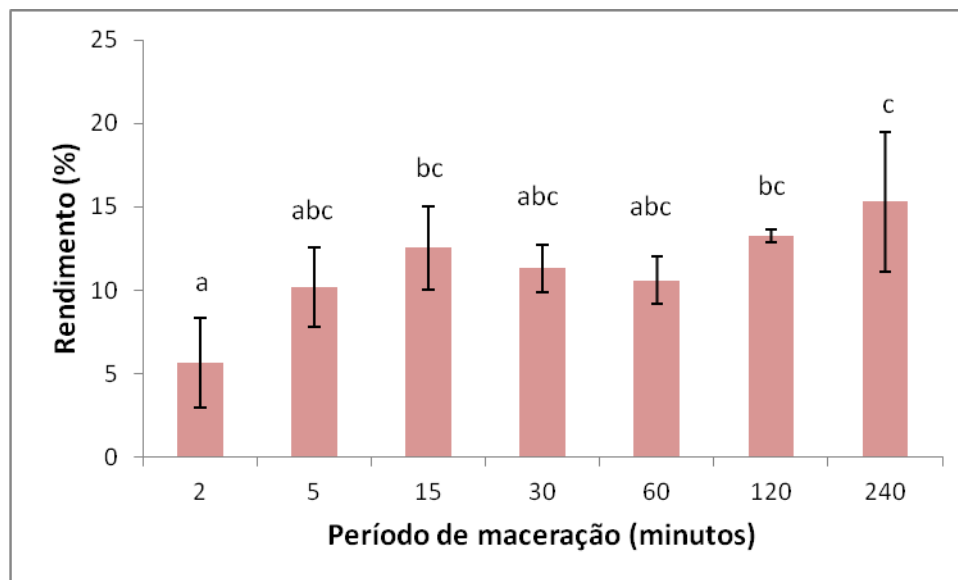


Figura 24 - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos após diferentes períodos de maceração. Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

3.7.1.3 Diferentes proporções solvente:tecido

Os extratos hidroalcoólicos testados em diferentes proporções de solvente:tecido (10, 20, 30 e 40 mL/g) não apresentaram diferenças em relação ao conteúdo de substâncias antioxidantes (Figuras 25 e 26), embora tenham apresentado rendimentos diretamente proporcionais ao aumento do volume de solvente, que variou de $10,61 \pm 1,38$ (10 mL/g) a $27,77 \pm 2,39$ (40 mL/g) (Figura 27).

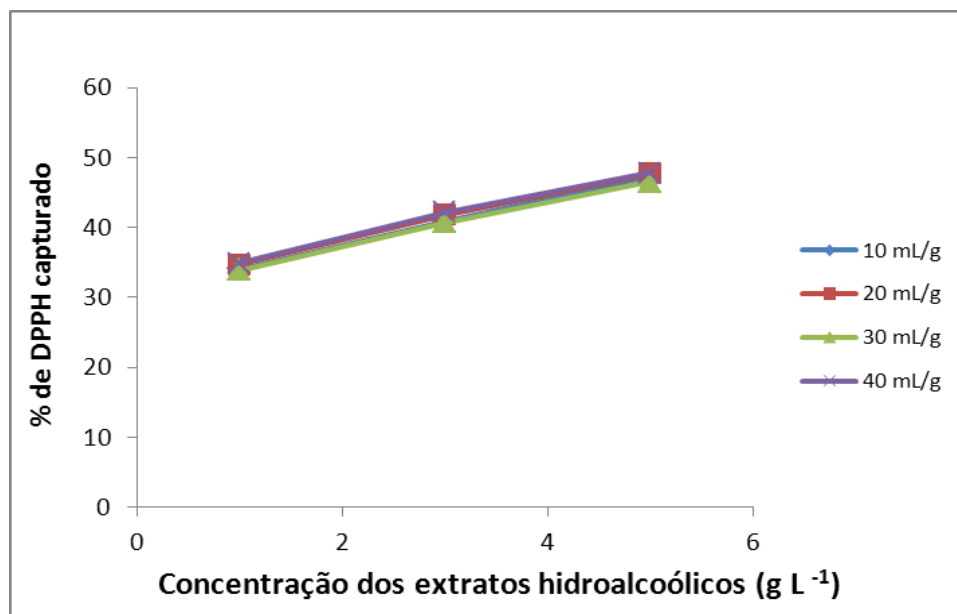


Figura 25 - Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos (80%) de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos com diferentes proporções solvente: tecido (mL/g).

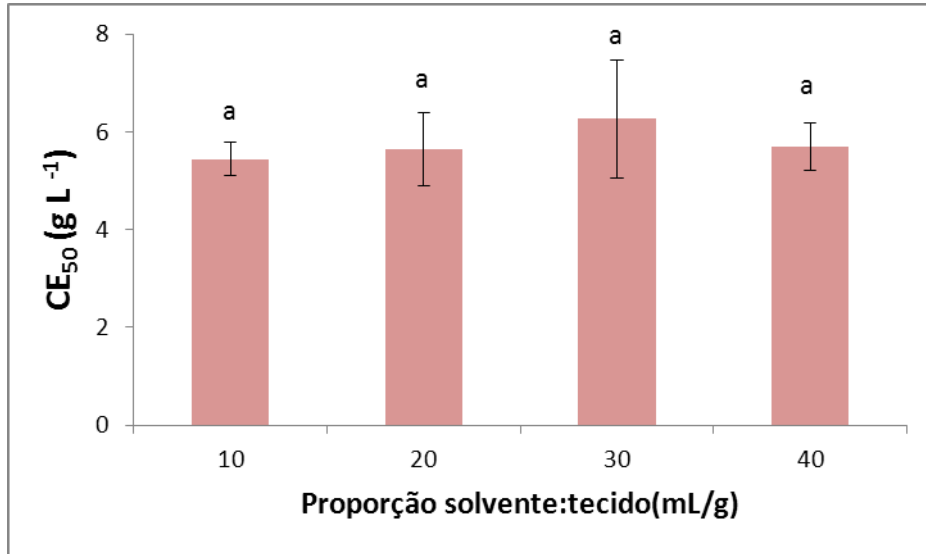


Figura 26 - CE₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos por diferentes proporções solvente:tecido (mL/g). Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

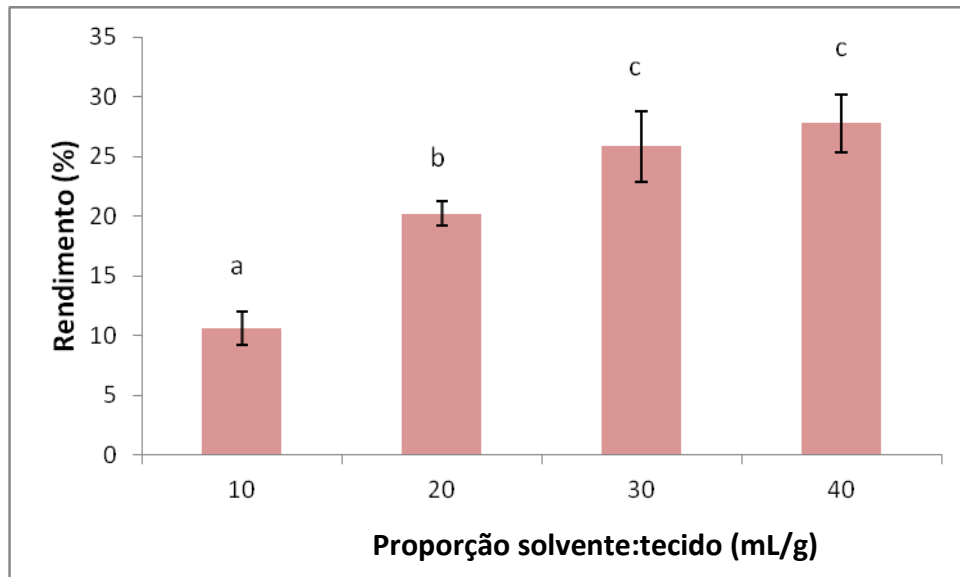


Figura 27 - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos por diferentes proporções de solvente:tecido (mL/g). Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

3.7.1.4 Número de extrações

O número de extrações influenciou apenas na porcentagem de rendimento do extrato (Figura 30), sem afetar significativamente o potencial antioxidante (Figuras 28 e 29).

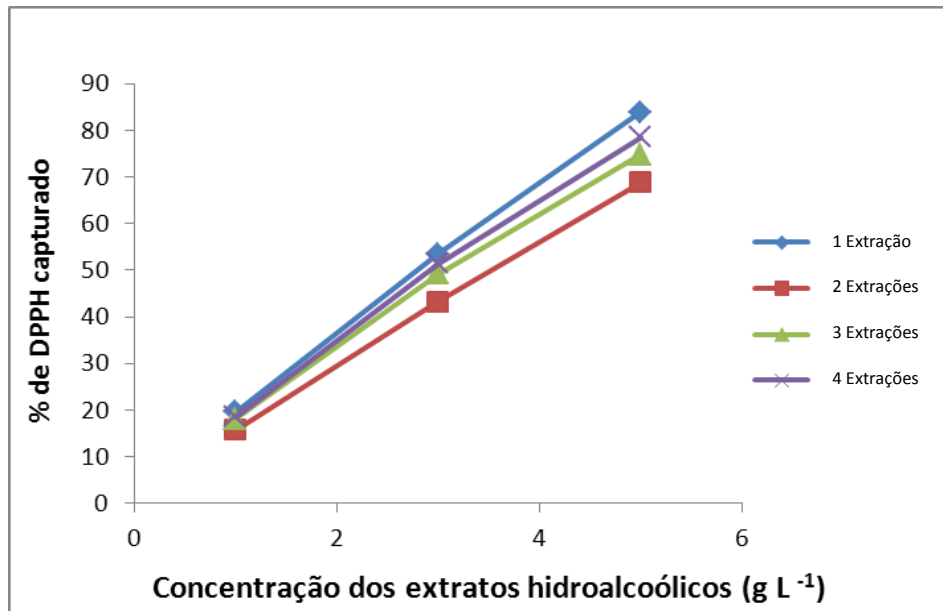


Figura 28 – Atividade sequestrante do radical DPPH de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos após diferentes números extrações.

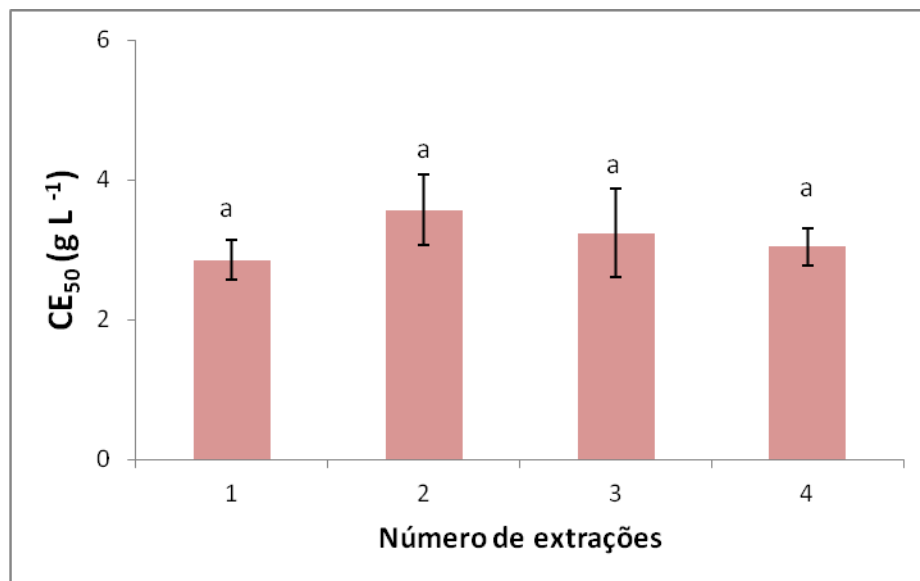


Figura 29 - CE₅₀ de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos após diferentes números de extrações. Os resultados expressam média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

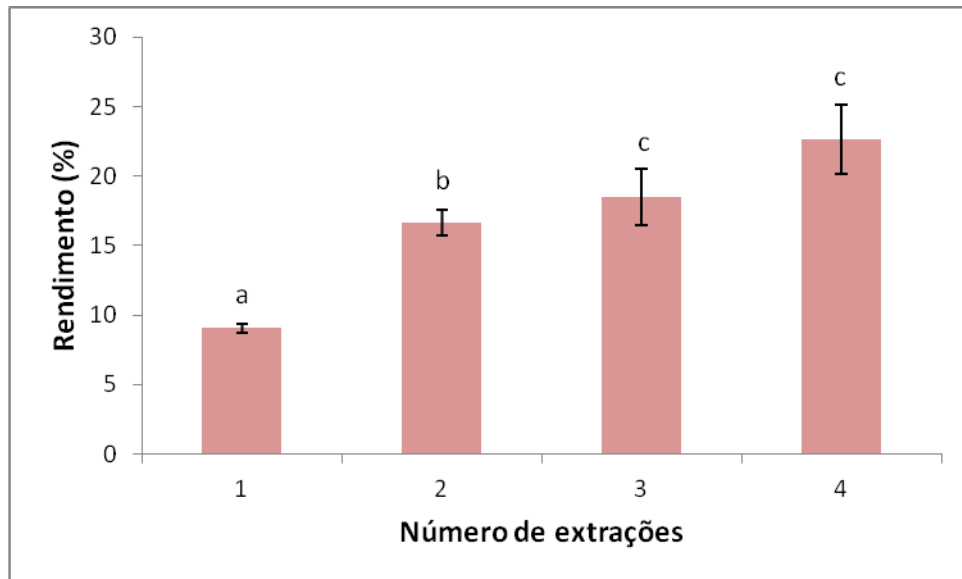


Figura 30 - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas *in vivo* de *P. alata* obtidos após diferentes extrações. Os resultados expressam média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$).

3.7.2 Potencial antioxidante e dosagem de fenóis totais

Plantas mantidas *in vitro*, plantas aclimatizadas e calos friáveis obtidos a partir de segmentos foliares em meio MSM suplementado com PIC a $28,9 \mu\text{M}$ e células em suspensão (CCS) mantidas nas mesmas condições de cultura dos calos foram selecionados para determinação do potencial antioxidante e do conteúdo fenólico em comparação com plantas mantidas *in vivo*.

Comparando-se os valores de CE_{50} dos extratos, podemos observar que os extratos de folhas obtidas de plantas *in vivo* e plantas aclimatizadas apresentam maior potencial antioxidante, com valores de CE_{50} de $3,10 \pm 0,17$ e $3,12 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6). Por outro lado, calos e cultura de células em suspensão mantidos na ausência de luz por 120 dias exibiram menor ação antioxidante em relação aos outros materiais, com valores de CE_{50} de $313,75 \pm 0,07$ e $302,85 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 6). No entanto, a manutenção dos calos na ausência de luz por um período adicional de 120 dias proporcionou um aumento de 7 vezes o potencial antioxidante (Tabela 6).

Outro fator que aumentou a eficiência antiradicalar foi a manutenção dos diferentes materiais na presença de luz. Calos mantidos nessa condição apresentaram um potencial antioxidante 25 vezes maior que o mesmo material mantido no escuro (Tabela 6).

Tabela 6 – Potencial antioxidante, eficiência antiradicalar e conteúdo fenólico de extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de *P. alata* obtidos de materiais *in vivo* e produzidos *in vitro*.

| Amostras | Conteúdo de compostos fenólicos (mg de EAG/ g de material seco) | Ensaio DPPH | | |
|-------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | CE ₅₀ (g L ⁻¹) | T _{CE50} * (min) | EA** (x10 ⁻³) |
| Folhas <i>in vivo</i> | 34,86 ± 0,004 | 3,10 ± 0,17 | 120 | 2,7800 |
| Folhas <i>in vitro</i> | 17,52 ± 0,007 | 5,26 ± 0,06 | 240 | 0,8300 |
| Folhas aclimatizadas | 32,82 ± 0,030 | 3,12 ± 0,18 | 240 | 1,3900 |
| Calos friáveis (120d, escuro) | 0,69 ± 0,009 | 313,75 ± 0,07 | 1080 | 0,0030 |
| CCS (120d, escuro) | 0,59 ± 0,002 | 302,85 ± 0,05 | 1080 | 0,0029 |
| Calos friáveis (240d, escuro) | 2,94 ± 0,030 | 41,14 ± 0,03 | 1080 | 0,0210 |
| Calos friáveis (120d, luz) | 5,97 ± 0,010 | 12,53 ± 0,09 | 1080 | 0,0770 |
| CCS (20d, luz) | 0,52 ± 0,006 | 253,33 ± 0,08 | 1080 | 0,0037 |

CCS – Culturas de células em suspensão

* Tempo de reação mensurado na CE₅₀

** Eficiência antiradicalar

O comportamento cinético dos extratos de todos os materiais vegetais de *P. alata* foi classificado como lento ($T_{CE50} > 30$ minutos), embora materiais oriundos de calos e suspensões celulares tenham apresentado velocidade de reação nove vezes inferior aos de folhas *in vivo* (Tabela 6).

Quanto à eficiência antirradicalar, os extratos obtidos de folhas de plantas *in vivo* e plantas aclimatizadas foram considerados como tendo média eficiência ($EA > 1$ e ≤ 5). No entanto, plantas aclimatizadas apresentaram poder antioxidante inferior ao de plantas *in vivo*, com um maior valor de T_{CE50} e, conseqüentemente, menor EA. Os demais extratos foram considerados com baixa eficiência ($EA < 1$) (Tabela 6).

Na análise do conteúdo de fenóis, foi observado que os extratos hidroalcoólicos preparados a partir de folhas de plantas mantidas *in vivo* e de plantas aclimatizadas apresentaram maior concentração dessas substâncias, com o equivalente a $34,86 \pm 0,004$ e $32,82 \pm 0,030$ mg de ácido gálico/g de extrato, respectivamente (Tabela 6). Amostras de extratos de folhas de plantas mantidas *in vitro* também apresentaram alto conteúdo de substâncias fenólicas ($17,52 \pm 0,007$ mg EAG/g de extrato). Em contrapartida, os demais materiais obtidos *in vitro* apresentaram valores bem menores de EAG. Esses resultados foram relacionados à atividade antioxidante dos mesmos materiais (Tabela 6).

Além disso, o aumento do potencial antioxidante (expresso em porcentagem de DPPH reduzido) foi proporcional ao aumento do conteúdo fenólico (expresso em mg de EAG/g de extrato), nas três concentrações utilizadas (Figura 31). Foi observada uma reposta linear positiva para todos os materiais avaliados indicando, que os compostos fenólicos tem uma contribuição majoritária na capacidade antioxidante dos extratos.

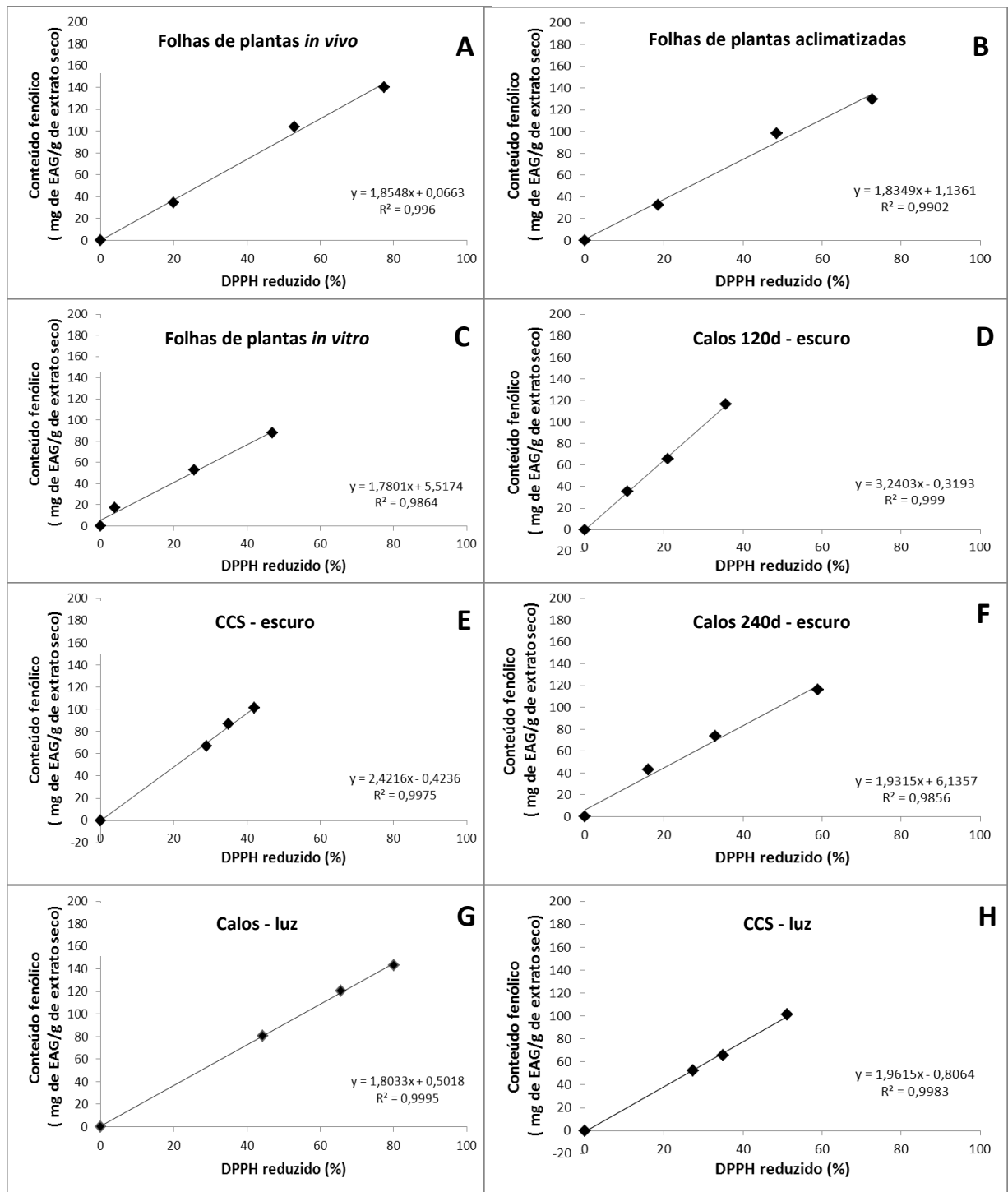


Figura 31 - Relação entre conteúdo de fenóis totais e potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de *P. alata*. A) Folhas de plantas *in vivo* (1 - 5 g L⁻¹); B) Folhas de plantas aclimatizadas (1 - 5 g L⁻¹); C) Folhas de plantas *in vitro* (1 - 5 g L⁻¹); D) Calos derivados de folhas cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM, na ausência de luz, por 120 dias (150 - 250 g L⁻¹); E) Cultura de células em suspensão mantidas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM, na ausência de luz, por 120 dias (150 - 250 g L⁻¹); F) Calos derivados de folhas cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM, na ausência de luz, por 240 dias (12,5 - 50 g L⁻¹); G) Calos derivados de folhas cultivadas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM, na presença de luz (10 - 30 g L⁻¹); H) Células em suspensão mantidas em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 μM, na presença de luz, por 20 dias (62,5 - 250 g L⁻¹).

Foi também avaliado o rendimento dos extratos obtidos a partir dos diferentes materiais vegetais (Figura 32). Extratos hidroalcoólicos de calos friáveis mantidos no escuro e de suspensões celulares obtidas na presença ou ausência de luz apresentaram os maiores rendimentos. Em contrapartida, extratos de calos mantidos no escuro por mais de 240 dias apresentaram rendimento três vezes inferior ao mesmo material com 120 dias de cultura. Não houve diferença no rendimento dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas *in vitro*, *in vivo* e aclimatizadas.

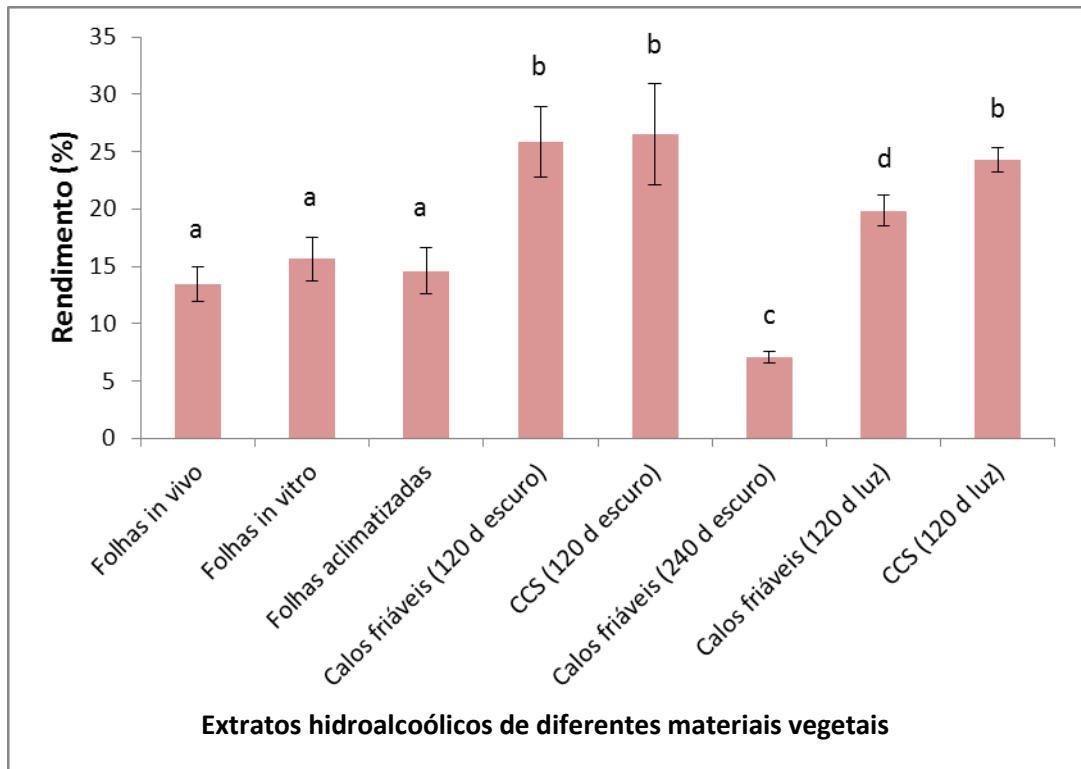


Figura 32 – Rendimento dos extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais vegetais de *P. alata*.

4 DISCUSSÃO

Diversos compostos bioativos já foram descritos nas espécies da família Passifloraceae, incluindo alcaloides, saponinas e polifenóis, sendo predominantes os flavonóides C-glicosídeos (OGA *et al.*, 1984; MORAES *et al.*, 1997; PETRY *et al.*, 2001). A espécie estudada neste trabalho, *P. alata*, é rica nesses compostos e possui ampla utilização medicinal relacionada às suas propriedades calmantes e antioxidantes (RUDNICKI *et al.*, 2007a, b). Embora já tenha sido descrita a presença de fenóis e o potencial antioxidante em plantas de *P. alata* mantidas em condições *in vivo* (RUDNICKI *et al.*, 2007b), não existem relatos da avaliação desse potencial em materiais vegetais obtidos através da cultura *in vitro*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de metodologias de cultura de tecidos para *P. alata* e a realização de ensaios para determinação do potencial antioxidante e conteúdo fenólico de materiais obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Para o estabelecimento de diferentes sistemas *in vitro* de *P. alata*, foram investigados, inicialmente, parâmetros que afetam a germinação. A germinação de sementes do gênero *Passiflora* é considerada baixa e heterogênea (AKAMINE *et al.*, 1972; LUNA, 1984; PEREIRA; DIAS, 2000). Dessa forma, vários autores descrevem a necessidade do uso de fitorreguladores para aumentar a velocidade e a porcentagem de germinação em espécies do gênero (FERREIRA, 1998; FERREIRA; FOGAÇA; MORO, 2001). Neste trabalho, sementes não submetidas a pré-tratamentos apresentaram baixa porcentagem de germinação (20%). Por outro lado, a embebição das sementes em GA₃ provocou a quebra da dormência tanto sob condições *in vitro* como *in vivo*, resultando em porcentagens de germinação de 60%. Resultados similares com este mesmo pré-tratamento em *P. alata* foram obtidos por outros autores (CONEGLIAN *et al.*, 2000; FERREIRA; FOGAÇA; MORO, 2001). Este comportamento está associado à ação das giberelinas como promotoras do processo germinativo, devido à sua ação estimulante sobre a síntese de proteínas específicas da germinação, tanto na quebra da dormência como no controle da hidrólise de reservas (SALISBURY; ROSS, 1991; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além do uso de fitorreguladores, o mecanismo de dormência em *Passiflora* está relacionado ao controle de entrada de água devido à dureza de seu tegumento, que requer tratamentos para a superação da dormência física, como a escarificação mecânica (MORLEY-BUNKER, 1980; WAGNER *et al.*, 2007). No entanto, segundo Gulliver & Heydecker (1973), quantidades excessivas de água podem reduzir a permeabilidade do tegumento ao oxigênio, resultando na inibição da germinação. Os resultados aqui obtidos demonstraram que a escarificação mecânica influenciou positivamente a germinação sob condições *in vitro*.

Resultados semelhantes para a superação da dormência foram alcançados com a escarificação mecânica em outras espécies, como *Bauhinia monandra* (ALVES *et al.*, 2000) e *Sterculia foetida* (SANTOS; MORAES; MATOS, 2004). No entanto, o efeito negativo da escarificação nas sementes germinadas *in vivo* pode ser atribuído à possibilidade de contaminação ou excesso de entrada de água.

Outro fator de grande importância sobre a germinação é a influência de diferentes comprimentos de onda, uma vez que as plantas podem exibir plasticidade fisiológica, morfológica e anatômica para diferentes espectros de luz (MORINI *et al.*, 2000; MULEO; MORINI, 2006; YEH; CHUNG, 2009). Nesse trabalho, plântulas cultivadas sob luz vermelha apresentaram maiores alturas, porém esta característica estava relacionada apenas ao alongamento do hipocótilo decorrente do processo de estiolamento das plantas. Dessa forma, como o objetivo do estudo na germinação era o fornecimento de plântulas para estabelecimento de culturas primárias, àquelas obtidas sob a luz branca foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos devido ao maior número de nós e folhas.

O estabelecimento de culturas primárias de *P. alata* a partir de plântulas derivadas da germinação *in vitro* foi inicialmente limitado por dificuldades no alongamento. Limitações no estabelecimento *in vitro* e alongamento em espécies de *Passiflora* são bem documentadas, e vários autores têm relatado a necessidade da utilização de suplementações ao meio de cultura (TREVISAN; MENDES, 2005; DORNELAS; VIEIRA, 1994 e HALL *et al.*, 2000). Dessa forma, com a finalidade de solucionar este problema, foram realizadas suplementações ao meio de cultura com água de coco e/ou caseína hidrolisada, já que a água de coco possui altos níveis de açúcar, vitaminas, sais minerais, aminoácidos, auxinas, citocininas e giberilinas (YONG *et al.* 2009) e a caseína hidrolisada é considerada importante fonte de nitrogênio (VIEIRA *et al.*, 2007). Foi observado que a suplementação com água de coco ao meio MSM ½ resultou no aumento das taxas de alongamento e enraizamento *in vitro*, assim como do número de nós e folhas. Resultados semelhantes foram descritos por Trevisan & Mendes (2005), Dornelas & Vieira (1994) e Hall *et al.* (2000) em brotos de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Por outro lado, a suplementação com caseína hidrolisada não beneficiou o desenvolvimento vegetativo de *P. alata*, além de estimular o aumento da indução de calogênese na base dos explantes.

Após a etapa de alongamento e enraizamento, plântulas de *P. alata* obtidas *in vitro* foram transferidas para condições *ex vitro* e, para isso, foram submetidas ao processo de aclimatização. Embora a aclimatização seja considerada uma etapa crítica para o processo de micropropagação, devido à possibilidade de contaminação, estresse hídrico, dificuldades na

absorção de nutrientes e à baixa taxa fotossintética, a alta percentagem de sobrevivência (86%) observada indica que a adaptação *ex vitro* foi bem sucedida, apesar da intensa perda de folhas nos primeiros dias após o transplante.

Após o estabelecimento das culturas primárias, segmentos caulinares e foliares foram utilizados como explantes visando à indução de calogênese. A formação de calos foi obtida em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA ou PIC, reguladores de crescimento bastante utilizados para esse fim (SAITO; NAKANO, 2002; MORI *et al.*, 2005; SERNER *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2011). O tipo de calo formado variou de acordo com o tipo de explante, regulador de crescimento e condição de iluminação. Segmentos caulinares induziram a formação de calos friáveis em culturas suplementadas com maiores concentrações de PIC e menores concentrações ANA. Por outro lado, segmentos foliares apresentaram calos com aspectos friáveis em todas as concentrações de PIC utilizadas, sendo alcançada uma maior produção de biomassa em meio suplementado com PIC a 28,9 μM , independente da presença de luz. No entanto, a indução e manutenção de massa calogênica apresentou maior eficiência em culturas mantidas no escuro. Essa resposta pode ser resultado da ausência de fotodegradação da auxina presente no meio de cultura (GEORGE, 2008). Além disso, para o estabelecimento das culturas de células em suspensão, foram utilizados calos friáveis derivados de segmentos foliares que apresentaram maior acúmulo de biomassa.

Materiais oriundos dos diferentes sistemas *in vitro* desenvolvidos nesse trabalho para *P. alata*, assim como plantas aclimatizadas e cultivadas sob condições *in vivo*, foram utilizados na preparação de extratos hidroalcoólicos para a avaliação do potencial antioxidante e determinação do conteúdo fenólico.

O interesse em antioxidantes naturais tem sido crescente nos últimos anos devido aos seus efeitos biológicos benéficos. Diversos estudos têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; NILSSON *et al.*, 2005; NANGEDRAN; SUNDRAN; SAMMAN, 2006). Muitos antioxidantes naturais são constituídos por substâncias fenólicas derivadas do metabolismo especial das plantas, com grande diversidade de estruturas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. São sintetizados através de duas rotas biogênicas, pela via do ácido chiquímico ou pela via acetato-polimalato, que determinam o padrão de substituição do composto fenólico resultante, sendo encontrado no estado livre ou na maior parte sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, que são solúveis em água ou em solventes orgânicos polares. Um dos grupos

fenólicos mais amplamente distribuído no reino vegetal é o dos flavonóides, que desempenham várias funções associadas à proteção contra raios ultravioleta, patógenos e atração de polinizadores. Essas propriedades biológicas além do papel fisiológico nas plantas possuem atividade farmacológica em potencial (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

Para extração de substâncias antioxidantes, diferentes variáveis podem ser controladas para facilitar o processo e conservar as propriedades das substâncias, sendo o rendimento da extração e a determinação do potencial antioxidante dependentes da otimização dessas condições (ANDREO; JORGE, 2006). Além disso, a avaliação do rendimento dos extratos é fundamental no processo de extração, pois a obtenção de produtos naturais enfrenta a dificuldade de se obter matéria prima em grande quantidade e qualidade. Neste trabalho, o rendimento dos extratos analisados foi influenciado por todos os parâmetros avaliados.

Embora o potencial farmacológico relacionado à atividade antioxidante em extratos hidroalcoólicos de folhas de *P. alata* já tenha sido confirmado em ensaios *in vitro* (RUDNICKI, 2007a) e *in vivo* (RUDNICKI *et al.*, 2007b), e associado à presença de polifenóis (RUDNICKI, 2007a, b), especialmente aos flavonoides C-glicosídeos, a análise do potencial antioxidante e sua relação com o conteúdo fenólico de extratos hidroalcoólicos de diferentes materiais de *P. alata* obtidos *in vitro* foi realizada pela primeira vez. O potencial antioxidante dos extratos hidroalcoólicos brutos foi avaliado pelo ensaio *in vitro* de determinação da captação do radical livre DPPH. Essa molécula tem por característica a cor violeta, caracterizada pela absorção a 515 nm. Na presença de antioxidantes, o DPPH assume sua forma reduzida, perdendo a cor violeta, que é monitorada pelo decréscimo da absorvância no comprimento de onda característico (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Um dos fatores que exerce grande influência na extração de substâncias antioxidantes é o tipo de solvente utilizado no processo de extração. Solventes orgânicos são freqüentemente utilizados, sendo os hidroalcoólicos os mais relatados para o gênero *Passiflora* (OGA *et al.* 1984; PETRY *et al.*, 2001; MORAES *et al.* 1997; CHABARIBERI *et al.*, 2009; ZERAIK; YARIWAKE, 2010). Neste trabalho, a redução do radical DPPH pelos extratos hidroalcoólicos de folhas mantidas *in vivo* mostrou-se mais eficiente em solvente com maior proporção de etanol, que resultou em um valor de CE_{50} 5,2 g L⁻¹. Esse potencial antioxidante mostrou-se superior ao descrito por Zeraik & Yariwake (2010) em extratos aquosos de polpas de frutos de *P. alata* (CE_{50} 61,09 g L⁻¹) e extratos aquosos de folhas de *P. edulis* (CE_{50} 128 g L⁻¹) (FERRERES *et al.*, 2007).

Além do tipo de solvente, o período de maceração também pode afetar consideravelmente a recuperação de substâncias antioxidantes, já que longos períodos de exposição do material vegetal ao solvente podem aumentar a possibilidade de oxidação de fenóis (SHAIDI; NACZK, 1995). Os resultados aqui obtidos indicam que a extração de substâncias antioxidantes pode ser realizada em 15 minutos, um período mais curto do que o observado anteriormente em *P. alata* (RUDNICKI, 2007a, b).

A otimização da extração de substâncias antioxidantes utilizando-se folhas de plantas mantidas *in vivo* serviu como base para análise do potencial antioxidante dos diferentes materiais obtidos *in vitro*. A produção e o acúmulo de substâncias antioxidantes já foram descritos em diversos sistemas *in vitro*, incluindo cultura de brotos (LIU *et al.*, 2004), raízes (KUMAR *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007), calos (CHEN *et al.*, 2004; TRAJTEMBERG; APOSTOLO; FERNANDEZ, 2006) e células em suspensão (VOGELSANG; SCHNEIDER; PERTERSEN, 2006). No entanto, a produção em culturas desorganizadas (calos e células em suspensão) pode ser menor que nos demais sistemas, uma vez que a desdiferenciação pode resultar na perda da capacidade de produção. Além disso, partes isoladas também podem deixar de sintetizar substâncias em relação a planta intacta devido ao desacoplamento da maquinaria enzimática (GEORGE, 2008). Em *Rubus chamaemorus*, a produção de polifenóis foi três vezes mais baixa em culturas de brotos e dez vezes mais baixa em culturas de calos em relação a plantas mantidas em condições naturais (THIEM; KRAWCZYK, 2003). Em *S. officinalis*, a produção de diterpenos antioxidantes foi somente observada em culturas de brotos, estando ausente em culturas de calos e células em suspensão (GRZEGORCZYK; MATKOWSKI; WYSOKINSKA, 2007).

Nas análises realizadas em extratos hidroalcoólicos de *P. alata*, os maiores valores de potencial antioxidante e conteúdo fenólico foram observados em folhas de plantas mantidas *in vivo* e de plantas aclimatizadas. Isso confirma a importância do desenvolvimento completo da planta em exposição ao ambiente natural para maior produção dessas substâncias, uma vez que fatores ambientais, como estresses bióticos e abióticos, e condições nutricionais podem influenciar na biossíntese dessas substâncias. Por outro lado, embora plantas *in vitro*, calos e suspensões celulares de *P. alata* também tenham sido capazes de sintetizar substâncias fenólicas, as diferenças entre essas culturas e plantas mantidas *in vivo* foram evidentes. Extratos de folhas de plantas *in vitro* apresentaram cerca da metade do potencial antioxidante observado em folhas de plantas *in vivo*, e calos e suspensões celulares tiveram potencial antioxidante inferiores às folhas da planta matriz. Resultados similares foram observados em *Crataegus monogyna*, onde antioxidantes fenólicos foram produzidos em cultura de calos e

células em suspensão em menor quantidade (RAKOTOARISON *et al.*, 1997). Kim *et al.* (2011) também observaram menor teor de compostos fenólicos em calos em comparação com folhas de *Stevia rebaudiana*. Contudo, com técnicas biotecnológicas baseada na cultura de tecidos vegetais permitem a modulação de fatores que podem influenciar a síntese de metabólitos, incluindo a manipulação dos componentes no meio de cultura e dos fatores ambientais como luz, temperatura, umidade e trocas gasosas, adição de fitorreguladores, seleção de linhagens produtoras de metabólitos, adição de precursores de vias metabólicas e elicitação, muitos trabalhos revelam a possibilidade da produção dessas substâncias numa quantidade similar ou superior a planta matriz (BAHORUN *et al.*, 2003; BERNABE-ANTONIO *et al.*, 2010; HUSSEIN *et al.*, 2010).

Neste trabalho, calos de *P. alata* mantidos na presença de luz apresentaram potencial antioxidante cerca de vinte e cinco vezes superior ao mesmo material mantido na ausência de luz. Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstram que a produção de polifenóis, especialmente da classe dos flavonoides é induzida pela luz (HIILS; SWAIN, 1959). Culturas de calos de *Psoralea corylifolia* mantidas na presença de luz apresentaram produção de isoflavonas superior a partes isoladas de plantas de campo (SHINDE; MALPATHAK; FULZELE., 2010). Da mesma forma, foi observado um aumento do potencial antioxidante em culturas de *Tecoma stans* na presença de luz (LÓPEZ-LAREDO *et al.*, 2009). Além disso, Antognoni *et al.* (2007) observaram um aumento na produção de flavonoides em calos de *Passiflora quadrangulares* por meio de elicitação com luz ultravioleta. Esses dados sugerem uma regulação das vias biossintéticas de produção de polifenóis pela luz, que controla a expressão de genes específicos envolvidos na produção desses metabólitos (LIU *et al.*, 2006). De acordo com Jacob & Malpathak (2004), culturas celulares mantidas sob iluminação podem enriquecer a fotossíntese gerando compostos intermediários não incluídos no meio de cultura, mas necessários para melhorar a produção de metabólitos.

Outro fator que exerce grande influência na produção de metabólitos especiais é o estado morfofisiológico do material vegetal (MANTELL; SMITH, 1983). Nesse trabalho, calos friáveis mantidos por longos períodos em cultura apresentaram um fenótipo variante, com uma pigmentação mais amarelada, associada a um potencial antioxidante muito superior ao mesmo material obtido em menor tempo de cultura. Essa característica pode ser útil para caracterização da heterogeneidade nas culturas celulares, visando à identificação de variantes clonais com maior potencial na síntese de metabólitos. Além disso, esses resultados confirmam que a manipulação de alguns fatores, como tempo de cultura e exposição à luz,

pode incrementar a produção dessas substâncias em culturas de tecidos e, portanto, permitir sua produção em larga escala.

Todos os extratos analisados nesse trabalho apresentaram eficiência na capacidade de sequestrar o radical DPPH. No entanto, além dos valores de CE_{50} , os extratos apresentaram diferenças na eficiência antiradicalar, por possuírem cinética da reação variável. A reação com o radical DPPH depende da conformação estrutural dos compostos fenólicos. Alguns compostos, como o guaiacol, reagem lentamente, enquanto que outros, como o ácido ascórbico, reagem mais rapidamente. Outros, ainda, apresentam reação intermediária, como o ácido rosmarínico (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998). Essas diferenças são resultado de um impedimento estérico, da presença e número de hidroxilas, ou pelas posições de glicosilações na molécula, as quais influem na solubilidade e propriedades físico-químicas dessas substâncias (BOBBIO; BOBBIO, 2001; WILMSEN; SPADA; SALVADOR, 2005). Além disso, a influência na eficiência antiradicalar pode ser relacionada à diferentes formas e associações de fenóis nos tecidos. Dessa forma, quando se avalia a atividade antioxidante de extratos de plantas, constituídos de uma variedade de compostos antioxidantes, torna-se imprescindível avaliar o comportamento da reação em vários intervalos de tempo para determinar a cinética adequada da reação (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI E SAURA-CALIXTO, 1998). Neste trabalho, substâncias antioxidantes dos diferentes materiais vegetais analisados apresentaram velocidade de reação lenta, sendo a melhor eficiência antiradicalar apresentada por extratos de folhas de plantas *in vivo*, obtidas após germinação ou aclimatizadas.

Considerando que várias substâncias, além dos polifenóis, possuem potencial antioxidante em extratos vegetais, incluindo algumas proteínas, vitaminas, alcaloides, cartenóides, betalainas e tocoferóis, o monitoramento quantitativo dos metabólitos torna-se pré-requisito para um bom desenvolvimento da sua produção. Para quantificação de compostos fenólicos totais, métodos espectrofotométricos são apropriados e amplamente empregados. A metodologia que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdico a óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, pela ação de fenóis presentes no extrato. Como os óxidos formados apresentam coloração azulada, é possível quantificá-los pela medida da absorvância da solução na região do visível (765nm). Através de uma curva de calibração de ácido gálico, é possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, através da absorvância obtida, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Neste trabalho, o maior valor de conteúdo fenólico foi obtido em de

extratos folhas *in vivo* ($34,86 \pm 0,004$ mg EAG/g). Esses valores são altos em comparação aos encontrados nas polpas dos frutos de *Passiflora*, que apresentaram valores de $20,0 \pm 2,6$ mg EAG/100g (KUSKOSKI *et al.*, 2006) e 61 ± 32 mg EAG/100g (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

Os resultados da determinação do conteúdo fenólico deste trabalho demonstraram um aumento no conteúdo fenólico em extratos com maior atividade antioxidante em materiais oriundos de técnicas de cultura de tecidos e plantas *in vivo* de *P. alata*. Quando se analisa a relação entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, percebe-se diferentes resultados na literatura. Muitos autores encontram uma forte correlação (ALÉN-RUIZ *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012), enquanto outros relatam uma correlação fraca (ARNOUS; MAKRIS; KEFALAS, 2001). A correlação positiva encontrada neste trabalho está de acordo com os relatados por Rudnick *et al.* (2007a), em extratos hidroalcoólicos de folhas de campo de *P. alata* e *P. edulis*. Esses dados indicam que a quantidade de compostos fenólicos nos extratos de *P. alata* é determinante da atividade antirradicalar, indicando assim, que os compostos fenólicos contribuem de forma majoritária para o potencial antioxidante desses extratos.

As estratégias de cultura *in vitro* descritas neste trabalho permitiram a obtenção de plantas *in vitro* e a aclimatização eficiente do material obtido. Foram também estabelecidas as condições para indução de calogênese e cultura de células em suspensão dessa espécie. Além disso, foram determinadas condições eficientes para extração de substâncias antioxidantes a partir de plantas *in vivo* que se mostraram eficazes nas análises do potencial antioxidante dos diferentes materiais obtidos *in vitro*. Adicionalmente, as análises da determinação do conteúdo fenólico constatarem uma relação positiva com o potencial antioxidante. Dessa forma, os sistemas de cultura de tecidos de *P. alata* aqui estabelecidos representam uma alternativa para a multiplicação de plantas e produção de substâncias fenólicas com ação antioxidante.

5 CONCLUSÕES

- A embebição das sementes de *P.alata* em GA₃ foi fundamental para a quebra da dormência tanto sob condições *in vitro* como *in vivo*. Além disso, a escarificação mecânica é aconselhável apenas para germinação *in vitro*.
- A adição de água de coco ao meio de cultura favoreceu o alongamento e o enraizamento dos brotos derivados das culturas primárias.
- Foi estabelecido um protocolo eficiente para calogênese, a partir de explantes foliares, em meio MSM suplementado com PIC a 28,9 µM, que possibilitou o estabelecimento de culturas de células em suspensão.
- A extração de substâncias antioxidantes a partir de folhas de plantas *in vivo* de *P.alata* foi mais eficiente quando realizada em uma proporção etanol:água de 80%, por um período de 15 minutos, com 10 mL de solvente para cada grama de material seco.
- Os materiais oriundos dos diferentes sistemas de cultura *in vitro* de *P.alata* apresentaram potencial antioxidante e capacidade de produzir substâncias fenólicas em diferentes proporções, sendo que a luz e o tempo de cultura foram os fatores mais importantes para a produção de fenóis. Além disso, plantas aclimatizadas apresentaram potencial antioxidante similar ao observado em plantas mantidas *in vivo*.
- A avaliação do potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de *P.alata*, a partir de diferentes sistemas de cultura, apresentou diferença na eficiência antirradicalar, que variou diretamente em função da concentração de fenóis totais nos extratos.

REFERÊNCIAS

- AHLOOWALIA B.S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR V.A.; SAVANGIKAR C. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. **Plant Tissue Culture**. In: International Atomic Energy Agency, eds. Vienna, Áustria, p.3-10, 2002.
- AKAMINE, E.K.; ARAGALI, M.; BEUMONT, J.H.; BOWERS, F.A.I.; HAMILTON, R.A.; NISHIDA, T.; SHERMAN, G.D.; SHOJI, K.; STOREY, W.B. Passion fruit culture in Hawaii. Manoa: University of Hawaii, Cooperative Extension Service, 1972. 23p. (Circ., 345).
- ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, v.113, p. 53-60, 2009.
- ALVES, M. C. S.; DORNELAS, C.S.M.; BRUNO, R.L.A.; ANDRADE, L.A.; ALVES, E.U. Superação da dormência em sementes de *Bauhinia monandra* Kurz e *B. unguolata* L. - Caesalpinioideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 139-144, 2000.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, n.2, p.319-336, 2006.
- ANTHONY, P.; OTONY, W.; POWER J.B.; LOWE K.C.; DAVEY M.R. Protoplasts isolation, culture, and plant regeneration from *Passiflora*. **Methods in Molecular Biology**, v.111, p.169-181, 1999.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v.78, p.345-352, 2007.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B., VIEIRA, M. L. C., DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.2007-2013, 1999.
- ARNOUS, A., MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, P.5736–5742, 2001.
- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, BASLAN, E.;YUKSEL, M.U. *Passiflora incarnata* Linneaus as an anxiolytic before spinal anesthesia. **Journal of Anesthesia**, v.26, n.1, p. 39-44, 2012.
- BAHORUN, T.; AUMJAUD, E.; RAMPHUL, H.; RYCHA, M.; LUXIMON-RAMMA, A.; TROTIN, F.; ARUOMA, A.L.; Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. **Nahrung**, v.47, n.3, p.191-198, 2003.
- BARBALHO, S.M; DAMASCENI, D.C.; SPADA, A.P.M; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A.C.; GUIGUER, E.L.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA, M.; MENDES, C.G. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic wistar rat offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.12, p.1490-1495, 2011.

- BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON, JR, C.L.; KAPPEL, V.D.; MARTINS, M.R.; GAVIOLI, E.C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F.H. The Aqueous Extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Reduce Anxiety-Related Behaviors Without Affecting Memory Process in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 282–288, 2008.
- BARBOSA, S.M; DAMASCENI, D.C.; SPADA, A.P.M; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A.C.; GUIGUER, 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.
- BECERRA, D.C.; FORERO, A.P.; GÓNGORA, G.A. Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.97-90, 2004.
- BENICÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, A.P.; FRODE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v.104, p.1097-1105, 2007.
- BERNABE-ANTONIO, A.; ESTRADA-ZUNIKA, M.E.; BUENDIA-GONZALES, L.; REYES-CHILPA, R.; CRUZ-SOZA, F. Production of anti-HIV-1 calanolides in a callus culture of *Calophyllum brasiliense* (Cambes). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, n.1, p.33-40, 2010.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.2, p. 355-356, 2003.
- BENNATI, E. Quantitative determination of harman and harmine in *P. incarnata* extract. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.110, p.664–669, 1971.
- BIRK, C.D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, p. 1–7, 2005.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Química do Processamento de Alimentos. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001.
- BOEIRA, J.M.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L.A.; BARBOSA, P.R.; GONZALEZ, F.H.D.; CORREA, A.M.R.; DRIEMEIERE, D.; DALL’ALBA, M.P.; PEDROSO, A.P.; GOSMANN, G.; SILVA, J.; RATES, S.M.K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis Passifloraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.526–532, 2010.
- 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.104-6, 1996.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

CARVALHO, J.C.T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS. p.525-527, 2010.

CAZARIN, C.B.B.; COLOMEU, T.C.; MARQUES, A.Y.C.; DA SILVA, J.K.; VILELLA, C.A.; ZOLLNER, R.D.; MAROSTICA, M.R. Antioxidant properties of dietary fiber from *Passiflora edulis*. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.58, n.3, p.312, 2011.

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

CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 4, p.860-864, 2009.

CHEN, S.A.; ZHAO, B.; WANG, X.; YUAN, X.; WANG Y. Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare earth elements. **Biotechnology Letters**, v.26, p.27-30, 2004.

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

DA SILVA, C.V.; DE OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; DA SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.C.; VICINNI, L.F.; DE OLIVEIRA E.J.; 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**, v.107, p.407-416, 2011.

DE PARIS, F; PETRY, R.D. REGINATTO, F.H. GOSMANN, G. QUEVEDO, J. SALGUEIRO, J.B. KAPCZINSKI, F.; Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sins. **Acta farmacêutica Bonarense**, v.21, n.1, p.5-8, 2002.

DESAI, H.V.; MEHTA, A.R. Changes in polyamine levels during soot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology**, v.119, p.45-53, 1985.

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

DIAS, M.V.; FIGUEIREDO, L.P.; VALENTE, W.A.; FERRUA, F.Q.; PEREIRA, P.A.P.; PEREIRA, A.G.T.; BORGES, S.V.; CLEMENTE, P.R. Study of the processing variables from the passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) pell preserve. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.31, n.1, p.65-71, 2011.

DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.211-217, 1994.

- DOYAMA, J.T.; RODRIGUESA, H.G.; NOVELLIA, CEREDAB, E; VILEGAS, 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.
- DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, 23-27, 1991.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. *In vitro* control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.33, n.3, p.209-212, 1997a.
- FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, n.7, p.1276-1277, 1997b.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 3 ed. Andrei; São Paulo, 1977.
- FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; MACHADO, S.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.37-44, 2007.
- FERREIRA, G. Estudo da embebição e do efeito de fitoreguladores na germinação de sementes de Passifloraceas. Tese de Doutorado em Horticultura, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 144f, 1998.
- FERREIRA G.; FOGAÇA, L.A.; MORO E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.160-163, 2001.
- FERREIRA, G.; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, J.D.; DIAS, G.B.; DETONI, A.M.; TESSER, S.M.; ANTUNES, A.M. Efeito de arilo na germinação de sementes de *passiflora alata* curtis em diferentes substratos e submetidas a tratamentos com giberelina, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.277-280, 2005.
- FERRERES, F.; SOUZA, 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 and Food Chemistry**, v.55, p.10187-10193, 2007.
- FIGUEIREDO, M.A.; PAIVA, R.; SOUZA, A.C.; PORTO, J.M.P.; NOGUEIRA, G.F.; SOARES, F.P. Indução *in vitro* de Calos em Duas Espécies de Maracujazeiro Nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.288-290, 2007.
- 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, n.11, p.2031-2036, 2008.
- FRANÇA, S.C. Abordagens Biotecnológicas para a obtenção de substâncias bioativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTS, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, 1 st, UFRGS, 123p., 2010.

GARCIA, R.; 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 Organ Culture**, v.106, p.47–54, 2011.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – Background. In: ____; HALL, M.A.; DE KLERK, G.-J. 3rd ED. Springer, The Netherlands, 2008. v. 1.

GESZTESI L.J.; DA LUZ, P.M. Procedé pour la preparation d'un extrait vegetal de *Passiflora alata* et utilization dudit extrait dans des compositions cosmetiques et pharmaceutiques. Patente FR2920310. 03 de agosto de 2007.

GRZEGORCZYK, I.; MATKOWSKI, A.; WYSOKINSKA, H. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v.104, p.536–41, 2007.

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

GULLIVER, R.L.; HEYDECKER, W. Establishment of seedling in a changeable environment. In: Seed Ecology, ed. W. Heydecker, Butterworth, London p.433-62, 1973.

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

GUZZO, F.; CEOLDO, S.; ANDREETTA, F.; LEVI, M. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, 2004.

HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. Efficient organogenesis of an Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. **Australian Journal Botany**, v.48, p.673-680, 2000.

HILLIS, W.E.; SWAIN, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The analysis of tissues of the Victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.135-144, 1959.

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

HOLLAND, K.W.; BALOTA, M.; EIGEL, W.N.; MALLIKARJUNAN, P.; TANKO, J.M.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S.F. Chromatography and Total Phenolics Content of Peanut Root Extracts. **Journal of Food Science**, v.76, n.3, 2011.

HUSSEIN, E.A.; TAJ-ELDEEN, A.M.; AL-ZUBAIRI, A.S.; ELHAKIMI, A.S.; AL-DUBAIE, A.R. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant and antibacterial activities of callus from *Brassica nigra* L. hypocotyl explants. **International Journal of Pharmacology**, v.6, n.4, p.464-471, 2010.

INSTITUTO BRASIELIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção agrícola Municipal 2009. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Maracuja_Brasil_2009.pdf. Acesso em: 10 fev. 2011.

- ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v.99, p. 395-400, 2004.
- JACOB, A; MALPATHAK, N. Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke - a new route to *in vitro* solasodine production. **Current Science**, v.87, n.10, p.1442-1447, 2004
- JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, L.P.; SHARMA, D.R. Maracujá-doce: Tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Doenças do maracujazeiro-doce. Editora cinco continentes, p.113-149, 2005.
- KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passionfruit). **Annals of Botany**, v.48, p.673-680, 1990.
- 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. **Science Horticulturae**, v.100, p.1-4, 2004.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; HAWAI, F.; KANAMORI M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of passionfruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal Plant physiology**, v.174, p.281-284, 1995.
- KIM, S.; YANG, M.; LEE, O.; KANG, S. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. **Food Science and Technology**, v.44, p.1328-1332, 2011.
- KIM, Y.; HYUN, S.H.; PARK, H. E.; CHOI, H.K. Metabolic profiling, free-radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Lemna minor* whole plants cultivated in various concentrations of proline and sucrose. **Process Biochemistry**, v.47, p.62-68, 2012.
- KRIS-ETHERTON, .P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; KANG, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal Medicine**, v.113, n. 9, p.71-88, 2002.
- KUMAR, V.; MURTHY, K.N.; BHAMID, S.; SUDHA, C.G.; RAVISHANKAR, G.A. Genetically modified hairy roots of *Withania somnifera* Dunal: a potent source of rejuvenating principles. **Rejuvenation Research**, v.8, p.37-45, 2005.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.
- LEE, S.Y.; CHO, S.I.; PARK, M.H.; KIM, Y.K.; CHOI, J.E.; PARK, S.U. Growth and rutin production in hairy root cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.7, p.239-46, 2007.
- LEONEL, S.; PEDROSO, C.J. Produção de mudas de maracujazeiro-doce com o uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, p.107-109, 2005.
- LIU, C.Z.; MURCH, S.J.; EL-DEMERDASH, M.; SAXENA, P.K. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. **Journal Biotechnology**, v.110, p.63-71, 2004.

LIU, Z.; QI, J.L.; CHEN, L.; MING, S.; WANG, X.; PANG, Y. Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultures *Onosma paniculatum* cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.38-48, 2006.

LOHDEFINK, V.J., KATING, H. Zur frage des vorkommens von harmanalkaloiden in *Passiflora* arten. **Planta Medica**, v.25, p.101-104, 1974.

LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* Shoot Regeneration from Roots and Leaf Discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.2, p.239-247, 2007.

LÓPEZ-LAREDO, A.R.; RAMÍREZ-FLORES, F.D.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G.; TREJO-TAPIA, G. Comparison of metabolite levels in callus of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. cultured in photoperiod and darkness. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.45, p.550-558, 2009.

LORENCINI, M; HURTADO, S.P; MOREIRA, P.L; MARTINELLI, M; DELARCINA, S; SA-ROCHA, V.M; GESZTESI, J. Flavonoids-rich *Passiflora alata* extract is effective to reduce skin micro-inflammation process in aging. **Journal of investigative Dermatology**, v.128, n.1, p.S42-S42, 2008.

LUNA, J.V.U. **Instruções para a cultura do maracujá**. Salvador: EPABA, p.1-25. (Circular Técnica, 7), 1984.

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.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to Cowpea aphid-born mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, v.66, p.414-418, 2009.

MALACRIDA, C.R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, n.1, p. 127-134, 2012.

MANTELL, S.H.; SMITH, H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. In: *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1983.

MATSUI, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMEI, M.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T.; KATAGATA, Y.; ITO, T. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.11112-11118, 2010.

- MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.2, p.281-288, 2007.
- MONTEIRO, A.C.B; 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 passionfruit (*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.
- MOREIRA, P.; JUNIOR, S.D.; LORENCINI, M.; GESZTESI, J.L.; ESTEVES, S.S.; FERRARI, C.R.; MANFIO, G.P.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory evidence of a standardized *Passiflora alata* dry extract. **Planta Medica**, v.77, n.12, p.1415, 2011.
- MORI, S.; ADACHI, Y.; HORIMOTO, S.; SUZUKI, S.; NAKANO, M. Callus formation and plant regeneration in various *Lilium* species and cultivars. **In vitro Cell Development Biology Plant**, v.41, p.783-788, 2005.
- MORINI, S., D'ONOFRIO, C., BELLOCCHI, G., FISICHELLA, M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.63, p.47–55, 2000.
- MORLEY-BUNKER, M.J.S. Seed coat dormancy in *Passiflora* species. **Annual Journal**, v.8, p.72-84, 1980.
- MOURAD-AGHA, N.; DEXHEIMER, J. Étude ultrastructurale de la différenciation des éléments conducteurs dans une culture de tissu de *Passiflora quadrangularis* L. I. Cals cultivés à l'obscurité. **Cytologia**, v.44, p.615-631, 1979.
- MULEO R.; MORINI S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype *in vitro* culture. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.364-370, 2006.
- MULLER, S.D., VASCONCELOS, S.B., COELHO, M., BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399–403, 2005.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAYAMA, F. Cultivo in vitro de tejidos de *Passiflora caerulea*. Revista de la Facultad de Agronomía, **La Plata**, v.42, n.1, p.63-74, 1966.
- NANGEDRAN, B., SUNDRAN, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.
- NILSSON, J.; PILLAI, D.; ONNING, G.; PERSSON, C.; NILSSON, A.; AKESSON, B. Comparasion of the 2,2' azinobis-3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruits and vegetables. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, n.3, p.239-246, 2005.

OGA, S.; DE FREITAS, P.C.; GOMES DA SILVA, A.C.; HANADA, S. Pharmacological trial of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Médica**, v.50, p.303-306, 1984.

OSIPI, E.A.F.; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, 2005.

OTAHOLA, V. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) a partir del cultivo *in vitro* de discos de hojas. *Biagro*, v.12, n.3, p.71-74, 2000.

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

PARAFITT, K. **Martindale: The complete drug reference**. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, 2315p, 1999.

PEREIRA, K.J.C.; DIAS, D.C.F.S. Germinação e vigor de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) submetidas a diferentes métodos de remoção da mucilagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, p.288-291, 2000.

PEREIRA, C. A., YARIWAKE, J. H., LANCAS, F. M., WAUTERS, J. N., TITS, M., & ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v.15, p.241–248, 2004.

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

PINTO, A.P.C.; MONTEIRO-HARA, A.C.B. DE A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In vitro cellular and Developmental Biology-Plant**, Gaithersburg, v.46, p.28-33, 2010.

____. Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* CURTIS) para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic vírus*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Centro de energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2010.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÉGO, M.M.; 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**, v.107, p.521–530, 2011.

POETHKE, V.W., SCHWARZ, C., GERLACH, H. Substances of *Passiflora incarnata* 1. (Constituents of *Passiflora bryonioides*). **Alkaloids Planta Medica**. v.18, p.303–314, 1970.

PROVENSI, G.; NOËL, F.; LOPES, D.V.S.; FENNER, R.; BETTI, A.H.; COSTA, F.; MORAIS, E.C.; GOSMANN, G.; RATES, S.M.K. Participation of GABA-benzodiazepine Receptor Complex in the Anxiolytic Effect of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.6, p.845-51, 2008.

RAKOTOARISON, D.A.; GRESSIER, B; TROTIN, F; BRUNET, C; DINE, T.; LUYCKX, M.; VASSEUR, J.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C.; PINKAS, M. Antioxidant Activities of polyphenolic extract from flowers, *in vitro* callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*. **Pharmazie**, v.52, n.1, p.60-64, 1997.

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

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

____; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 195-197, 2004.

____; 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, p. 348-351, 2006.

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

RIBAS, A.F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R.A. Mistura vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.237-241, 2002.

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

RODRIGUEZ, M.V.; SEVERÍN, C.R.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, M.A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, O.A.; GATTUSO, S.J. Cultivo *in vitro* de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. Actas de Horticultura nº 48. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 2007.

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**, v.108, p.91–99, 2012.

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

____; SILVEIRA, M.M.; PEREIRA, T.V.; OLIVEIRA, M.R.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.656-661, 2007b.

- SALGADO, J.M.; BOMBARDE, T.A.D; MANSI, D.N.; PIEDADE, S.M.S.; MELETTI, L.M.M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30 n.3, 2010.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.
- SAITO, H.; NAKANO, M. Plant regeneration from suspension cultures of *Hosta sieboldiana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, n.1, p.23-28, 2002.
- SAMPATH, C.; HOLBIK, M.; KRENN, L.; BUTTERWECK, V. Anxiolytic effects of fraction obtained from *Passiflora incarnate* L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, v.25, n.6, p.789-795, 2011.
- 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, p.270-276, 1998.
- SANTOS, T.O.; MORAIS, T.G.O.; MATOS, V.P. Escarificação mecânica em sementes de chichá (*Sterculia foetida* L.). **Revista Árvore**, v.28, n.1, p.1-6, 2004.
- SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.8, p.600-603, 2011.
- SATHISH, R.; SAHU, A.; NATARAJAN, K. Antiulcer and antioxidant activity of ethanolic extract of *Passiflora foetida*. **Indian Journal**, v.43, n.3, p.336-339, 2011.
- SERNER, O.; CAN, E.; ARSLAN, M.; CELIKTAS, N. Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). **Biotechnology & Biotechnological**, v.22, n.4, p.915-920, 2008.
- SHAIKI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p.281-319.
- SHINDE, A.N.; MALPATHAK, N.; FULZELE, D.P. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures. **Food Chemistry**, v.118, p.128-132, 2010.
- SILVA.M.L.; PINTO, D.L.P.; GUERRA, .P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.99, p.47-54, 2009.
- SILVA, D.C.; FREITAS, A.L.P.; BARROS, F.C.N.; LINS, K.O.A.L.; ALVES, A.P.N.N.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, I.S.T.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. FEITOSA, J.P.A.; MACIEL, J.S.; PAULA, R.C.M. Polyssacharide isolated from *Passiflora edulis*: characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p. 139-145, 2012.
- SILVEIRA, F; ROSSI, S; FERNANDEZ, C; GOSMANN, G; SCHENKEL, E.; FERREIRA, F. Alum-type adjuvant of non- haemolytic saponins purified from Ilex and *Passiflora* spp. **Phytotherapy Research**, v.25, n.12, p.1783-1788, 2011.

SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R.K. Dual protective effects of determination of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, n.1, p.273–279, 2012.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SLOMP, H.; SENISKI, G.; DA CUNHA, C.; AUDI, E.A.; ANDREATINI, R. The Combination of *Passiflora alata* and *Valeriana officinalis* on Memory Tasks in Mice: Comparison with Diazepam. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.6, p.1343-1350, 2010.

SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.1, p.11-20, 1997.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre; Artmed, 135 p. 2004.

TALCOTT, S.T.; PERCIVAL, S.S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.935-941, 2003.

THIEM, B.; KRAWCZYK, A. Ellagic acid in *in vitro* cultures of *Rubus chamaemorus* L. **Herba Polonica**, v.49, p.202-9, 2003.

TRAJTEMBERG, S.P.; APOSTOLO, N.M.; FERNADEZ, G. Calluses of *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* cardoon (Asteraceae): determination of cynarine and chlorogenic acid by automated high-performance capillary electrophoresis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, p.534-537, 2006.

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in Passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v.62, p.346-350, 2005.

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

ULMER T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora passionflowers of the world**. Timber Press, Portland Timber Press, p.430, 2004.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T.J. C-glucosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products**, v.45, p.783, 1982.

VARGAS, A.J.; GEREMIAS, D.S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P.E.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v.78, n.2, p.112-119, 2007.

- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidante capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, p.816-823, 2008.
- VASCONCELLOS, M.A.S.; CEREDA, E.; ANDRADE, J.M.B.; FILHO, J.U.T.B. Desenvolvimento de frutos de maracujazeiro “Doce” (*Passiflora alata* Dryand), nas condições de Botucatu – SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p.153-158, 1993.
- VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.181-187, 2002.
- VIEIRA, J.G.Z.; YAMAKAMI, J.K.; AGUIAR, R.S.; UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T. Influence of hydrolyzed casein on the *Oncidium baueri* (Orchidaceae) *in vitro* cultivation. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 207-212, 2007.
- VILELLA, C.A.; COLOMEU, T.C.; CAZARIN, C.B.B.; MAROSTICA, MR.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, RD. Antihyperglycemic activity of *Passiflora alata* of diabetes in NOD-mice (Non-Obese Diabetic). **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.58, n.3, p.362-363, 2011.
- VOGELSANG, K.; SCHNEIDER, B.; PETERSEN, M. Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3-O-beta-D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. **Planta**, v.223, p.369-73, 2006.
- WAGNER, J.A.; NEGREIROS, J.R.S.; ALEXANDRE, R.S.; PIMENTEL, L.D.; BRUCKNER, C.H. Efeito do pH da água na embebição e do trincamento das sementes de maracujazeiro amarelo na germinação e desenvolvimento inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1014-1019, 2007.
- WILMSEN, P.K.; SPADA, D.S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid Hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.12, p. 4754-4761, 2005.
- WONDRACEK, D.C. Influência da saponificação na determinação de carotenoides em maracujás do cerrado. **Química Nova**, v.35, n.1, p.180-184, 2012.
- 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, p.853–8, 2006.
- YEH, N., CHUNG, J.P. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.13, p.2175–2180, 2009.
- YONG, J.W.H.; GE, L.; NG, Y.F.; TAN, S.N. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Water Molecules**, v.14, p. 5144-5164, 2009.
- 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.
- ____; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86–91, 2010.
- ____; ERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J.N.; TITS, M.; YARIWAKE, J.H.; ANGENOT L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit

(*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts of stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assay. **Food Chemistry**, v. 128, n.2, p.259–265, 2011.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.Y.; TEHRANI, P.M.; ULREICH, J.B.; WATSON, R.R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneous hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v.27, p.408-416, 2007.

ZUCOLOTTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; DUQUEB, C.; SCHENKELA, E.P. Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v.23, p.232–239, 2012.