



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariela Justiniano Simão

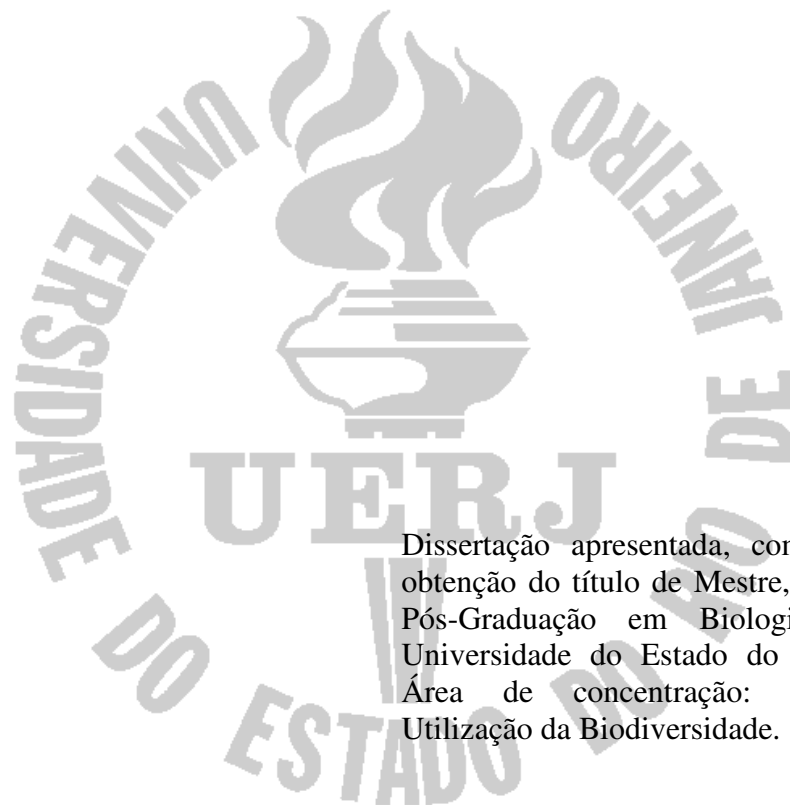
Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* Mast.

Rio de Janeiro/RJ

2015

Mariela Justiniano Simão

Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* Mast.



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 Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

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

Rio de Janeiro/RJ

2015

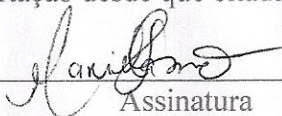
CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S588 Simão, Mariela Justiniano
Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da
atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* / Mariela Justiniano Simão. - 2015.
96 f. ; il.
Orientação: Georgia Pacheco Peters de Almeida.
Coorientação: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Passiflora - Teses. 2. Maracujá -- Teses. 3. Plantas - Propagação-in-
vitro - Teses. I. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. II. Oliveira, Elisabet
Atalla Mansur de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto
de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 634.776.3

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


Assinatura

31/03/2015
Data

Mariela Justiniano Simão

Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* Mast.

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.

Orientadora:

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

Banca examinadora:

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

Prof.^a Dra. Nina Claudia Barboza da Silva
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof. Dr. Davyson Moreira
Farmanguinhos - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
dedico.

AGRADECIMENTOS

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

À minha tia Zezé, por ter me abrigado com todo o carinho durante uma parte deste ano, para que eu pudesse concluir meu trabalho.

À Profa. Dra. Georgia Pacheco, pela orientação, disponibilidade, incentivo, apoio e acima de tudo, pela grande amizade e paciência durante estes dois últimos anos. Obrigada por ter acreditado em mim e me ajudado a ser melhor.

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

Ao farmacêutico Eduardo Fonseca, por ter tido enormes boa vontade e paciência para ajudar e responder às minhas intermináveis perguntas sobre as análises fitoquímicas deste trabalho.

À Profa. Dra. Mônica Marques, Coordenadora da Central Analítica Fernanda Coutinho, do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por disponibilizar os equipamentos para a realização das análises de espectrometria de massas.

Ao prof. Davyson, pelos conselhos, discussões e direcionamentos para as análises fitoquímicas deste trabalho.

À Profa. Dra. Rachel Gagliardi, pelas oportunidades, confiança, conversas e conselhos.

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

À Dani e Thiago, por terem me acolhido nos primeiros dias de laboratório, me ensinando muitas coisas. Em especial, agradeço pelas duas espécies que trabalho hoje.

Às estagiárias do grupo *Passiflora*, Beatriz, Marina, Lais e Rafaela, pela imensa ajuda com os cuidados das nossas “filhotas” e com os experimentos intermináveis.

Aos amigos do Labmit, Marcela, Isabela, Ana, Bianka, Jamine, Raphaela, Nathalia Falsia, Mariana Pimenta, Gabriel, Nathalia Miguel, Aline, Camila, Adriana, Thayane e Gilson, por todo o apoio e companhia nas longas horas de trabalho, tornando tudo mais agradável e divertido.

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia Vegetal, pelo convívio agradável.

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

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

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

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

Apenas a fênix sobe e não desce. E tudo muda. Mas nada realmente se perde.

Neil Gaiman

RESUMO

SIMÃO, Mariela Justiniano. **Estabelecimento de culturas de raízes e avaliação fitoquímica e da atividade antioxidante de *Passiflora pohlii* Mast.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Passiflora pohlii Mast., conhecida como maracujá-do-campo ou maracujazinho, é uma espécie nativa do Brasil que apresenta características de interesse agrônômico, principalmente em relação à tolerância a patógenos do solo pertencentes ao gênero *Phytophthora* sp, que provocam grandes prejuízos à cultura de maracujá. Embora ainda existam poucos trabalhos sobre esta espécie, estudos recentes com espécies do gênero descreveram atividades biológicas e farmacológicas em extratos de diferentes órgãos, incluindo folhas e raízes. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de culturas de raízes adventícias a partir de segmentos caulinares e radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e a avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de diferentes materiais obtidos *in vitro*, em comparação com plantas mantidas *in vivo*. Foram testados diferentes sistemas de cultura, além de tipos e concentrações de auxinas para a indução de raízes adventícias *in vitro* a partir de segmentos caulinares e radiculares. As culturas foram mantidas à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, na presença ou ausência de luz. As respostas obtidas variaram de acordo com o tipo de explante utilizado. Segmentos internodais apresentaram a melhor taxa de indução de rizogênese em meio solidificado com ágar e suplementado com ANA a $2,7\ \mu\text{M}$, na ausência de luz, enquanto que segmentos radiculares tiveram maior taxa de proliferação em meio líquido sob agitação, suplementado com AIA a $2,85\ \mu\text{M}$, na ausência de luz. Os materiais botânicos produzidos *in vitro*, incluindo plantas completas e raízes adventícias obtidas a partir de segmentos internodais e radiculares, assim como plantas obtidas *in vivo*, foram utilizados para a produção de extratos etanólicos para a avaliação do perfil fitoquímico e da atividade antioxidante. As análises por CCD e CLAE-UV indicaram a presença de flavonoides e saponinas nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*, enquanto que os extratos de raízes apresentaram apenas saponinas. Os extratos de folhas foram ainda submetidos à análise por CLAE-UV-IES-EM visando à identificação da massa molecular das substâncias encontradas. Foram identificados dois flavonoides, possivelmente isômeros, com massas moleculares de 607,2, nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*. O potencial antioxidante dos diferentes materiais foi determinado pelos ensaios de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila e CCD-DPPH. As maiores atividades antioxidantes foram observadas nos extratos de raízes primárias e secundárias excisadas de plantas mantidas *in vivo*. As estratégias de cultura de raízes *in vitro* descritas neste trabalho foram aplicadas com sucesso para *P. pohlii*. Além disso, a caracterização do perfil fitoquímico do material obtido *in vitro* e de plantas mantidas *in vivo*, assim como do seu potencial farmacológico, foi realizada pela primeira vez para a espécie.

Palavras-chave: Maracujá. Auxinas. Cromatografia. Antioxidante. Flavonoides. Saponinas.

ABSTRACT

SIMÃO, Mariela Justiniano. **Establishment of adventitious root cultures and phytochemical and antioxidant potential of *Passiflora pohlii* Mast.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Passiflora pohlii Mast., known as maracujá-do-campo or maracujazinho, is a wild species native to Brazil, with a potential agronomic interest, especially regarding to its tolerance to soil-borne pathogens from genus *Phytophthora* sp, which cause great damages to the passion fruit cultures. Although there is little work on this species, recent studies with other species of the genus described biological and pharmacological activities in extracts of different organs, including leaves and roots. The goal of this work was the establishment of adventitious roots from stem and root segments excised from *in vitro*-grown plants of *P. pohlii*, and the phytochemical evaluation and antioxidant potential of the extracts obtained from different *in vitro* materials, in comparison with *in vivo*-grown plants. Different culture systems, types and concentrations of auxins were evaluated for the induction of *in vitro* adventitious roots from stem and root segments. Cultures were maintained at 25 ± 2 °C, in the presence or absence of light. *In vitro* responses varied according to the type of explant. Internodal segments showed the best rhizogenesis induction on solidified medium supplemented with 2.7 μ M NAA, in the absence of light, whereas root segments showed the best proliferation rate on liquid medium, supplemented with 2.85 μ MIAA, in the dark. The *in vitro* plant materials, including whole plants and adventitious roots obtained from internodal and root segments, as well as *in vivo*-grown plants, were used for the production of ethanolic extracts for phytochemical evaluation and of the antioxidant potential. TLC and HPLC analysis indicated the presence of flavonoids and saponins in extracts of leaves from *in vivo* and *in vitro*-grown plants, whereas root extracts showed only saponins. Extracts from leaves were also subjected to HPLC-UV-ESI-MS analysis aiming at the identification of the molecular mass of the compounds. Two flavonoids, possibly isomers, were identified, with molecular masses of 607.2, in extracts from leaves of *in vivo* and *in vitro*-grown plants. The antioxidant potential of the different materials was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and TLC-DPPH assays. The highest antioxidant activities were observed in extracts from primary and secondary roots of *in vivo*-grown plants. The *in vitro* root culture strategies described in this work were successfully applied to *P. pohlii*. In addition, the characterization of the phytochemical profile of the *in vitro* and *in vivo* materials, as well as its pharmacological potential, were reported for the first time for this species.

Keywords: Passionfruit. Auxins. Chromatography. Antioxidant. Flavonoids. Saponins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição geográfica de <i>Passiflora pohlii</i> Mast.....	28
Figura 2 –	<i>Passiflora pohlii</i> Mast.....	29
Figura 3 –	Raiz de plantas mantidas <i>in vivo</i> de <i>P. pohlii</i>	37
Figura 4 –	Raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> induzidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μ M, por 60 dias, na ausência de luz.....	43
Figura 5 –	Raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> induzidas a partir de segmentos nodais cultivados em meio MSM suplementado com ANA, por 60 dias, na ausência de luz.....	44
Figura 6 –	Biomassa (g) de raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> obtidas a partir de segmentos internodais e posteriormente cultivadas meio MSM.....	45
Figura 7 –	Raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> multiplicadas em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μ M, por 60 dias, na ausência de luz, utilizando diferentes sistemas de cultura.....	46
Figura 8 –	Biomassa (g) de raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> multiplicadas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> e cultivados em meio MSM líquido sob agitação suplementado com diferentes concentrações de auxinas, na ausência de luz, por 60 dias.....	47
Figura 9 –	Raízes adventícias de <i>P. pohlii</i> multiplicadas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas <i>in vitro</i> e cultivados em meio MSM líquido sob agitação (110 rpm) suplementado com diferentes concentrações de auxinas.....	48
Figura 10 –	Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i>	49
Figura 11 –	Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i>	50

Figura 12 – Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i>	51
Figura 13 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> , com detecção em UV _{340nm}	52
Figura 14 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vitro</i> , com detecção em UV _{340nm}	53
Figura 15 – Cromatogramas de coinjeções de padrões de flavonoides em extrato de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> , com detecção em UV _{340nm}	54
Figura 16 – Cromatogramas de coinjeções de padrões de flavonoides em extrato de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> , com detecção em UV _{340nm}	55
Figura 17 – Cromatogramas por CLAE de extratos de raízes de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i>	56
Figura 18 – Cromatogramas por CLAE de extratos de raízes de <i>P. pohlii</i> obtidas <i>in vitro</i>	57
Figura 19 – Cromatogramas de íons totais (CITs) dos extratos de folhas excisadas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> , obtido por CLAE-UV-ESI-EM.....	58
Figura 20 – Cromatogramas de íons totais (CITs) dos extratos de folhas excisadas de plantas de <i>P. pohlii</i> obtidas <i>in vitro</i> , obtido por CLAE-UV-ESI-EM..	59
Figura 21 – Espectros de massa dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> , pela análise de CLAE-UV-ESI-EM.....	60
Figura 22 – Espectros de massa dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vitro</i> , pela análise de CLAE-UV-ESI-EM.....	60
Figura 23 – Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de folhas e raízes de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62

Figura 24 – Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i>	64
Figura 25 – Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i>	65

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 –	Técnicas cromatográficas para análise de compostos bioativos em espécies de <i>Passiflora</i>	27
Quadro 2 –	Principais trabalhos sobre cultura de tecidos de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	33
Tabela 1 –	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos caulinares de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM suplementado com ANA, por 60 dias.....	43
Tabela 2 –	Biomassa (g) de raízes adventícias induzidas a partir de segmentos caulinares de <i>P. pohlii</i> cultivados em meio MSM suplementado com ANA em diferentes sistemas de cultura, por 60 dias, na ausência de luz	44
Tabela 3 –	Padrão de fragmentação das substâncias detectadas por CLAE-UV-ESI-EM, em extratos de folhas de plantas de <i>P. pohlii</i> mantidas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	61
Tabela 4 –	Potencial antioxidante de diferentes materiais vegetais de <i>P. pohlii</i> obtidos <i>in vivo</i> ou produzidos <i>in vitro</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	ácido 3-indolacético
AIB	ácido 3-indolbutírico
ANA	ácido naftaleno acético
BAP	6-benzilaminopurina
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM	Espectrometria de Massas
IES	Ionização por Electrospray
MS	Meio de Murashige & Skoog
MSM	Meio MS modificado por Monteiro et al., 2000b
NP/PEG	Reagente Produtos Naturais/Polietilenoglicol
PF	Peso Fresco
PIC	Picloram
PS	Peso Seco
R _F	Fator de retenção
UV	Ultravioleta
tR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	17
2	GÊNERO <i>PASSIFLORA</i>	22
2.1	<i>Passiflora pohlii</i> Mast.....	28
2.2	Cultura <i>in vitro</i> de espécies de <i>Passiflora</i>	30
3	OBJETIVOS	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Material Vegetal e Condições de Cultura	35
4.2	Culturas de raízes	35
4.2.1	<u>Indução de Raízes Adventícias a Partir de Segmentos Caulinares</u>	35
4.2.2	<u>Multiplicação de Raízes a Partir de Segmentos Radiculares</u>	36
4.3	Análise Fitoquímica	37
4.3.1	<u>Preparo de Extratos Vegetais</u>	37
4.3.2	<u>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</u>	38
4.3.3	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)</u>	39
4.3.4	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-UV-IES-EM)</u>	39
4.4	Avaliação da Atividade Antioxidante	40
4.4.1	<u>Ensaio DPPH</u>	40

4.4.2	<u>Análise qualitativa por CCD-DPPH</u>	41
4.5	Análise Estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Indução de Raízes Adventícias a partir de Segmentos Caulinares	42
5.2	Multiplicação de Raízes a partir de Segmentos Radiculares	46
5.3	Análise Fitoquímica	49
5.3.1	<u>Cromatografia em Camada Delgada</u>	49
5.3.1.1	Análise de Flavonoides.....	49
5.3.1.2	Análise de Saponinas.....	50
5.3.2	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</u>	52
5.3.2.1	Análise de Extratos de Folhas.....	52
5.3.2.2	Análise de Extratos de Raízes.....	56
5.3.3	<u>Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas</u>	58
5.4	Avaliação da Atividade Antioxidante	61
5.4.1	<u>Ensaio DPPH</u>	61
5.4.2	<u>Análise qualitativa por CCD-DPPH</u>	64
6	DISCUSSÃO	66
	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

Técnicas de cultura de tecidos vegetais, além de permitirem estudos básicos de fisiologia vegetal e biologia molecular, têm aplicações práticas na agricultura e na indústria, sendo um método eficiente para produção de mudas, melhoramento vegetal, conservação de germoplasma e produção de metabólitos de uso farmacológico. Essas estratégias têm sido empregadas para a produção de metabólitos de interesse, por permitirem a produção em larga escala de plantas e a possibilidade de manipulação das vias metabólicas. As culturas de raízes são consideradas sistemas potenciais para a produção de substâncias bioativas, uma vez que estes órgãos são capazes de produzir, naturalmente, substâncias que protegem as plantas contra o ataque de herbívoros ou microrganismos.

O maracujá pertence ao gênero *Passiflora* (família Passifloraceae) e ocorre principalmente em regiões de clima tropical. O Brasil, considerado um dos mais importantes centros de diversidade do gênero, é também o maior produtor e um importante mercado consumidor de maracujá. Além do cultivo comercial, algumas espécies de *Passiflora* são também amplamente cultivadas devido à utilização ornamental de suas flores e utilizadas na medicina popular, sendo consideradas drogas oficiais nas Farmacopéias de diversos países.

1. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS *IN VITRO*

A constante interação das plantas com o seu ambiente resultou em complexos processos bioquímicos durante a evolução, tornando-as reconhecidas fontes de substâncias biologicamente ativas, classificadas como metabólitos secundários ou especiais, que são potencialmente úteis como fármacos, agroquímicos, cosméticos, pigmentos, biopesticidas, aditivos alimentares e nutracêuticos (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002).

O metabolismo secundário das plantas, ao contrário do primário envolvido com a manutenção das funções essenciais, como respiração, reprodução, síntese e armazenamento de energia, desempenha um papel importante para a sua sobrevivência no meio ambiente, estando envolvido na atração de polinizadores, na defesa contra predadores e doenças. Além disso, esses metabólitos também desempenham algumas funções adaptativas, como proteção contra raios UV e perda excessiva de água (DEWICK, 2002).

Apesar da utilização das plantas na medicina tradicional há milhares de anos, somente mais recentemente ocorreram o reconhecimento e a comprovação científica da eficácia terapêutica de muitos metabólitos secundários. Esses fatores, aliados à demanda por terapias com menores riscos à saúde humana e o menor custo envolvido nos tratamentos, resultaram em um aumento do uso das plantas para fins medicinais. Contudo, a obtenção de metabólitos de interesse farmacológico em métodos tradicionais de cultivo de plantas nem sempre é satisfatória. Vários fatores como disponibilidade de nutrientes, condições de luz, alterações climáticas, sazonalidade e concentrações de gás carbônico atmosférico, podem influenciar os tipos e concentrações dos compostos produzidos (FINE et al., 2006). Muitas vezes, o metabólito é restrito a espécies ou gêneros, ou só é produzido em determinadas fases de crescimento e desenvolvimento, o que pode elevar o custo para a extração (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002). Além disso, a coleta indiscriminada das plantas diretamente da natureza, associada à destruição de habitats por ações antrópicas ameaçam, cada vez mais, a flora medicinal.

A produção de metabólitos secundários em sistemas *in vitro*, como as culturas de tecidos e células vegetais, tem sido considerada uma alternativa promissora ao cultivo tradicional, devido ao potencial apresentado por esta ferramenta biotecnológica em termos de produção constante e em larga escala de material uniforme, sob condições controladas, independente de variações climáticas, condições de solo ou fases de crescimento (ANTOGNONI et al., 2007). Além disso, a produção do metabólito *in vitro* pode ser modulada, otimizando as condições de cultura, tornando ainda possível a compreensão das vias biossintéticas e a conservação do germoplasma de interesse.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são baseadas na totipotência das células vegetais, capazes de voltar a um estágio similar ao meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação e, assim, dar origem a novos órgãos ou uma planta completa (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Da mesma forma, as células vegetais também detêm a informação genética completa, sendo capazes de produzir compostos químicos encontrados na planta intacta.

Muitas culturas *in vitro* para a síntese de metabólitos secundários baseiam-se no crescimento organizado de tecidos e órgãos, tais como brotos e raízes, uma vez que as culturas organizadas geralmente apresentam perfis metabólicos comparáveis aos da planta na natureza. Por outro lado, culturas desorganizadas como calos, massas de células com multiplicação desordenada, e células em suspensão, apesar de constituírem técnicas bastante

utilizadas para a produção *in vitro* de metabólitos especiais (NAGELLA; MURTHY, 2010; CAI; KNORR; SMETANSKA, 2012; GADZOVSKA-SIMIC, et al., 2012; ALI; ABBASI; IHSAN-UL-HAQ, 2013; GONÇALVES; ROMANO, 2013; GUPTA et al., 2013), podem sofrer perda na capacidade de produção e acúmulo de metabólitos. Isto pode ocorrer devido ao metabolismo ser controlado de maneira tecido-específica, onde a desdiferenciação do tecido pode resultar na perda da capacidade de produção. Portanto, culturas de plantas ou órgãos inteiros, como raízes embriões, são consideradas alternativas para a produção de metabólitos secundários (MURTHY, HAHN; PAEK, 2008).

A produção de plantas *in vitro* pode ocorrer por diferentes vias morfogênicas, incluindo multiplicação de brotos a partir de meristemas pré-existentes, a embriogênese somática e a organogênese (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Tecidos meristemáticos, como os ápices caulinares e radiculares e gemas axilares, são formados por células indiferenciadas em constante processo de divisão, sendo naturalmente competentes para a formação de novos órgãos ou plantas inteiras. A cultura de tecidos meristemáticos é frequentemente utilizada para a propagação clonal *in vitro* de plantas livres de vírus e também indicada para a conservação de germoplasma, já que reduz os riscos do surgimento de variação somaclonal, por reproduzir o processo natural de proliferação, sem passar pelos processos de desdiferenciação e rediferenciação (HITMI; BARTHOMEUF; SALLANON, 2000; KATOH et al., 2004).

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

Na organogênese *in vitro*, novos órgãos, como brotos ou raízes adventícias, podem ser formados a partir de tecidos já diferenciados. Assim, a regeneração de plantas via organogênese inclui a desdiferenciação do tecido de origem, a aquisição de novas

competências, a indução e a determinação da nova via de desenvolvimento, as quais dependem do genótipo e da natureza do explante, além da rediferenciação, na qual ocorre a formação de novos órgãos. A cultura de órgãos é geralmente descrita como um tipo de cultura em que uma forma organizada de crescimento pode ser mantida continuamente e, assim como na embriogênese somática, pode ocorrer de forma direta ou indireta.

As culturas de raízes adventícias *in vitro* são consideradas sistemas potenciais para a produção de substâncias bioativas, sem que haja interferência no ambiente natural das espécies selecionadas, uma vez que estes órgãos são naturalmente capazes de sintetizar e armazenar metabólitos secundários. Essas raízes são geralmente desenvolvidas em partes aéreas excisadas das plantas, como brotos e segmentos de caule (HASAN; HUSSEIN, 2013), podendo também ser originadas a partir de calos (LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK, TOWN, 2005).

As raízes cultivadas *in vitro* podem apresentar um perfil fitoquímico bastante semelhante ao das raízes das plantas *in vivo*, e podem ser obtidas por meio da transformação genética com *Agrobacterium rhizogenes*, ou pela simples manipulação do meio e das condições de cultura.

Agrobacterium rhizogenes é uma bactéria do solo que possui a capacidade natural de infectar células vegetais e induzir a produção e proliferação de raízes. As raízes transformadas podem constituir um sistema adequado para a produção de metabólitos secundários, devido ao seu rápido crescimento e estabilidade bioquímica, além de não requererem a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. Adicionalmente, o padrão metabólico dessas raízes é bem similar, se não idêntico, ao das raízes normais, sendo possível também obter a produção do metabólito durante a fase de crescimento, quando, normalmente, a produção de metabólitos é menor devido ao direcionamento da energia para a multiplicação celular. Contudo, algumas espécies são recalcitrantes à infecção pela *A. rhizogenes* (SUDHA; SEENI, 2001). Para essas espécies, a indução de raízes adventícias pode ser obtida pela manipulação das condições de cultura, visando aumentar a capacidade de desenvolvimento de biomassa em resposta a estímulos adequados (WU et al., 2006; MURTHY, HAHN; PAEK, 2008).

A produção de raízes adventícias *in vitro* para a obtenção de metabólitos especiais vem sendo aplicada com sucesso em diversas espécies medicinais, incluindo *Raphanus sativus* L. (BETSUI; TANAKA-NISHIKAWA; SHIMOMURA, 2004), *Echinacea angustifolia* (WU et al., 2006), *Panax ginseng* C.A. Meyer (PAEK, MURTHY; HAHN,

2009), *Morinda citrifolia* (BAQUE; HAHN; PAEK, 2010), *Hypericum perforatum* L. (CUI et al., 2010; CUI et al., 2011), *Aloe vera* (LEE et al., 2011), *Castilleja tenuiflora* Benth (GÓMEZ-AGUIRRE et al., 2012) e *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (YIN et al., 2013). Esse sistema pode ainda ser utilizado para a produção em larga escala do metabólito de interesse, utilizando biorreatores (CHOI et al., 2000; JEONG et al., 2006; MIN et al., 2007; WU et al., 2007; CUI et al., 2010; BAQUE et al., 2012). Além disso, raízes adventícias podem também ser utilizadas em sistemas de co-cultura, uma vez que os metabólitos excretados para o meio podem ser utilizados por outros órgãos para produção de novas substâncias, por posterior conversão bioquímica (WU et al., 2008).

As substâncias bioativas produzidas pelos materiais obtidos *in vitro* pelos diferentes sistemas de cultura de tecidos vegetais, assim como os materiais de plantas mantidas *in vivo*, podem ser detectadas, quantificadas, isoladas e identificadas por técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

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

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

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

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

O espectrômetro de massas é um detector universal, que fornece informações sobre a massa molecular e características estruturais de amostras simples ou complexas. Esta técnica era inicialmente utilizada apenas para a determinação de massas moleculares. Além disso, os modos de ionização mais antigos, como a ionização por impacto de elétrons, limitavam o seu uso para análise de substâncias não polares, voláteis e termoestáveis. Mais recentemente, a utilização de técnicas de ionização suave, como por electrospray (ESI), possibilitou a análise de substâncias polares, não voláteis e termolábeis, permitindo também a análise de suas propriedades físicas e/ou químicas por EM (CABRERA, 2006). Além disso, é possível ainda obter informações estruturais mais detalhadas utilizando a espectrometria de massas sequencial (EM/EM), em combinação com a dissociação induzida por colisão (DIC) (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

2. GÊNERO *PASSIFLORA*

O gênero *Passiflora* (maracujás), pertencente à família Passifloraceae, possui cerca de 560 espécies conhecidas, com distribuição tropical e subtropical. O Brasil é considerado um importante centro de origem das espécies do gênero, concentradas principalmente nas regiões Sudeste e Norte, com 69 e 67 espécies identificadas, respectivamente (BERNACCI et al., 2013).

Feuillet e MacDougal (2003) classificaram as espécies do gênero em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*. O subgênero *Astrophea* possui 57 espécies de lianas e arbustos, com grande diversidade na América do Sul, enquanto que *Deidamioides* apresenta somente 13 espécies conhecidas, encontradas na América Central e América do Sul. O subgênero *Decaloba* possui cerca de 230 espécies, distribuídas por toda a América, além de Ásia e Oceania, enquanto que *Passiflora* inclui cerca de 250 espécies, sendo o subgênero com o maior número de espécies conhecidas e estudadas, devido à sua importância econômica. Sua distribuição é ampla, sendo a América do Sul considerada o maior centro de diversidade (ULMER; MACDOUGAL, 2004; KROSNICK et al., 2013). Entretanto, Krosnick, Ford e Freudenstein (2009), em uma revisão mais recente, reconheceram um novo subgênero, *Tetrapathea*, contendo apenas 3 espécies de lianas encontradas na Austrália, Papua-Nova Guiné e Nova Zelândia, aumentando o número de subgêneros para cinco.

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

Embora exista uma grande diversidade de espécies de maracujá, apenas cerca de 30 espécies nativas apresentam frutos comestíveis, sendo poucas cultivadas comercialmente. Entre estas, destacam-se o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), o maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener) e o maracujá-doce (*P. alata* Curtis). A produção brasileira de maracujá ganhou importância econômica há cerca de 30 anos, pelo incentivo da agroindústria e pela crescente demanda no mercado de frutas frescas. A expansão da produção de maracujá foi significativa, sendo cultivado atualmente em quase todo o território nacional. No entanto, 95% dos pomares são cultivados com uma única espécie, o maracujá-amarelo, devido ao sabor e a qualidade de seus frutos (MELETTI, 2005; ZERAIK et al., 2010). Atualmente, o Brasil é

considerado o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, com 776.097 toneladas produzidas em uma área aproximada de 59.246 hectares (IBGE, 2013).

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

Além do comércio de frutas frescas, os maracujás destacam-se também na indústria de sucos, doces e sorvetes. A valorização destes produtos é devido ao seu sabor e conteúdo de ácido ascórbico, açúcar, caroteno, riboflavinonas e minerais (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Do mesmo modo, a utilização de espécies de maracujá no mercado de plantas ornamentais é crescente, devido à exuberância e formas exóticas de suas flores (SOUZA; MELETTI, 1997).

Espécies de *Passiflora* são também utilizadas na medicina popular desde o século XIX para o tratamento de insônia, ansiedade e irritabilidade, por meio do preparo de chás e infusões de folhas, frutos e raízes (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; MIRODDI et al., 2013). Além disso, estudos farmacológicos realizados nos últimos 20 anos com diversas espécies do gênero comprovaram diferentes atividades biológicas, incluindo atividade diurética (DHAWAN, DHAWAN; SHARMA, 2004), ansiolítica (DE-PARIS et al., 2002; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002; REGINATTO et al., 2006; ASLANARGUN et al., 2012), antihiperlipidêmica (SALGADO et al., 2010; BARBALHO et al., 2011; GUPTA et al., 2012; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013; COLOMEU et al., 2014), imunoestimulante (SILVEIRA et al., 2011), antifúngica (RIBEIRO et al., 2012), anti-inflamatória (BORELLI et al., 1996; VARGAS et al., 2007; ZUCOLOTTO et al., 2009; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013), antioxidante (MULLER et al., 2005; RUDNICKI et al., 2007a; ZERAIK et al., 2011; LÓPEZ-VARGAS et al., 2013; MONTEFUSCO-PEREIRA et al., 2013; MORRONE et al., 2013; RAMAIYA et al., 2013; ROTILI et al., 2013; SILVA et al., 2013; COLOMEU et al., 2014), analgésica (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011), anticonvulsivante (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2007), anti-hipertensiva (PATEL et al., 2011),

antidepressiva (WANG et al., 2013), antiviral (MÜLLER et al., 2007) e antibacteriana (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013).

Tendo em vista a grande diversidade de atividades biológicas já descritas para o gênero, algumas espécies de *Passiflora*, como *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis* são reconhecidas nacional e internacionalmente, estando presentes em diversas farmacopeias e compêndios oficiais, incluindo as farmacopeias brasileira, americana, alemã, britânica, francesa, indiana e suíça (PARAFITT, 1999; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Estudos sobre a composição química de diferentes materiais vegetais de espécies do gênero descreveram a presença de diversos compostos de interesse medicinal, principalmente alcaloides (LUTOMSKI; MALEK, 1975; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; TSUCHIYA et al., 1999; FRYE; HAUSTEIN, 2007), flavonoides (MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; RAFFAELLI et al., 1997; MÜLLER et al., 2005; ZERAIK; YARIWAKE, 2010; FERRERES et al., 2007; BARBALHO et al., 2011) e saponinas (YOSHIKAWA et al., 2000a; YOSHIKAWA et al., 2000b; REGINATTO et al., 2004; BIRK; PROVENSÍ; GOSMANN, 2005; DOYAMA et al., 2005; WANG et al., 2013). Contudo, outros compostos foram também isolados de espécies de *Passiflora*, como glicosídeos cianogênicos, carotenoides, aminoácidos, carboidratos e óleos essenciais, além de vitaminas, fibras e minerais (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; SPARG; LIGHT; VAN STADEN; 2004; ZIBADI et al., 2007; STRASSER, 2011).

Os flavonoides já descritos em *Passiflora* estão presentes principalmente em folhas e frutos, e são do tipo C-glicosídeos, nos quais os açúcares estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono (ZERAIK, 2010). Já foi relatada a ocorrência de cerca de 50 diferentes flavonoides em espécies de *Passiflora*, sendo os principais vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosídeo e swertisina (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; GOSMANN et al., 2011).

Os alcaloides já descritos no gênero são do tipo indólico, derivados do sistema β -carbolina, encontrados principalmente nas folhas e caules. Alguns trabalhos descreveram a presença dos alcaloides harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol em *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (LUTOMSKI; MALEK, 1975; REHWALD; STICHER; MEIER, 1995; TSUCHIYA et al., 1999; FRYE; HAUSTEIN, 2007). Estes alcaloides compreendem um dos grandes grupos de alcaloides conhecidos e muitos possuem atividade biológica comprovada, com interesse medicinal devido às suas propriedades tranquilizantes e no tratamento da hipertensão (PEREIRA; VILEGAS, 2000; MÜLLER, 2006).

As saponinas são um grande grupo de glicosídeos, amplamente distribuídas em plantas superiores, sendo utilizadas na indústria farmacêutica para a síntese de esteroides, assim como na indústria de cosméticos. Apresentam ainda atividades anti-inflamatória, anti-hemolítica, antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antiviral (FRANCIS et al., 2002; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004). No gênero *Passiflora*, foram encontradas principalmente em *P. edulis* e *P. alata*. A primeira saponina descrita em extratos de folhas de *P. edulis* foi denominada passiflorina, a qual é derivada do lanostato (BOMBARDELLI et al., 1975). Outras saponinas esteroidais e triterpênicas foram isoladas de folhas e de caules de *P. edulis* (YOSHIKAWA et al., 2000b; REGINATTO et al. 2001).

As análises destas substâncias bioativas em espécies de *Passiflora* são realizadas, principalmente, pelas técnicas de CCD, CLAE e CLAE-EM (Quadro 1).

Quadro 1 –Técnicas cromatográficas para análise de metabólitos em espécies de *Passiflora*.

Espécie	Técnica	Substância	Referência
<i>P. incarnata</i>	CCD	Alcaloides	Bennati, 1971
<i>P. pittieri, P. alata, P. ambigua</i>	CLAE	Flavonoides	Ulubelen et al., 1982
<i>P. incarnata</i>	CCD	Flavonoides	Menghini; Mancini, 1988
<i>P. incarnata</i>	CLAE	Alcaloides	Rehwald et al., 1995
<i>P. incarnata</i>	CLAE	Flavonoides	Bokstaller; Schmidt, 1997
<i>P. edulis</i>	CCD	Glicosídeo cianogênico	Chassagne; Crouzet, 1998
<i>P. incarnata</i>	CLAE	Alcaloides, flavonoides	Grice et al., 2001
<i>P. alata</i>	CCD	Saponinas	Reginatto et al., 2001
<i>P. alata, P. edulis</i>	CCD	Flavonoides	Petry et al., 2001
<i>Passiflora spp.</i>	CLAE	Flavonoides	Abourashed et al., 2002
<i>P. alata, P. edulis</i>	CLAE, CCD	Flavonoides	De Paris et al., 2002
<i>P. alata, P. edulis, P. incarnata</i>	CLAE, CCDAE	Flavonoides	Pereira et al., 2004
<i>P. alata</i>	CLAE	Saponinas	Reginatto et al. 2004
<i>Passiflora spp.</i>	CCD	Flavonoides, saponinas	Birk et al., 2005
<i>P. alata</i>	CLAE	Flavonoides	Müller et al., 2005
<i>P. alata</i>	CLAE	Flavonoides	Pereira et al., 2005
<i>P. alata</i>	CLAE	Alcaloides, flavonoides	Müller, 2006
<i>P. alata</i>	CCD	Flavonoides	Reginatto et al., 2006
<i>P. quadrangulares</i>	CLAE	Flavonoides	Antognoni et al., 2007
<i>P. edulis</i>	CLAE	Flavonoides	Ferreres et al., 2007
<i>P. caerulea</i>	CCD	Flavonoides	Busilacchi et al., 2008
<i>P. incarnata</i>	CCD, CLAE, CLAE-EM	Flavonoides	Wohlmuth et al., 2010
<i>P. edulis</i>	CLAE	Flavonoides	Zeraik et al., 2010
<i>P. incarnata</i>	CLAE	Flavonoides	Elsas et al., 2011
<i>P. edulis, P. alata</i>	CLAE	Flavonoides	Zeraik et al., 2011
<i>Passiflora spp.</i>	CLAE, CLAE-EM	Flavonoides	Zucolotto et al., 2012
<i>P. caerulea</i>	CLAE, CCDAE	Flavonoides, ácido rosmarínico e ácido clorogênico	Ozarowski et al., 2012
<i>Passiflora spp.</i>	CLAE-EM	Flavonoides, saponinas, ácido rosmarínico	Sakalem et al., 2012
<i>P. manicata</i>	CLAE	Flavonoides	Morrone et al., 2013
<i>P. caerulea, P. incarnata</i>	CLAE, CCDAE	Flavonoides	Ozarowski et al., 2013
<i>P. tripartita</i>	CLAE-EM	Flavonoides	Simigiortis et al., 2013

Legenda: CCD - cromatografia em camada delgada; CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; CCDAE - cromatografia em camada delgada de alta eficiência; CLAE-EM - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

2.1. *Passiflora pohlii* Mast.

Passiflora pohlii Mast., a espécie escolhida para este trabalho, é conhecida como maracujá-do-campo, maracujá-do-mato, maracujá-pintado, maracujá-silvestre ou maracujazinho e pertence ao subgênero *Decaloba*. É uma espécie nativa do Brasil, sendo encontrada no Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Figura 1), biomas sob forte impacto antrópico (BERNACCI et al., 2013).

Figura 1 - Distribuição geográfica de *Passiflora pohlii* Mast.



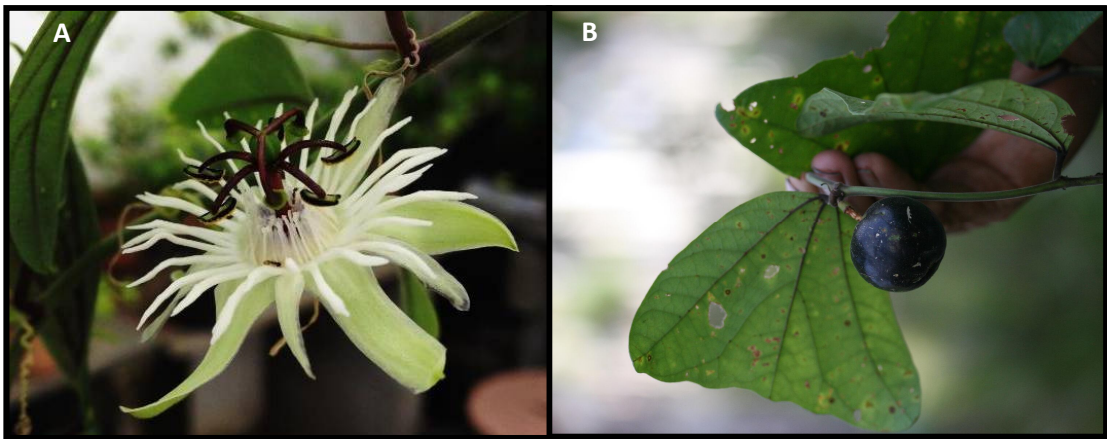
Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>

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

Passiflora pohlii floresce ao longo de todo o ano, com o pico da floração ocorrendo entre os meses de setembro e outubro. As flores ocorrem aos pares, duram apenas um dia e

apresentam uma plataforma para os visitantes, com peças florais resistentes, odor agradável, néctar protegido e em quantidades moderadas. Estudos sobre a biologia reprodutiva classificaram a espécie como xenógama obrigatória, autoincompatível, sendo dependente de polinizadores para sua reprodução sexuada, o que a difere de espécies do subgênero *Passiflora*. Alguns de seus polinizadores incluem abelhas do gênero *Ptiloglossa*, moscas (*Drosophila melanogaster*) e formigas do gênero *Acromyrmex* (FARIA; STEHMANN, 2010).

Figura 2 - *Passiflora pohlii* Mast.



Legenda: A) Flor; B) Fruto.

Fonte: <http://www.traium.andesamazon.org>.

Estudos demonstraram que esta espécie apresenta tolerância a patógenos do solo pertencentes ao gênero *Phytophthora* sp., que provocam grandes prejuízos à cultura de maracujá (JUNQUEIRA et al., 2005). Dessa forma, *P. pohlii* possui grande potencial agrônomico, podendo servir como base para estudos futuros visando ao controle de patógenos do solo. Por outro lado, embora diversas espécies de *Passiflora* tenham grande potencial medicinal, até o momento, não foram descritas atividades farmacológicas em *P. pohlii*.

2.2. Cultura *in vitro* de espécies de *Passiflora*

Os primeiros trabalhos sobre cultura de tecidos em *Passiflora* foram publicados entre os anos 60 e 70, descrevendo a indução de organogênese em *P. caerulea* (NAKAYAMA, 1966), *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molissima* (MORAN ROBLES, 1978). Desde então, diversos sistemas de cultura *in vitro* foram desenvolvidos com sucesso para outras espécies do gênero, por meio de organogênese e embriogênese somática. Um dos principais objetivos desses trabalhos foi o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração de plantas que pudessem ser utilizados em experimentos de transformação genética.

A organogênese é a principal via morfogênica observada entre os trabalhos de cultura de tecidos para espécies de *Passiflora* (Quadro 2). A indução de sistemas organogênicos já foi descrita a partir de diferentes tipos de explante, direta ou indiretamente. A determinação da via parece estar mais relacionada ao genótipo que ao tipo e à concentração do regulador de crescimento utilizado e à escolha do explante inicial, uma vez que diversos órgãos, como folhas, hipocótilo, segmentos nodais, raízes e tecidos meristemáticos são utilizados tanto em sistemas diretos (KANTHARAJAH; DODD, 1990; DORNELAS; VIEIRA, 1994; KAWATTA et al., 1995; FARIA; SEGURA, 1997a; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; ISUTSA, 2004; TREVISAN; MENDES, 2005; FARIA et al., 2007; FERNANDO et al., 2007; LOMBARDI et al., 2007; BUSILACCHI et al., 2008; SANTOS et al., 2010; GARCIA et al., 2011a; SILVA et al., 2011; ANAND et al., 2012; RAGAVENDRAN et al., 2012), quanto indiretos (KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW, 1991; AMUGUNE; GOPALAN; BYTEBIER, 1993; BIASI et al., 2000; MONTEIRO et al., 2000a; WINKLER, QUOIRIN, 2002; BECERRA; FORERO; GÓNGORA, 2004; APEZZATO-DA-GLORIA et al., 1999; LOMBARDI et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2007; PINTO et al., 2010; GARCIA et al., 2011a; SEVERIN et al., 2011; ROSA; DORNELAS, 2012).

Por outro lado, a capacidade embriogênica do maracujá foi menos estudada. Anthony et al. (1999) estabeleceram culturas de protoplastos derivados de suspensões celulares embriogênicas de *P. giberti*, iniciadas a partir de explantes foliares. Posteriormente, Reis et al. (2007) descreveram a formação esporádica e indireta de embriões somáticos a partir de linhagens transformadas de raízes de *P. cincinnata*. Mais recentemente, alguns autores descreveram a indução de embriogênese somática indireta a partir de embriões zigóticos maduros de *P. cincinnata* e *P. edulis*, em resposta a combinações de ácido 2,4-

diclofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilamino-purina (BAP) (SILVA et al., 2009; PINTO et al., 2011; ROSA; BELLO; DORNELLAS, 2014). Os eventos anatômicos e ultraestruturais que ocorrem na embriogênese também foram avaliados, visando à elucidação dos fatores relacionados à aquisição de competência embriogênica e na determinação das células e/ou tecidos envolvidos nesse processo (ROCHA et al., 2012).

A morfogênese *in vitro* de *P. pohlii* partir de segmentos caulinares foi anteriormente descrita pelo grupo do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ (NBV/UERJ) (MERHY, 2014). Foram avaliadas a influência do tipo do explante, da composição do meio de cultura e das condições de cultivo na morfogênese *in vitro*. Foi observada a formação de brotos e/ou calos. Calos friáveis, com potencial para o estabelecimento de culturas de células em suspensão, foram induzidos a partir de segmentos nodais e internodais na presença de ácido 1-naftalenoacético (ANA) ou picloram (PIC). A produção direta de brotos foi observada a partir de explantes nodais mantidos a 30°C, em resposta a BAP, enquanto que os mesmos explantes mantidos a 25°C apresentaram organogênese indireta. A maior taxa de formação de brotos foi observada a partir de segmentos nodais cultivados em meio MSM (MONTEIRO *et al.*, 2000b) suplementado com BAP a 31 µM por 60 dias (87,7 brotos por explante). Análises histológicas revelaram que os brotos tiveram origem direta a partir das regiões meristemáticas dos explantes. Além disso, não foram detectadas alterações genéticas entre os regenerantes, por meio de análises com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Os sistemas de regeneração já desenvolvidos para *Passiflora* foram ainda utilizados como base para o desenvolvimento de metodologias de criopreservação de ápices caulinares e de segmentos nodais de *P. suberosa*, *P. foetida* e *P. pohlii* (GARCIA et al., 2011b; FALCÃO, 2011; MERHY et al., 2014). Os explantes foram criopreservados por imersão direta em nitrogênio líquido após encapsulamento em alginato de cálcio e exposição às soluções de vitrificação PVS₂ (*Plant Vitrification Solution 2*) e PVS₃ (*Plant Vitrification Solution 3*). As taxas de recuperação de plantas variaram de acordo com o genótipo, o tipo de explante e a técnica utilizada. Adicionalmente, a estabilidade genética das plantas de *P. pohlii* recuperadas a partir de segmentos nodais criopreservados foi avaliada por meio de marcadores RAPD e ISSR, não tendo sido encontrados polimorfismos nas regiões genômicas analisadas (MERHY et al., 2014).

Apesar do grande número de estratégias de produção e conservação *in vitro* já descritas para espécies de *Passiflora*, poucos trabalhos descrevem a produção de substâncias

bioativas a partir dos materiais obtidos *in vitro*. Antognoni et al. (2007) descreveram a produção de flavonoides por calos não-morfogênicos derivados de explantes foliares de *P. quadrangularis* cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D, após elicitação com UV-B. Em *P. garckeii*, a elicitação de culturas em suspensão com extrato de levedura resultou no aumento da produção de compostos aromáticos (FRACCAROLI et al., 2008). Em *P. alata*, Machado et al. (2010) investigaram a produção de alcaloides harmana em calos e células em suspensão, apesar da biossíntese dessas substâncias não ter sido observada.

Tendo em vista os resultados já alcançados para a micropropagação de *P. pohlii* por nosso grupo do NBV/UERJ e o potencial farmacológico apresentado pelas outras espécies do gênero, sistemas de cultura de raízes *in vitro* foram desenvolvidos neste trabalho, visando à avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante de extratos de materiais obtidos *in vitro*, comparando com os derivados de plantas mantidas *in vivo*.

Quadro 2 – Principais trabalhos sobre cultura de tecidos de espécies do gênero *Passiflora*.

Espécie	Via de regeneração	Explante utilizado	Referência
<i>P. caerulea</i>	Organogênese	Gemas axilares e Raízes	Nakayama, 1966
<i>P. edulis f. flavicarpa e P. molíssima</i>	Organogênese	Gemas Axilares	Moran Robles, 1978
<i>P. edulis</i>	Organogênese	Segmentos nodais	Kanharajah; Dodd, 1990
<i>P. edulis f. flavicarpa, P. edulis, P. alata, P. caerulea, P. mollissima, P. coccinea, P. herbertiana, P. suberosa</i>	Organogênese	Ápices caulinares	Drew, 1991
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Discos Foliare	Amugune et al., 1993
<i>P. edulis f. flavicarpa, P. mollissima, P. giberti, P. maliformis, P. amethystina.</i>	Organogênese	Folhas, cotiledones, hipocótilo, raíz e ápice caulinar.	Dornelas & Vieira, 1994
<i>P. edulis</i>	Organogênese	Segmentos foliares	Kawatta et al., 1995
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Hipocótilo e segmentos foliares	Faria & Segura, 1997a
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Desenvolvimento de meristemas pré-existent	Ápices caulinares	Faria & Segura, 1997b
<i>P. giberti</i>	Embriogênese Somática	Segmentos foliares	Anthony et al., 1999
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Segmentos nodais	Monteiro et al., 2000a
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Segmentos internodais	Biasi et al., 2000
<i>P. edulis f. flavicarpa, P. edulis</i>	Organogênese	Ápices caulinares	Isutsa, 2004
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Discos foliares	Trevisan & Mendes, 2005
<i>P. edulis, P. giberti, P. laurifolia</i>	Organogênese	Gema apical e axilar	Faria et al., 2007
<i>P. cincinnata</i>	Embriogênese Somática	Raíz transformada	Reis et al., 2007
<i>P. caerulea</i>	Organogênese	Folhas	Busilacchi et al., 2008
<i>P. cincinnata</i>	Embriogênese Somática	Embriões zigóticos	Silva et al., 2009
<i>P. cincinnata, P. edulis f. flavicarpa</i>	Organogênese	Hipocótilo	Dias et al., 2009
<i>P. alata</i>	Organogênese	Discos foliares, hipocótilo	Pinto et al., 2010
<i>P. suberosa</i>	Desenvolvimento de meristemas pré-existent/Organogênese	Segmentos foliares, nodais, internodais	Garcia et al., 2011a
<i>P. edulis</i>	Embriogênese Somática	Embriões zigóticos	Pinto et al., 2011
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Embriões zigóticos	Rosa & Dornelas, 2012
<i>P. foetida</i>	Organogênese	Segmentos nodais	Anand et al., 2012
<i>P. alata</i>	Organogênese	Segmentos foliares, nodais, internodais	Pacheco et al., 2012
<i>P. pohlii</i>	Organogênese	Segmentos caulinares	Merhy, 2014

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o estabelecimento de estratégias para acultura de raízes adventícias, assim como a caracterização do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante de extratos de plantas mantidas *in vivo* e do material obtido *in vitro* de *P. pohlii*. Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de auxinas no estabelecimento de culturas de raízes adventícias a partir de segmentos caulinares e radiculares de plantas produzidas *in vitro*.
- Avaliar o efeito de diferentes sistemas de cultura e condições de iluminação no estabelecimento e multiplicação de culturas de raízes adventícias obtidas a partir de segmentos caulinares e radiculares de plantas produzidas *in vitro*.
- Avaliar o perfil fitoquímico de extratos de folhas e raízes de plantas mantidas *in vivo* e produzidas *in vitro*, utilizando as técnicas de CCD, CLAE e CLAE-EM;
- Determinar o potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir dos diferentes materiais vegetais, por ensaio DPPH e CCD-DPPH.

4. METODOLOGIA

4.1. Material Vegetal e Condições de Cultura

Plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro* ou *in vivo* durante quatro anos no Laboratório de Micropropagação e Transformação de Plantas do NBV/UERJ foram utilizadas como materiais iniciais para este trabalho (MERHY, 2014). Um exemplar representativo da planta cultivada *in vivo* encontra-se depositado no Herbário da UERJ, sob o registro HRJ 12198.

Foi utilizado o meio basal MSM, contendo vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e sacarose a 3%, gelificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados em diferentes concentrações, antes da esterilização em autoclave (15 minutos a 121 °C e 1,0 atm). As plantas de *P. pohlii* eram mantidas em meio MSM ½ (meio MSM com metade da concentração de sais, vitaminas e sacarose a 1,5%) e utilizadas quatro semanas após a subcultura de segmentos caulinares contendo de dois a quatro nós.

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

4.2. Culturas de Raízes

4.2.1. Indução e Multiplicação de Raízes Adventícias a Partir de Segmentos Caulinares

Segmentos nodais (0,5 cm) e internodais (1,5 cm), retirados de plantas de *P. pohlii* cultivadas *in vitro* foram inoculados em meio MSM sem a adição de reguladores de crescimento (MSM0) ou MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,54; 2,7 e 5,4 μM), ácido indolacético (AIA) (0,57; 2,85 e 5,7 μM) e ácido indolbutírico (AIB) (0,49; 2,45 e 4,9 μM), utilizando diferentes sistemas de cultivo: i) meio solidificado, ii) meio líquido estacionário, iii) meio líquido sob agitação (100 rpm), ou iv) pontes de papel de filtro sobre meio líquido. Para cada tratamento, foram utilizados quatro frascos contendo 30ml de

meio de cultura, com cinco explantes cada. Nos meios solidificados e nas pontes de papel de filtro sobre meio líquido, os segmentos caulinares foram inoculados em posição horizontal.

As culturas foram mantidas por 60 dias em câmara de crescimento, na presença ou ausência de luz. O acúmulo de biomassa foi avaliado por meio da aferição dos pesos de matérias fresca e seca. O peso seco foi aferido após secagem em estufa a 60°C por 24 h.

Para a multiplicação das raízes adventícias obtidas, foram selecionadas raízes formadas a partir dos segmentos internodais cultivados em meio MSM sólido suplementado com ANA a 2,7 µM na ausência de luz. Para iniciar as culturas, cerca de 1g de raízes adventícias foram transferidas para meio MSM suplementado com ANA a 2,7 µM, utilizando-se três sistemas de cultivo: meio líquido sob agitação (100 rpm), pontes de papel de filtro sobre meio líquido, ou meio dupla-fase (10 mL de meio líquido sobre 20 mL de meio solidificado). Foram utilizados quatro frascos por sistema de cultura, mantidos na ausência de luz por 60 dias. O acúmulo de biomassa foi avaliado por meio da aferição dos pesos de matéria fresca e seca. O peso seco foi aferido após secagem em estufa a 60 °C por 24 h.

4.2.2. Multiplicação de Raízes a Partir de Segmentos Radiculares

Segmentos radiculares com cerca de dois centímetros foram excisados de plantas *in vitro* e inoculados em meio MSM0 ou MSM suplementado com diferentes concentrações de ANA (0,54; 2,7 e 5,4 µM), AIA (0,57; 2,85 e 5,7 µM) e AIB (0,49; 2,45 e 4,9 µM), utilizando diferentes sistemas de cultivo: i) meio solidificado, ii) meio líquido sob agitação (100 rpm), iii) pontes de papel de filtro sobre meio líquido, ou iv) meio dupla-fase. Para cada tratamento, foram utilizados cinco frascos contendo 30ml de meio de cultura, com três explantes cada. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento, na presença ou ausência de luz, por 60 dias.

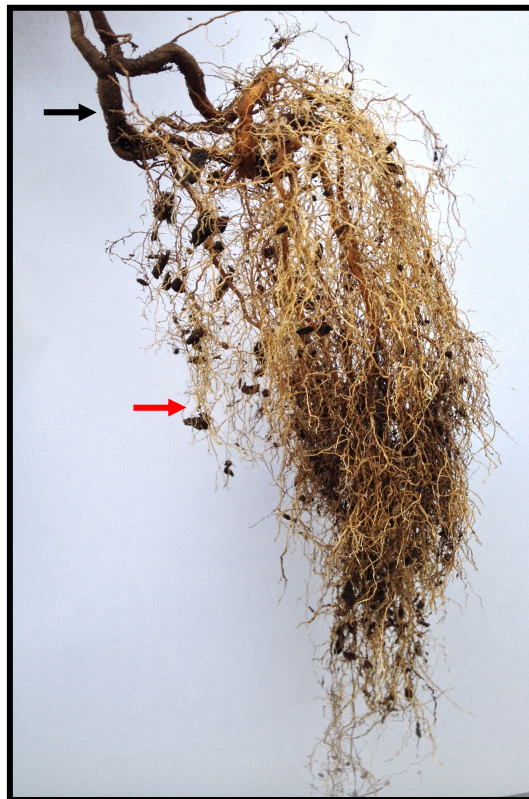
O acúmulo de biomassa foi avaliado por meio da aferição dos pesos de matéria fresca e seca. O peso seco foi aferido após secagem em estufa a 60 °C por 24 h.

4.3. Análise Fitoquímica

4.3.1. Preparo de Extratos Vegetais

Para as análises cromatográficas e avaliação do potencial antioxidante foram preparados extratos de folhas e raízes excisadas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*, assim como de raízes adventícias formadas a partir de segmentos internodais e radiculares, após secagem em estufa a 45 °C, por 48 h. As raízes primárias das plantas mantidas *in vivo* foram avaliadas separadamente, já que apresentavam morfologia bastante distinta das raízes secundárias (Figura 3), incluindo capacidade de formação de brotos.

Figura 3 - Raiz de planta mantida *in vivo* de *P. pohlii*.



Legenda: Seta preta indica raiz primária, seta vermelha indica raízes secundárias.

Os extratos foram preparados utilizando etanol 40% por 1 hora, em refluxo (BIRK; PROVENSI; GOSMANN, 2005). Em seguida, os extratos foram secos em banho-maria a 90°C e ressuspensos em metanol, com auxílio de ultrassom.

4.3.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a caracterização fitoquímica dos extratos, foram utilizados diferentes sistemas de CCD.

Para a análise de flavonoides, a fase móvel foi constituída de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v) (WAGNER; BLADT, 2001). Foram utilizadas duas placas de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} (Marcherey-Nagel). Uma das placas foi revelada com uma solução de vanilina sulfúrica, composta por vanilina etanólica a 1% e ácido sulfúrico a 10%. Após exposição à solução reveladora, a placa foi aquecida a 110°C por 5 a 10 minutos, para visualização das bandas. A segunda placa foi revelada com NP/PEG 4000 (Natural Products – polietilenoglicol), revelador indicado para a identificação de flavonoides (WAGNER; BLADT, 2001). A solução foi preparada utilizando solução metanólica de 2-aminoetil difenilborinato (Sigma Aldrich®) a 1%, seguida de solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5%. A visualização foi realizada em câmara de UV_{365nm}. Foram utilizados os padrões dos flavonoides vitexina (Lote: BCBJ6002V), isovitexina (Lote: BCBF5376V), orientina (Lote: 060M1734), isoorientina (Lote: 100M1508) e rutina (Lote: BCBH0339V) (Sigma-Aldrich®).

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

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

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

4.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)

A análise dos extratos dos diferentes materiais vegetais por CLAE-UV-DAD foi realizada de acordo com COSTA *et al.* (2011), com modificações, utilizando o aparelho (Dionex Ultimate 3000) acoplado a uma coluna C18 (Dionex Bonded Silica Products, μM , 4,6 x 250mm, 5 μm). A fase móvel foi constituída de um gradiente composto por soluções A (água miliQ acidificada com ácido acético glacial a 1%, pH ajustado para 3) e B (acetonitrila), da seguinte forma: 0-30 minutos de variação linear de A-B (95:5 v/v) até A-B (80:20 v/v); 30-40 minutos, em condição isocrática, A-B (80:20 v/v); 40-47 minutos de variação linear de A-B (80:20 v/v) até A-B (95:5 v/v). A taxa de fluxo do efluente foi mantida constante, a 1 ml/min, realizada em meio ambiente. A detecção foi realizada a 340 nm para os extratos de folhas, e em uma faixa de 254 a 340 nm para os extratos de raízes.

Para a identificação dos picos obtidos, foram realizadas coinjeções, utilizando padrões dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina e rutina.

4.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-UV-IES-EM)

As análises dos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro* foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu UFLC com detector UV_{340nm} acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo Bucker MicroTOF-QII equipado com fonte de ionização por electrospray (IES), operando no modo negativo. Essas análises foram realizadas na Central Analítica Fernanda Coutinho do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob a coordenação da Profa. Dra. Mônica Regina da Costa Marques.

A condição estabelecida para a análise em CLAE-UV/DAD no item anterior, utilizando as soluções A e B, foi otimizada para análise no sistema CLAE-UV-IES-EM, utilizando-se gradiente de variação linear de A - B (95:5 v/v) até A - B (85:15 v/v), de 0 a 35 minutos; gradiente de variação linear de A - B (85:15 v/v) até A - B (80:20 v/v), de 35 a 45 minutos; A - B (80:20v/v), em condição isocrática, de 45 a 60 minutos; e gradiente de variação linear de A - B (80:20 v/v) até A - B (95:5 v/v), de 60 a 65 minutos. A taxa de fluxo

do efluente foi determinada para 0,5 ml/min. sem controle de temperatura. O equipamento foi ajustado para as seguintes condições de análise: pressão do nebulizador de 4,0 bar, fluxo de gás de 9 L/min, a 200°C, a faixa de massas analisadas foi determinada para 50 a 1500 m/z. Os espectros foram visualizados no software Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

4.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

4.4.1. Ensaio DPPH

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado através da capacidade de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich®), utilizando-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificada por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

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

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

Onde: Ac = absorbância do controle negativo

Aa = absorbância da amostra.

Os resultados foram também expressos por meio do cálculo da concentração eficaz (CE₅₀), ou seja, a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & Berset, 1995). Os valores do CE₅₀ 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 da

porcentagem de captura de DPPH, calculados pelas médias das triplicatas. O cálculo da CE_{50} foi efetuado pela equação abaixo:

$$y = -ax + b$$

Onde: $y = 50$

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

4.4.2. Análise qualitativa por CCD-DPPH

O potencial antioxidante foi ainda avaliado utilizando a metodologia de CCD, como descrito anteriormente. As placas foram reveladas com solução de DPPH a 0,2% em metanol e mantidas no escuro por 1h para a visualização. A presença de substâncias com ação antioxidante foi detectada através do surgimento de manchas amareladas contra a coloração roxa da placa pulverizada com a solução de DPPH (MASOKO; ELOFF, 2007).

4.5. Análise Estatística

Os experimentos de cultura de tecidos foram repetidos pelo menos duas vezes, utilizando-se grupos de 15 a 20 explantes. A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA), dos testes de comparação Tukey-Kramer ou T-Student, com auxílio do programa Graphpad InStat, sendo consideradas significativa as diferenças com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Indução e Multiplicação de Raízes Adventícias a partir de Segmentos Caulinares

Segmentos caulinares de *P. pohlii* inoculados em meio MSM sem a adição de reguladores de crescimento não apresentaram respostas morfogênicas. Por outro lado, os mesmos explantes inoculados em meio MSM suplementado com diferentes concentrações das auxinas ANA, AIB e AIA, em diferentes sistemas de cultura, apresentaram a formação de raízes adventícias, em frequências distintas. Na presença de AIB e AIA, os explantes apresentaram a formação de raízes curtas e finas, em baixas frequências, independente do sistema de cultura (dados não apresentados). Por outro lado, na presença de ANA, foi observada a formação de raízes adventícias e calos, nos diferentes sistemas de cultura testados (Figura 4, Tabela 1).

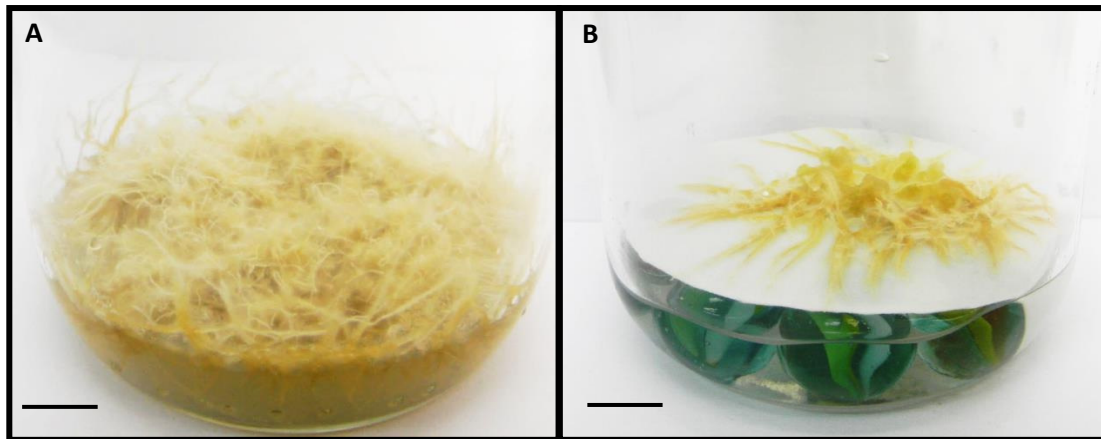
Segmentos internodais cultivados em meio MSM líquido estacionário ou sob agitação apresentaram baixas taxas de formação de raízes, muitas vezes associadas à calogênese. Contudo, quando cultivados em meio MSM sólido ou líquido sob pontes de papel de filtro, com suplementação de ANA a 2,7 μM e incubação na ausência de luz, os mesmos explantes apresentaram 100% de rizogênese, com baixa taxa de formação de calos (20%) (Tabela 1).

A formação das raízes ocorreu diretamente a partir dos segmentos internodais, a partir do 12º dia de cultura. As raízes eram formadas ao longo de todo o explante, com as finas ramificações iniciais apresentando coloração esbranquiçada, tornando-se grossas e amareladas ao longo do período de cultivo. Apesar de o mesmo padrão de regeneração ter sido observado nos dois sistemas de cultura (Figura 4), o maior acúmulo de biomassa seca foi obtido quando segmentos internodais foram cultivados em meio solidificado (Tabela 2).

Nas culturas de segmentos nodais foram observadas baixas taxas de rizogênese, com exceção dos sistemas de meio sólido suplementado com ANA a 0,54 μM e de pontes de papel de filtro sobre meio líquido suplementado com ANA a 2,7 μM , mantidos na ausência de luz (90% e 80% de formação de raízes, respectivamente) (Tabela 1, Figura 5). Entretanto, esses sistemas também apresentaram intensa formação de calos (100%) e, por essa razão, não foram utilizados nos experimentos posteriores. O início de raízes foi observado a partir do 7º dia de cultura, ocorrendo apenas na parte superior do explante, com as mesmas características das raízes obtidas com segmentos internodais. Todos os explantes cultivados em meio MSM

suplementado com AIA e AIB desenvolveram apenas calos, em todos os sistemas de cultura testados (dados não mostrados).

Figura 4 -. Raízes adventícias de *P. pohlii* induzidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μM , por 60 dias, na ausência de luz.



Legenda: (A) Raízes adventícias induzidas em meio sólido; (B) Raízes adventícias induzidas em pontes de papel de filtro sobre meio líquido. Barra = 1 cm.

Tabela 1 -Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos caulinares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com ANA, por 60 dias.

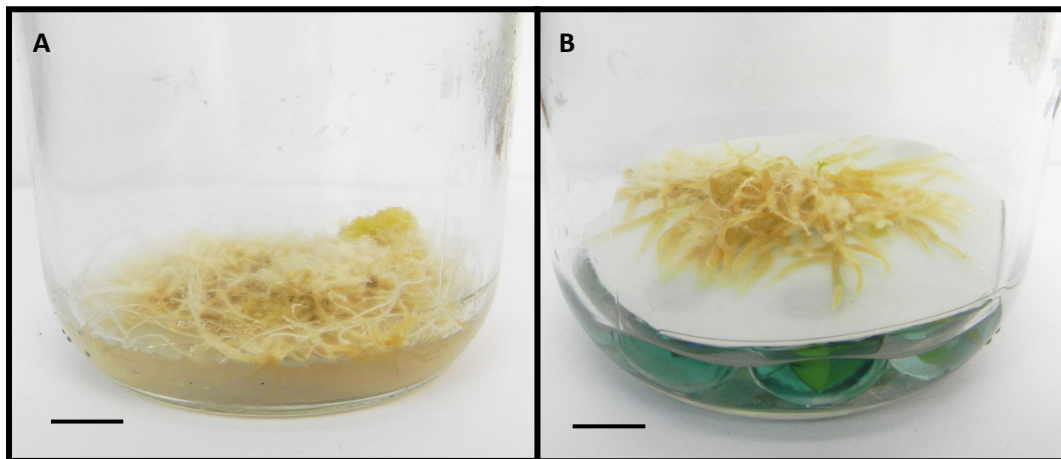
ANA	Sistema	Segmentos Internodais				Segmentos Nodais			
		Claro		Escuro		Claro		Escuro	
		Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)	Raízes (%)	Calos (%)
0,54 μM	Ponte	4	-	28	25	20	-	64	20
	Agitação	28	-	40	40	12	-	24	20
	Estacionário	-	-	28	-	4	-	24	20
	Sólido	10	100	95	20	-	100	90	100
2,7 μM	Ponte	28	100	100	20	20	80	80	100
	Agitação	80	40	60	20	12	-	36	20
	Estacionário	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sólido	-	-	100	20	-	-	75	100
5,4 μM	Ponte	12	80	20	100	12	80	4	100
	Agitação	-	-	-	100	-	-	-	100
	Estacionário	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sólido	-	-	90	100	-	-	60	75

Tabela 2 - Biomassa seca (g) de raízes adventícias induzidas a partir de segmentos caulinares de *P. pohlii* cultivados em meio MSM suplementado com ANA em diferentes sistemas de cultura, por 60 dias, na ausência de luz.

ANA	Sistemas	Segmentos Internodais		Segmentos nodais	
		Claro	Escuro	Claro	Escuro
0,54 μ M	Ponte	-	0,014 \pm 0,003b	-	0,015 \pm 0,005b
	Agitação	-	-	-	-
	Estacionário	-	0,012 \pm 0,001b	-	0,052 \pm 0,01a
	Sólido	-	0,046 \pm 0,007a	-	0,053 \pm 0,01a
2,70 μ M	Ponte	-	0,014 \pm 0,001b	-	0,017 \pm 0,002b
	Agitação	0,096 \pm 0,02a	-	-	-
	Estacionário	-	-	-	-
	Sólido	-	0,099 \pm 0,01a	-	0,068 \pm 0,02a
5,40 μ M	Ponte	-	-	-	-
	Agitação	-	-	-	-
	Estacionário	-	-	-	-
	Sólido	-	0,082 \pm 0,02a	-	0,090 \pm 0,03a

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

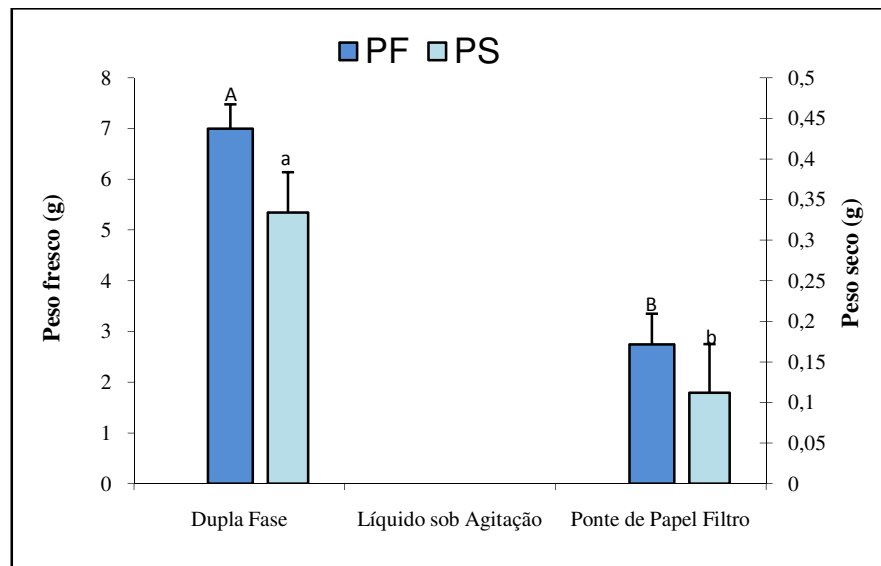
Figura 5. Raízes adventícias de *P. pohlii* induzidas a partir de segmentos nodais cultivados em meio MSM suplementado com ANA, por 60 dias, na ausência de luz.



Legenda: (A) Raízes adventícias induzidas em meio sólido suplementado com ANA a 0,54 μ M; (B) Raízes adventícias induzidas em meio líquido sob pontes de papel filtro suplementado com ANA a 2,7 μ M. Setas indicam a presença de calos. Barra = 1 cm.

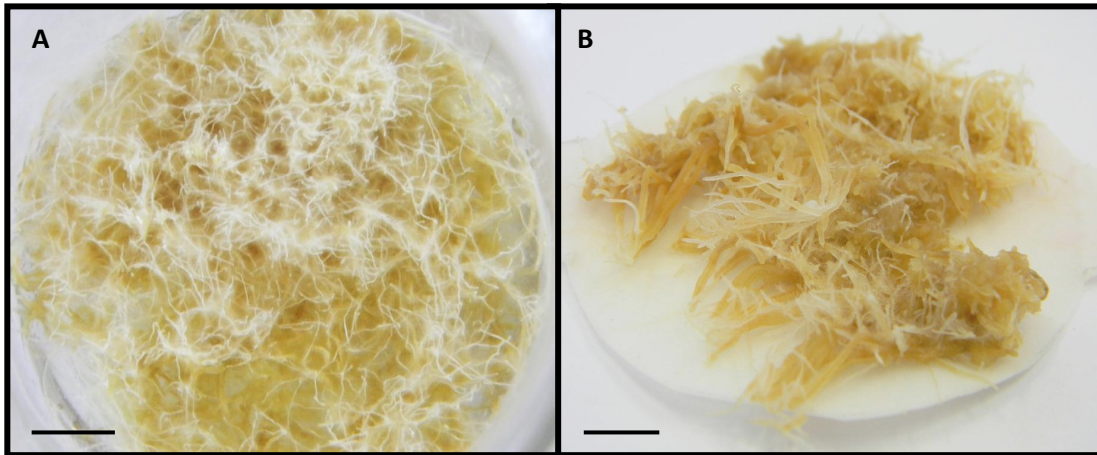
A multiplicação das raízes adventícias induzidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio MSM sólido suplementado com ANA a $2,7 \mu\text{M}$ foi avaliada em meio líquido com agitação, sob pontes de papel de filtro ou no sistema de dupla-fase, nas mesmas condições da indução. As raízes cultivadas em meio MSM líquido sob agitação não apresentaram aumento da biomassa. Por outro lado, a multiplicação das raízes ocorreu nos dois outros sistemas de cultura testados (Figuras 6 e 7). As raízes adventícias multiplicadas no sistema de dupla-fase apresentaram maior valor de massa seca ($0,334 \text{ g}$) quando comparadas com as raízes obtidas no sistema de ponte de papel filtro sobre meio líquido ($0,112 \text{ g}$) (Figura 6). As raízes multiplicadas em ambos os sistemas (Figuras 7A, B) eram morfológicamente semelhantes às raízes induzidas a partir dos explantes caulinares, sendo as raízes recém-formadas finas e esbranquiçadas, tornando-se mais espessas e amareladas durante a cultura. A multiplicação teve início após sete dias de cultura, no escuro, e continuou ao longo dos 60 dias, até preencher totalmente a superfície do meio de cultura.

Figura 6. Biomassa (g) de raízes adventícias de *P. pohlii* obtidas a partir de segmentos internodais e posteriormente cultivadas meio MSM, suplementado com ANA a $2,7 \mu\text{M}$, em diferentes sistemas, por 60 dias.



Legenda: Médias nas colunas da mesma cor e seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste T-Student ($p < 0,05$).

Figura 7. Raízes adventícias de *P. pohlii* multiplicadas em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μM , por 60 dias, na ausência de luz, utilizando diferentes sistemas de cultura.



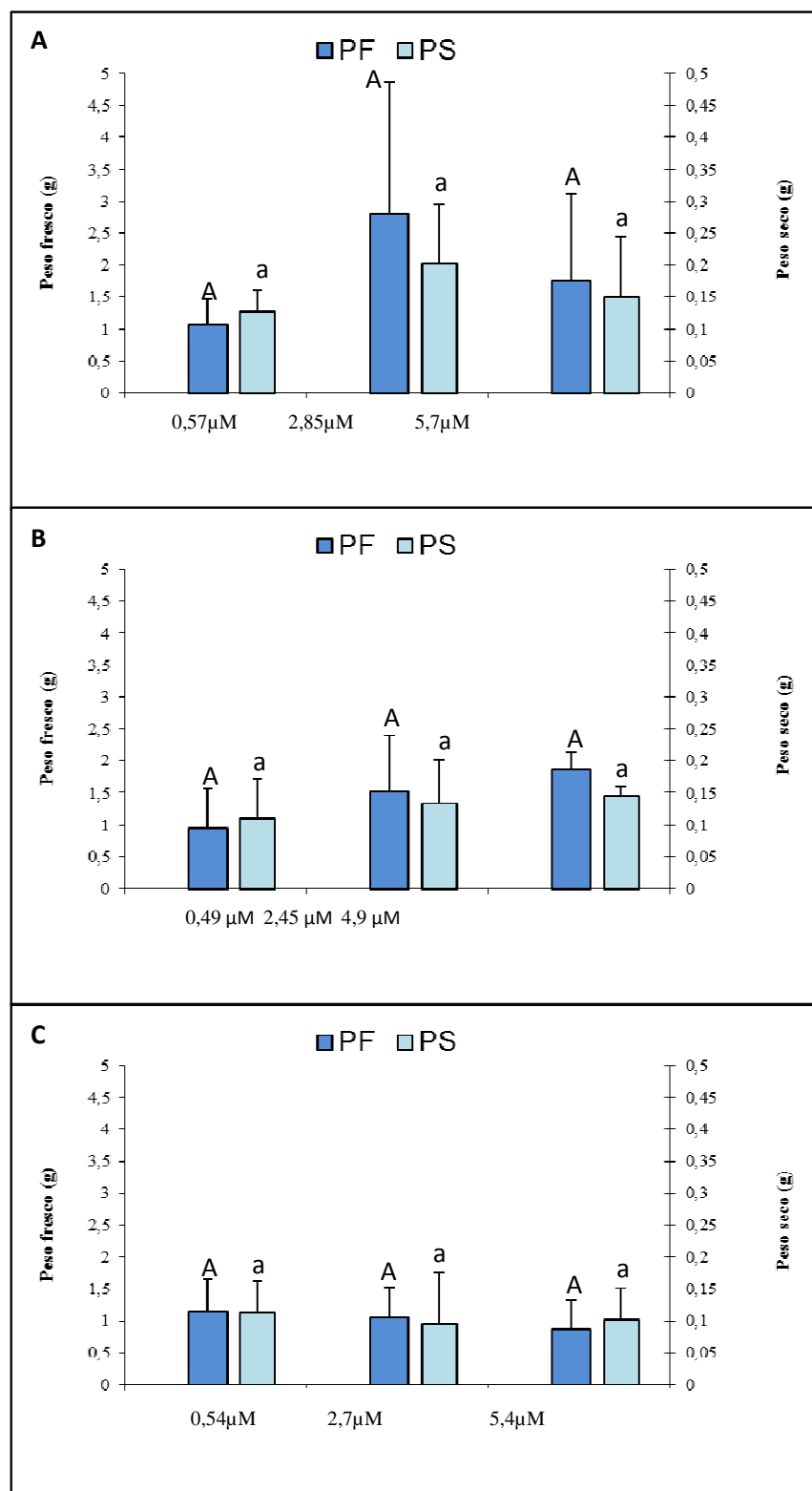
Legenda: (A) Raízes multiplicadas em sistema de dupla-fase; (B) Raízes multiplicadas em pontes de papel de filtro sobre meio líquido. Barra = 1 cm.

5.2. Multiplicação de Raízes a partir de Segmentos Radiculares

Segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii* e cultivados em meio MSM sólido, líquido sob pontes de papel de filtro ou em dupla-fase apresentaram baixas taxas de multiplicação, independente do tipo e da concentração do regulador de crescimento testado (dados não mostrados). Por outro lado, quando os explantes radiculares foram cultivados em meio MSM líquido sob agitação, na ausência de luz por 60 dias, foi observado aumento de biomassa em resposta a todas as concentrações de AIA, AIB ou ANA testadas (Figura 8).

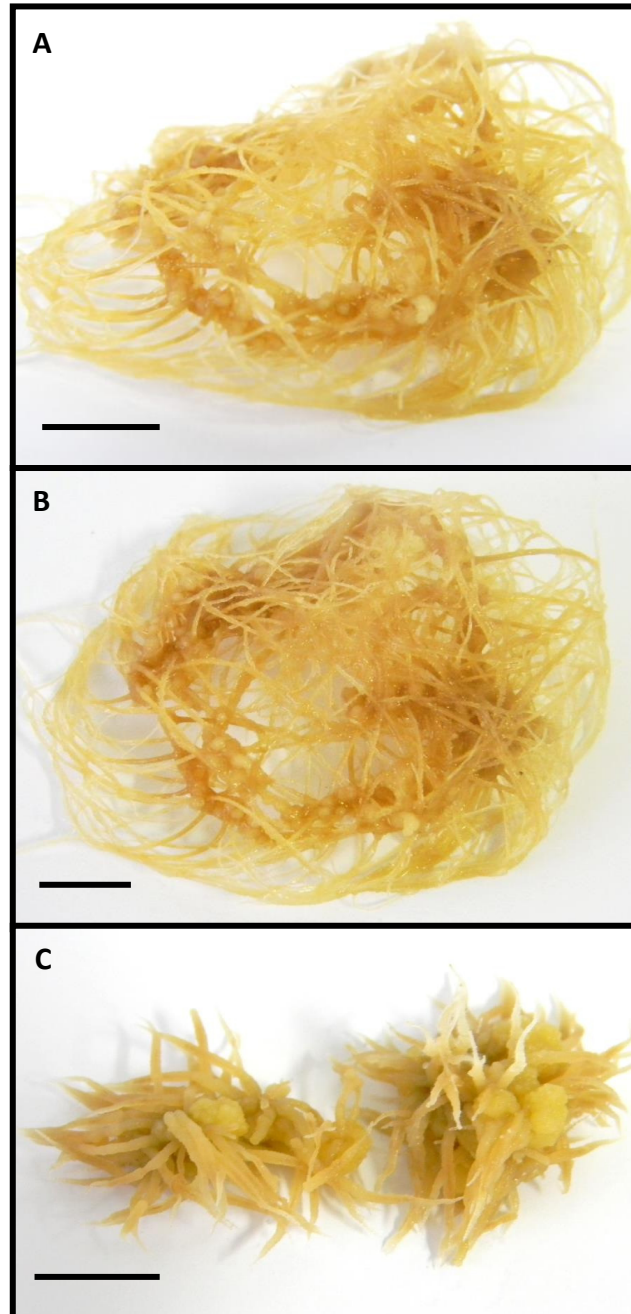
A maior taxa de multiplicação foi obtida nos explantes cultivados em meio MSM suplementado com AIA a 2,85 μM (0,203 g de massa seca), apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os outros tipos e concentrações de reguladores de crescimento testados (Figura 8). As raízes multiplicadas na presença de AIA e AIB eram morfológicamente semelhantes às raízes das plantas *in vitro*, com espessura fina, altamente ramificadas e com coloração amarelada (Figuras 9A, B). Por outro lado, as raízes multiplicadas em meio suplementado com ANA eram mais curtas e espessas, semelhantes às obtidas a partir de segmentos caulinares (Figura 9 C).

Figura 8 - Biomassa (g) de raízes adventícias de *P. pohlii* multiplicadas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* e cultivados em meio MSM líquido sob agitação suplementado com diferentes concentrações de auxinas, na ausência de luz, por 60 dias.



Legenda: Meio MSM suplementado com (A) AIA, (B) AIB e (C) ANA. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste T-Student ($p < 0.05$).

Figura 9 - Raízes adventícias de *P. pohlii* multiplicadas a partir de segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* e cultivados em meio MSM líquido sob agitação (110 rpm) suplementado com diferentes concentrações de auxinas.



Legenda: (A) AIA a 2,85 μM , (B) AIB a 4,9 μM e (C) ANA a 5,4 μM , na ausência de luz, por 60 dias. Barra = 1 cm.

4.3. Análise Fitoquímica

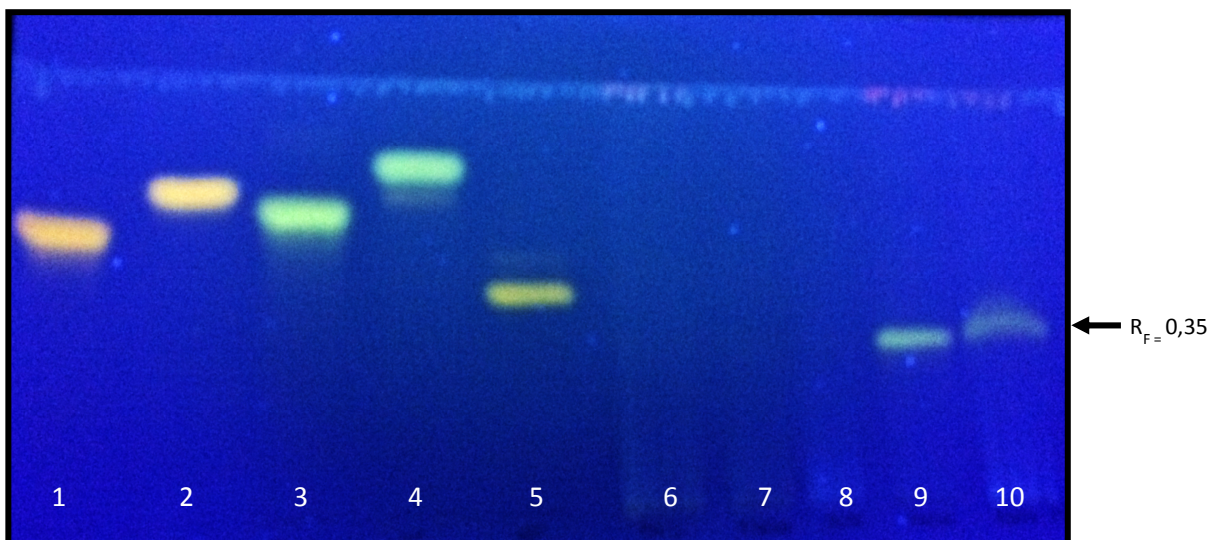
5.3.1. Cromatografia em Camada Delgada

5.3.1.1. Análise de flavonoides

Os perfis cromatográficos de possíveis flavonoides presentes nos extratos obtidos a partir de folhas de *P. pohlii* encontram-se representados nas figuras 10 e 11. Não foram observadas bandas indicativas de flavonoides nos extratos obtidos a partir de raízes, independente do revelador utilizado.

Quando NP/PEG foi utilizado como solução reveladora, extratos obtidos a partir de folhas de plantas mantidas *in vivo* ou obtidas *in vitro* apresentaram bandas com fluorescência amarela ($R_F = 0,35$), indicativas de flavonoides, após visualização sob UV_{365nm} . Contudo, essas bandas diferiram daquelas apresentadas pelos padrões de flavonoides utilizados, sugerindo a presença de outro flavonoide nestes extratos (Figura 10).

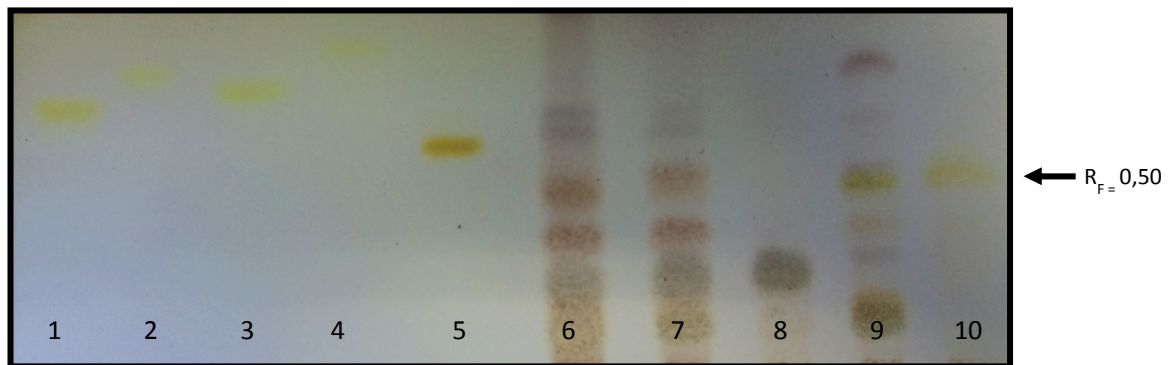
Figura 10 - Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*.



Legenda: (1) isoorientina ($R_F = 0,6$), (2) orientina ($R_F = 0,7$), (3) isovitexina ($R_F = 0,65$), (4) vitexina ($R_F = 0,76$), (5) rutina ($R_F = 0,53$), (6) raízes secundárias de plantas mantidas *in vivo*, (7) Raízes primárias de plantas mantidas *in vivo*, (8) raízes de plantas mantidas *in vitro*, (9) folhas de plantas mantidas *in vivo* ($R_F = 0,35$), (10) folhas de plantas mantidas *in vitro* ($R_F = 0,35$). Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v). Revelação: NP/PEG 4000, e visualização sob UV_{365nm} .

A utilização de vanilina sulfúrica como revelador mostrou um perfil cromatográfico diferente, com o surgimento de bandas não detectadas com NP/PEG. Entretanto, as bandas de coloração amarelada ($R_F=0,50$), características de flavonoides, foram observadas somente nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* ou obtidas *in vitro*, assim como observado com NP/PEG, e não puderam ser relacionadas às apresentadas pelos padrões de flavonoides utilizados (Figura 11).

Figura 11 - Perfil cromatográfico para identificação de flavonoides em diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*.



Legenda: (1) isoorientina ($R_F = 0,7$), (2) orientina ($R_F = 0,76$), (3) isovitexina ($R_F = 0,75$), (4) vitexina ($R_F = 0,84$), (5) rutina ($R_F = 0,61$), (6) raízes secundárias de plantas mantidas *in vivo*, (7) raízes primárias de plantas mantidas *in vivo*, (8) raízes de plantas mantidas *in vitro*, (9) folhas de plantas mantidas *in vivo* ($R_F = 0,50$), (10) folhas de plantas mantidas *in vitro* ($R_F = 0,50$). Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v). Revelação: vanilina sulfúrica.

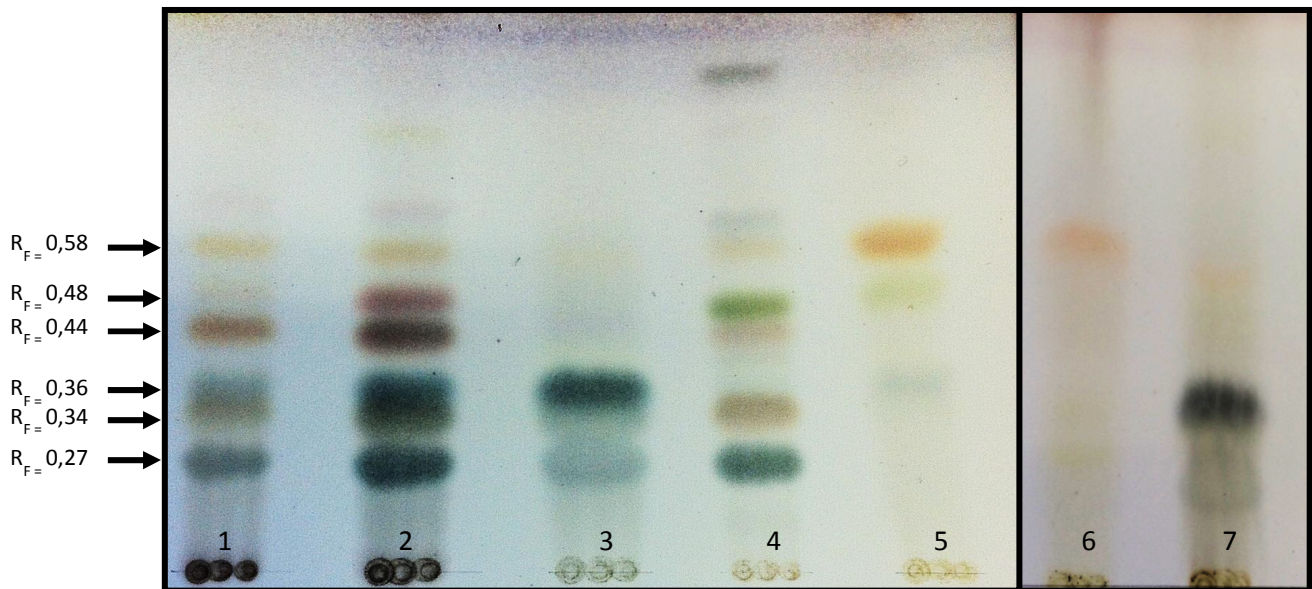
5.3.1.2. Análise de saponinas

Para a avaliação da presença de possíveis saponinas nos extratos obtidos a partir dos diferentes materiais analisados, uma mistura de clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8 v/v) foi utilizada como fase móvel, e anisaldeído-sulfúrico como revelador. Foram obtidas bandas indicativas de saponinas em todos os extratos avaliados, com exceção do extrato obtido de raízes adventícias produzidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio MSM sólido suplementado com ANA a 2,7 μ M (Figura 12).

Extratos dos sete diferentes materiais apresentaram bandas semelhantes ($R_F = 0,58$), de coloração alaranjada, com maior intensidade detectada no extrato de folhas de plantas

mantidas *in vitro* e menor intensidade no extrato de raízes de plantas mantidas *in vitro* (Figura 12). Os extratos de raízes apresentaram ainda outras regiões indicativas de saponinas, com coloração verde escuro ($R_F = 0,27$ a $0,36$). Os extratos de raízes primárias e secundárias de plantas mantidas *in vivo* apresentaram duas bandas castanhas semelhantes ($R_F = 0,44$ e $0,48$), também indicativas de saponinas. O extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo* apresentou uma banda verde escuro, com $R_F=0,27$ e duas bandas com coloração castanha ($R_F=0,34$ e $0,44$).

Figura 12 - Perfil cromatográfico para identificação de saponinas em extratos de diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*.



Legenda: (1) Raízes secundárias de plantas mantidas *in vivo*, (2) Raízes primárias de plantas mantidas *in vivo*, (3) Raízes de plantas mantidas *in vitro*, (4) Folha de plantas mantidas *in vivo*, (5) Folhas de plantas mantidas *in vitro*, (6) Raízes *in vitro* obtidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio suplementado com ANA a $2,7\mu\text{M}$, (7) Raízes *in vitro* obtidas a partir de segmentos radiculares cultivados em meio suplementado com AIA a $2,85\mu\text{M}$. Fase móvel: clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). Revelação com anisaldéido sulfúrico.

5.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.3.2.1. Análise de extratos de folhas

A análise cromatográfica do extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo* indicou a presença de três substâncias, com picos de absorção em 340 nm e tempos de retenção (tR) de 25,5, 28,5 e 29,8 minutos, respectivamente (Figura 13). O mesmo pico majoritário (tR = 29,043) foi observado no extrato de folhas de plantas mantidas *in vitro* (Figura 14), sugerindo ser a mesma substância detectada nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo*.

As análises dos espectros de absorvância dos picos detectados em ambas as amostras sugerem se tratar de flavonoides, pois apresentaram padrões característicos de absorção, com dois a três picos de absorvância, entre 230 e 340 nm (Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*, com detecção em UV_{340nm}.

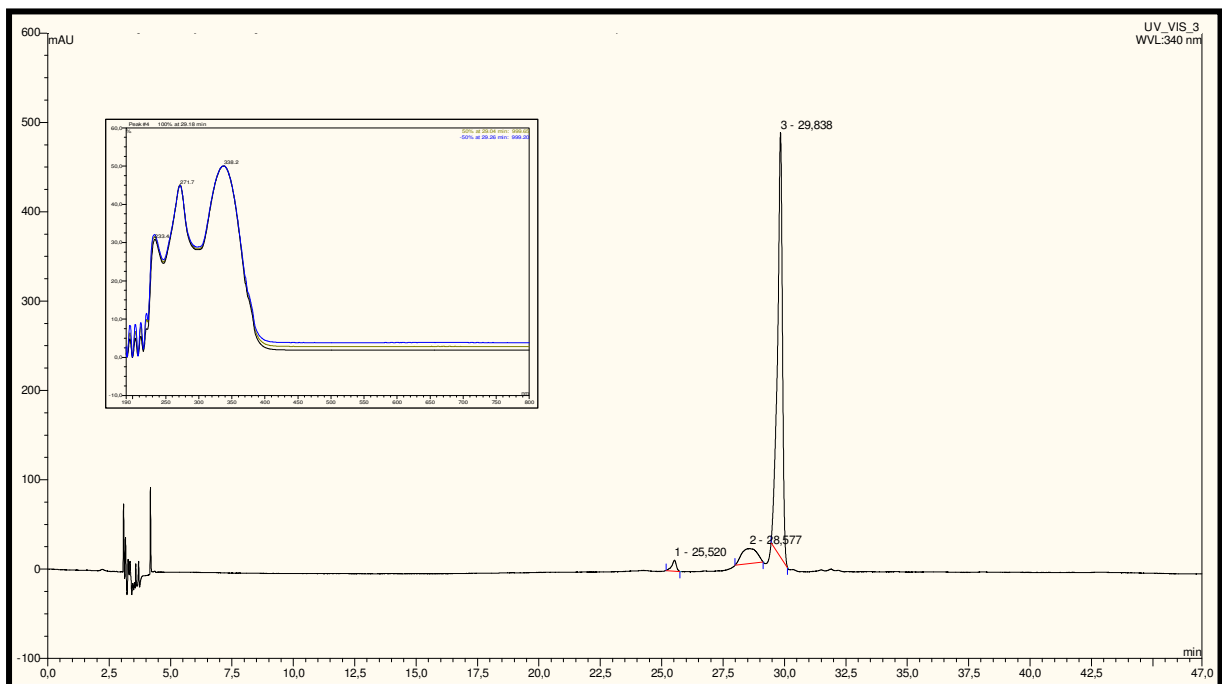
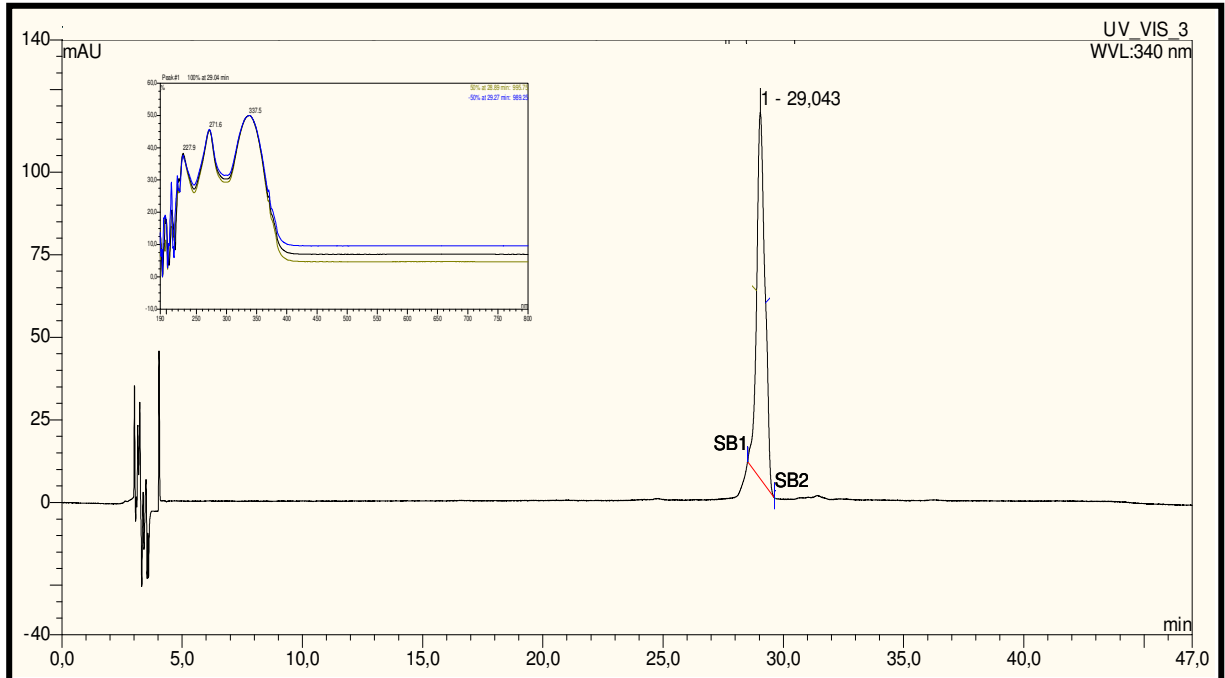
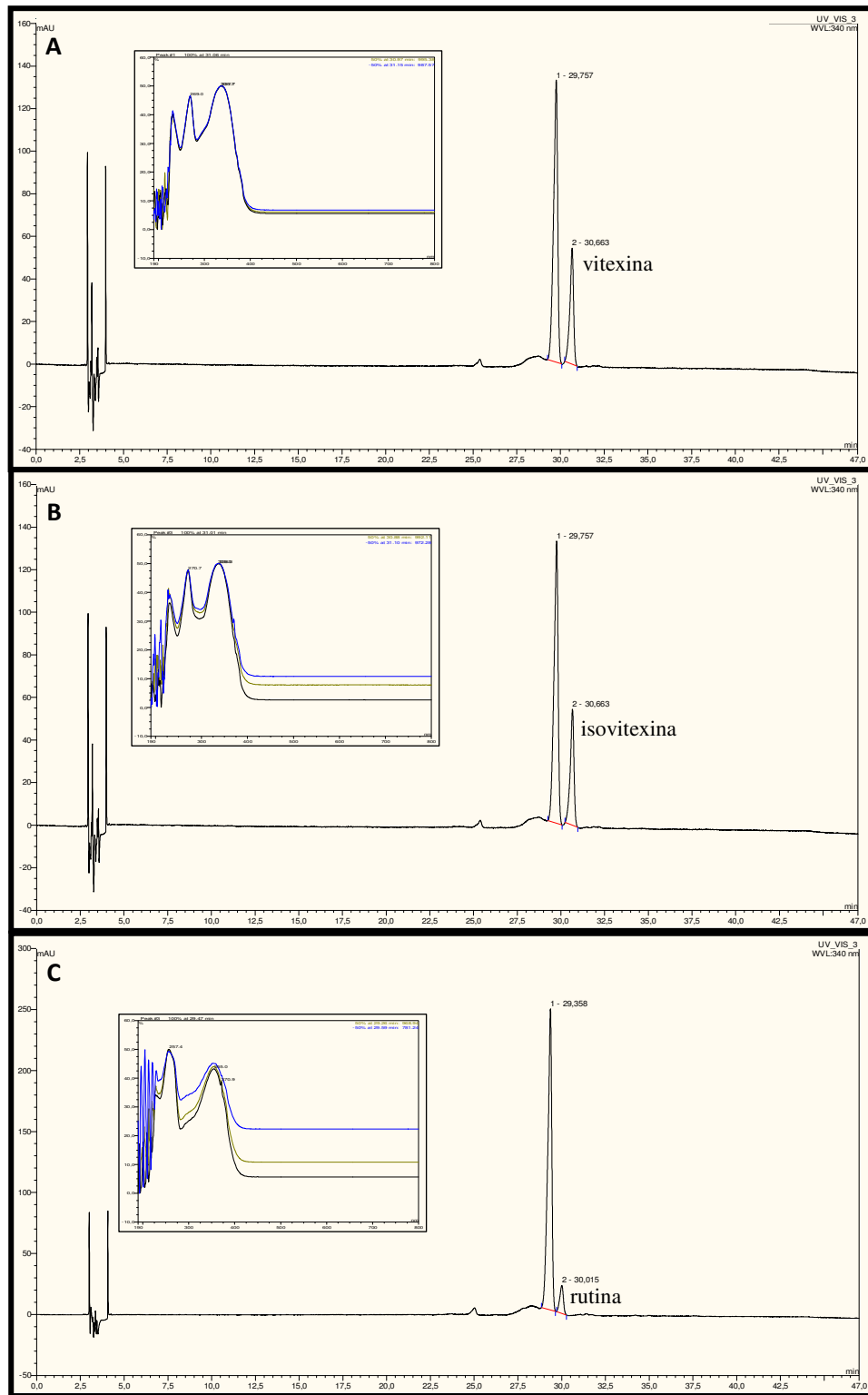


Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE de extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro*, com detecção em UV_{340nm}.



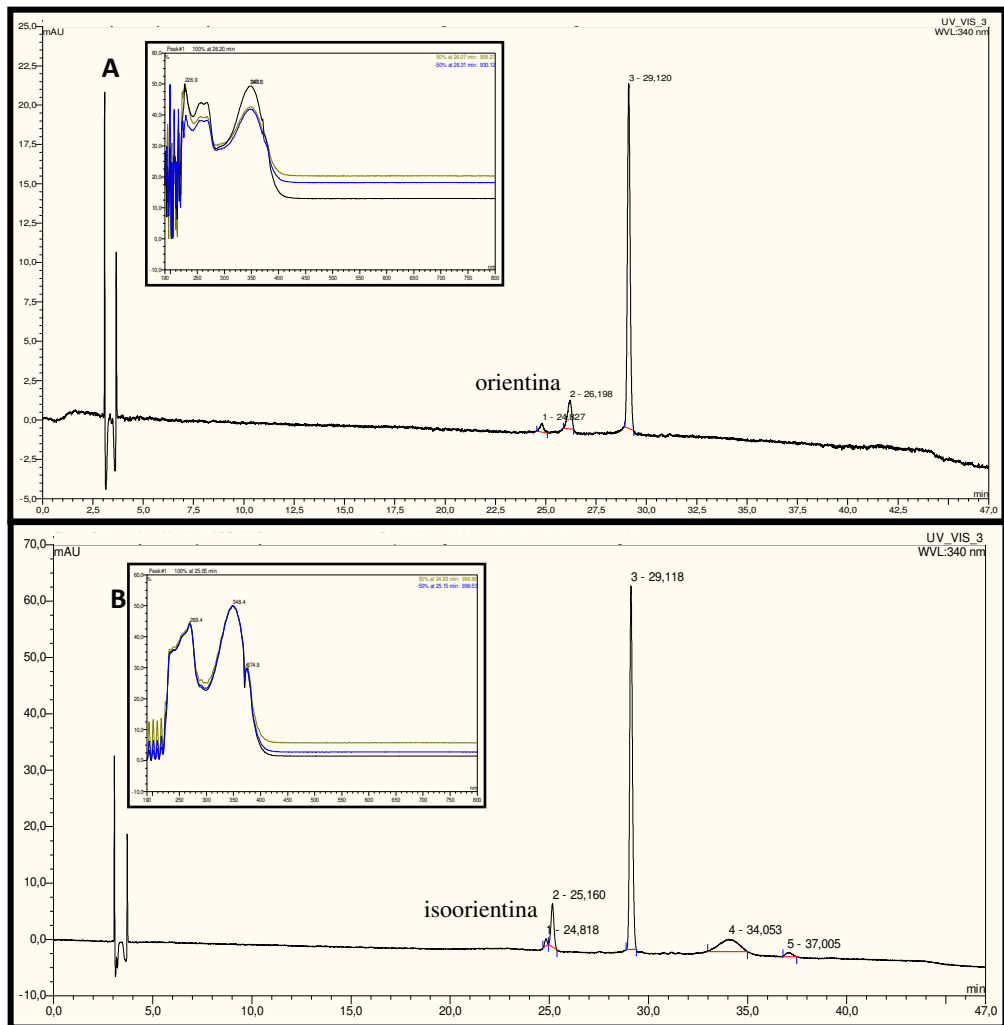
Visando à identificação dessas substâncias, foram realizadas coinjeções dos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* com padrões dos flavonoides C-glicosídeos vitexina, isovitexina, rutina, orientina e isoorientina (Figuras 15 e 16), nas mesmas condições cromatográficas. Foram observados novos picos, em diferentes tempos de retenção, indicando que as substâncias presentes nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* não correspondem aos flavonoides analisados.

Figura 15 - Cromatogramas de coinjeções de padrões de flavonoides em extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*, com detecção em UV_{340nm}.



Legenda: (A) Vitexina; (B) Isovitecina; (C) Rutina.

Figura 16 - Cromatogramas de coinjeções de padrões de flavonoides em extrato de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*, com detecção em UV_{340nm}

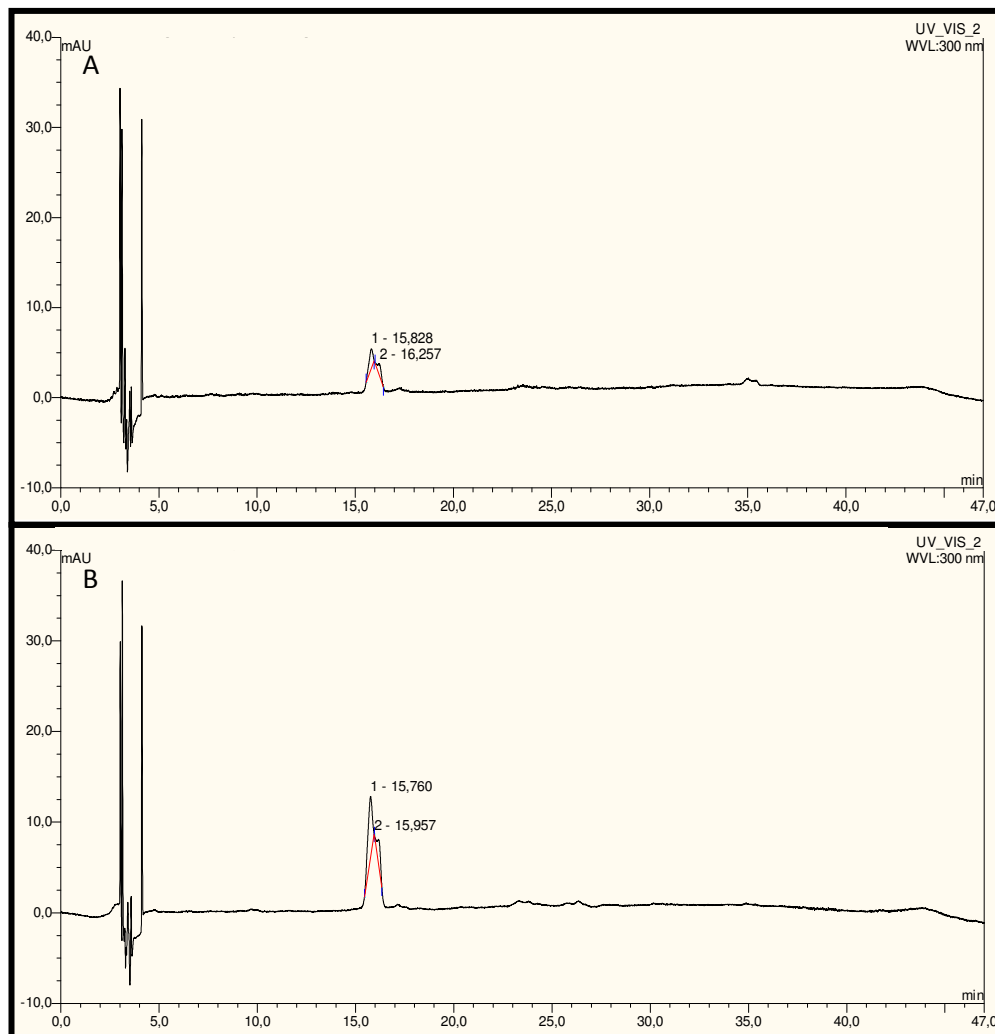


Legenda: (A) Orientina; (B) Isoorientina.

5.3.2.2. Análise de extratos de raízes

As análises cromatográficas dos extratos de raízes primárias e secundárias de plantas mantidas *in vivo* permitiram a detecção de dois picos em cada amostra, com tempos de retenção de 15,8 e 16,2 minutos, e 15,7 e 15,9 minutos, respectivamente, quando analisados a 300 nm (Figura 17). As semelhanças dos picos sugerem se tratar das mesmas substâncias, nos dois extratos. Não foram detectados picos de absorção nos outros comprimentos de onda analisados (dados não mostrados).

Figura 17 - Cromatogramas por CLAE de extratos de raízes de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*.

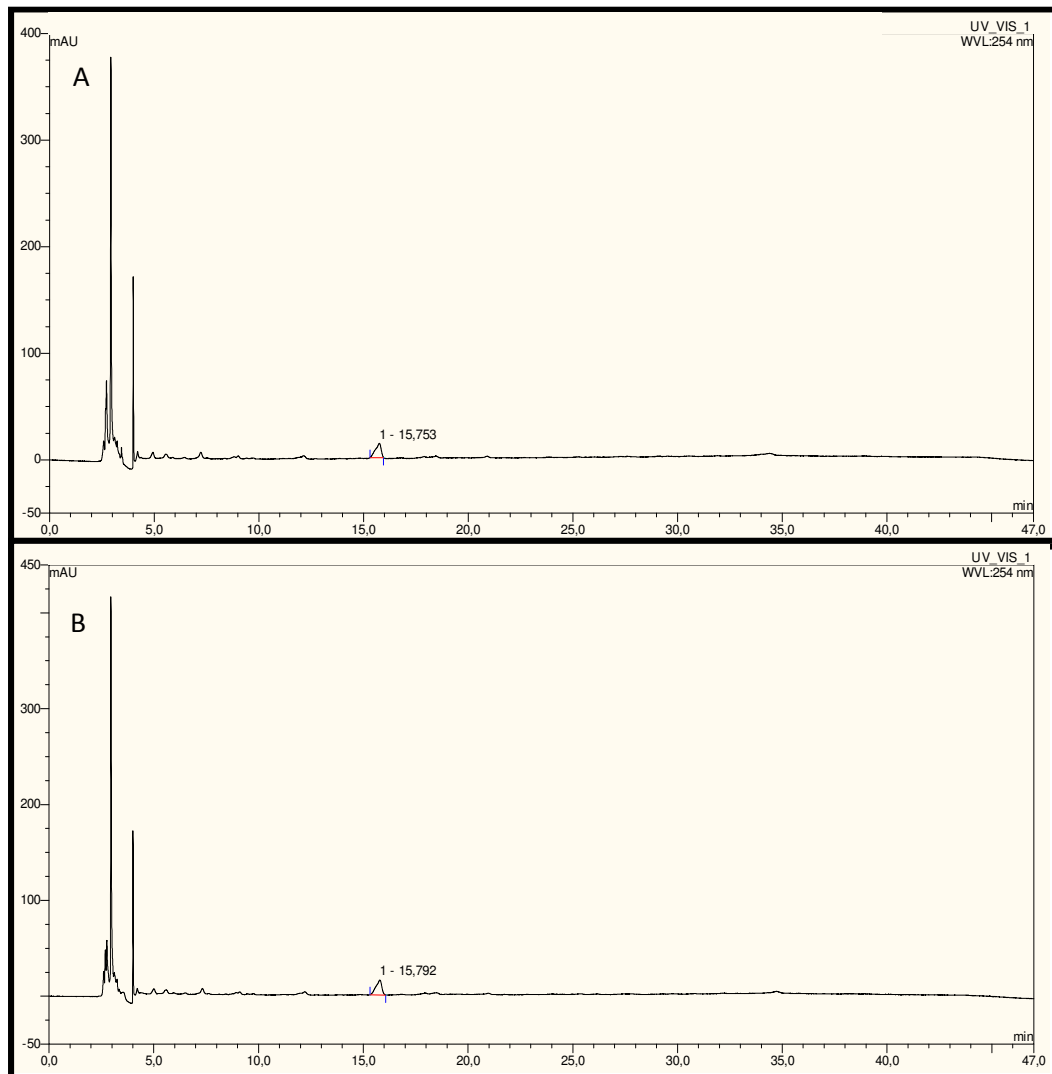


Legenda: (A) Raízes primárias (B) Raízes secundárias. Leitura em UV_{300nm}.

Os cromatogramas dos extratos de raízes de plantas *in vitro* e de raízes adventícias formadas a partir segmentos internodais na presença de ANA estão representados na Figura 18. Foram observados perfis cromatográficos semelhantes, com o aparecimento de um único picode absorção em 254 nm e tempos de retenção de 15,7 minutos, respectivamente (Figura 18- A, B). Por outro lado, não foi observada a formação de picos quando as mesmas amostras foram analisadas nos outros comprimentos de onda (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que os picos observados não são característicos de flavonoides, uma vez que sua absorção ocorreu somente a 254 nm.

Não foi observada a formação de picos nas análises dos extratos de raízes adventícias obtidas a partir de segmentos radiculares em resposta a AIA.

Figura 18 - Cromatogramas por CLAE de extratos de raízes de *P. pohlii* obtidas *in vitro*.



Legenda: (A) Raízes de plantas mantidas *in vitro* (B) Raízes adventícias formadas a partir segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com 2,7 μ M de ANA. Leitura em UV_{254nm}.

5.3.3. Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

A fim de identificar a estrutura da substância detectada por CLAE-UV-DAD nos extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*, foram realizadas análises por CLAE-UV-IES-EM.

Após a detecção por UV, as amostras foram direcionadas para análise em espectrômetro de massas. Os cromatogramas de íons totais (CIT) obtidos dos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro* indicaram a presença de dois picos em cada amostra, com tempos de retenção semelhantes (54,0 e 54,6 minutos, e 54,0 e 54,4 minutos, respectivamente) (Figuras 19 e 20), os quais foram relacionados às substâncias detectadas por CLAE-UV-DAD. Além disso, foram detectados dois outros picos no extrato de plantas mantidas *in vivo*, com tempos de retenção de 2,03 e 51,9 minutos (Figura 19), respectivamente, os quais não foram detectados no extrato de folhas de plantas obtidas *in vitro* (Figura 20).

Figura 19 - Cromatogramas de íons totais (CITs) dos extratos de folhas excisadas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*, obtido por CLAE-UV-ESI-EM.

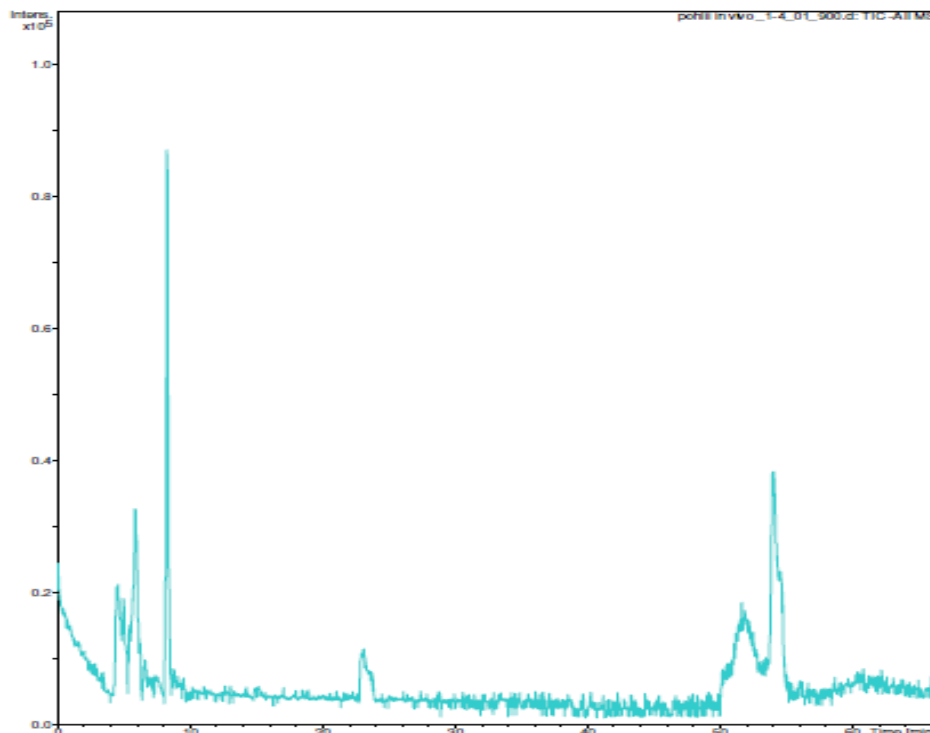
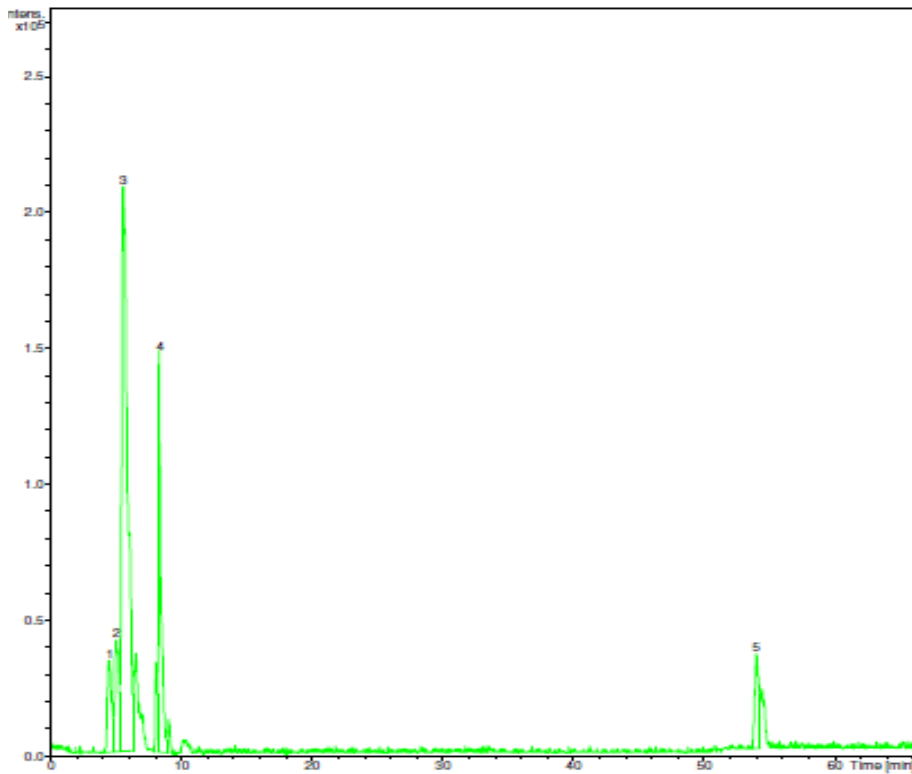


Figura 20 - Cromatogramas de íons totais (CITs) dos extratos de folhas excisadas de plantas de *P. pohlii* obtidas *in vitro*, obtido por CLAE-UV-ESI-EM.



A fragmentação dos dois picos detectados em cada extrato revelou a mesma massa molecular indicada pelo pico base (aproximadamente 607,2) (Figuras 21 e 22). Além disso, os espectros de massas das duas substâncias detectadas em ambos os extratos foram semelhantes, apresentando os mesmos picos de íon molecular $[M-H]^-$ em m/z 607,2 e o mesmo padrão de fragmentação. Os fragmentos mais abundantes obtidos a partir do extrato de folhas de plantas mantidas *in vivo* foram $[M-H-320]^-$ com m/z 287, $[M-H-324]^-$ com m/z 283, $[M-H-352]^-$ com m/z 255 e $[M-H-450]^-$ com m/z 157. Destes, apenas o fragmento $[M-H-320]^-$ com m/z 287 não foi obtido no extrato de folhas de plantas obtidas *in vitro* (Tabela 3).

Figura 21 - Espectros de massa dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo*, pela análise de CLAE-UV-ESI-EM.

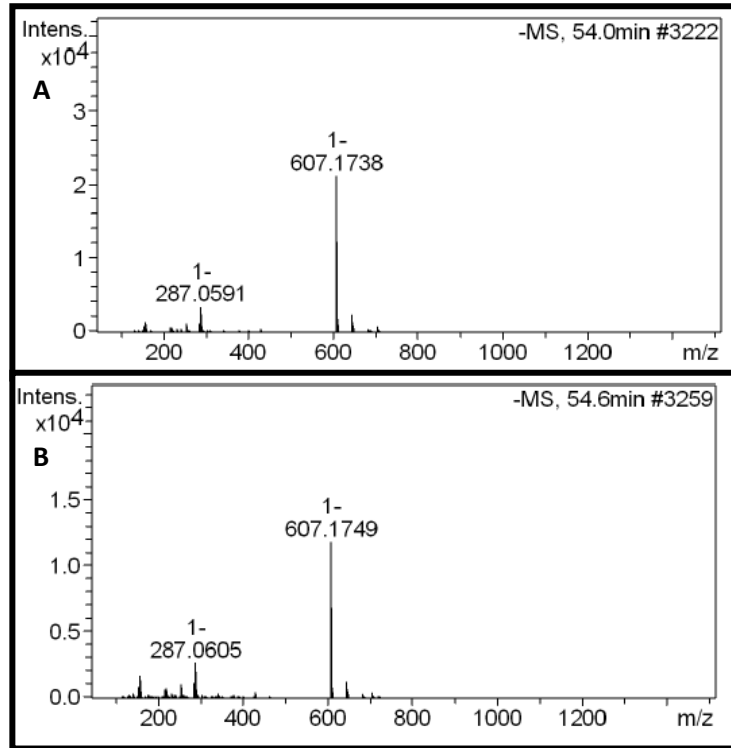


Figura 22 - Espectros de massa dos extratos obtidos a partir de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vitro*, pela análise de CLAE-UV-ESI-EM.

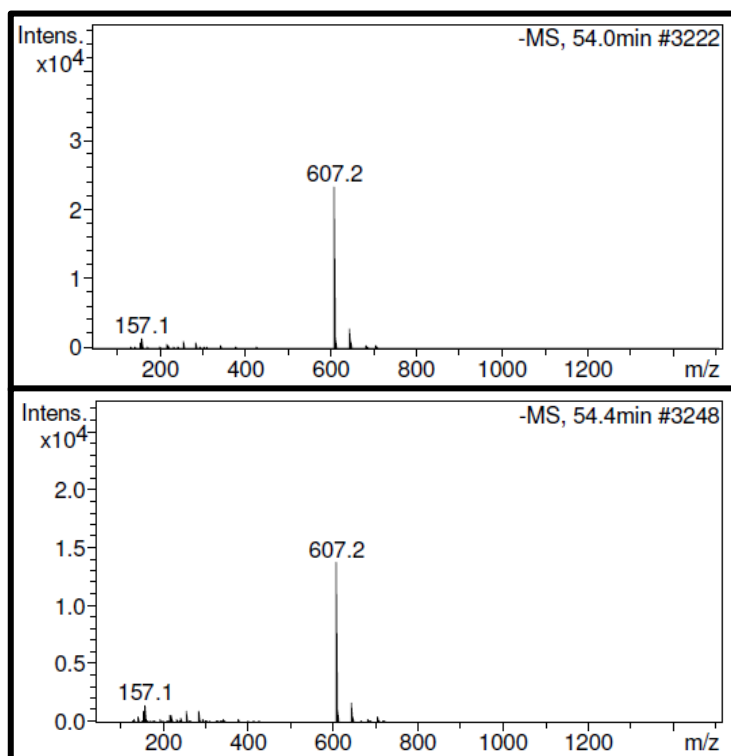


Tabela 3 – Padrão de fragmentação das substâncias detectadas por CLAE-UV-ESI-EM, em extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*.

		tR (min)	[M-H] ⁻ m/z	HPLC-ESI-MS m/z
Folhas <i>in vivo</i>	Substância #1	54,0	607,1738	157; 255; 283; 287; 607
	Substância #2	54,6	607,1749	157; 255; 283; 287; 607
Folhas <i>in vitro</i>	Substância #1	54,0	607,2	157; 255; 283; 607
	Substância #2	54,4	607,2	157; 255; 283; 607

Legenda: tR = tempo de retenção

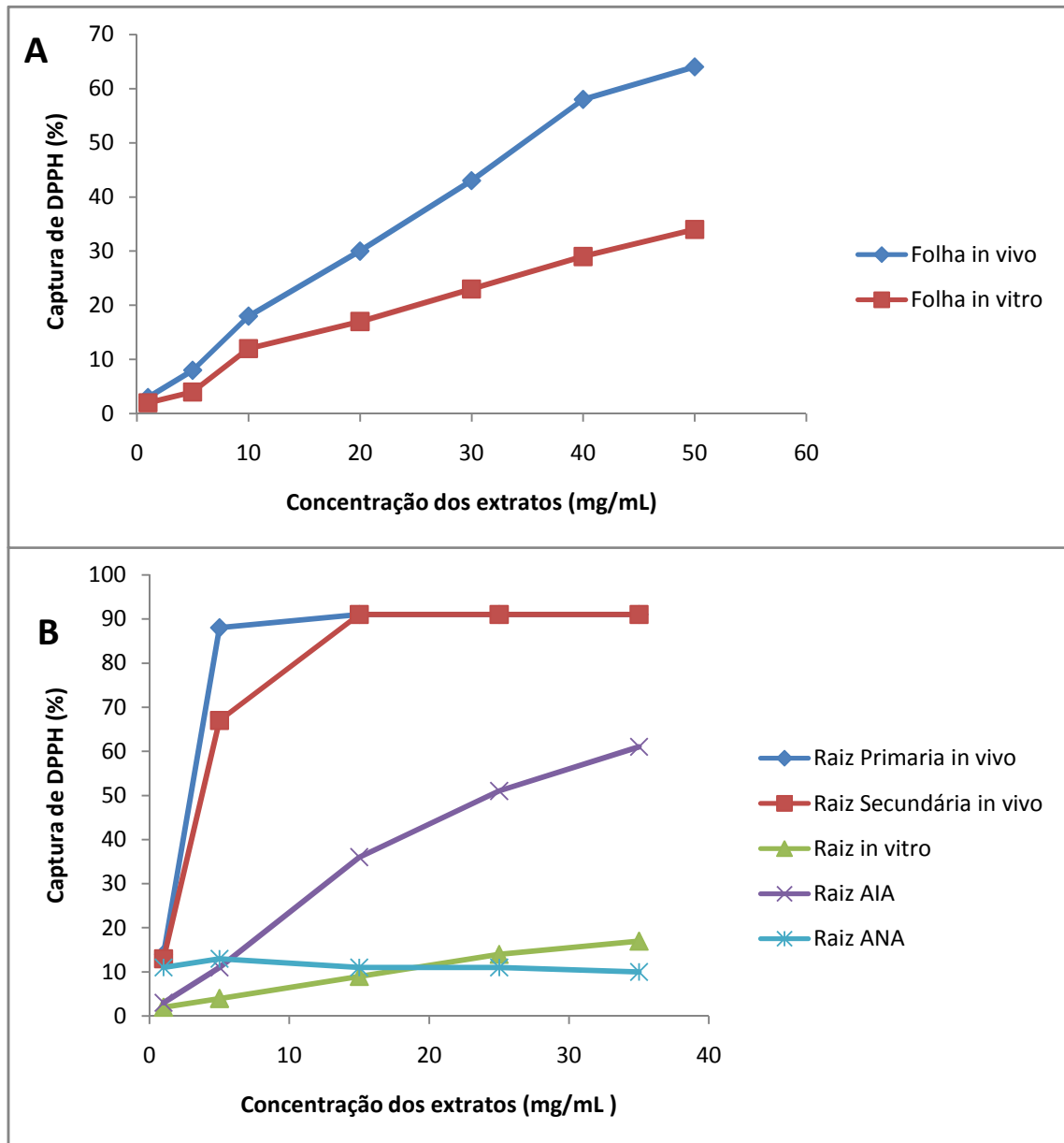
5.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

5.4.1. Ensaio DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de diferentes materiais de *P. pohlii* revelou a existência de substâncias com potencial antioxidante, evidenciada pela redução do radical DPPH, em todas as amostras testadas (Figura 23).

Os valores de CE₅₀ variaram de 0,18 a 446,70 gL⁻¹ (Tabela 4). Os maiores potenciais antioxidantes foram observados em extratos de raízes primárias e secundárias de plantas mantidas *in vivo*, com valores de CE₅₀ de 0,18 e 3,05 gL⁻¹, respectivamente (Tabela 4). Por outro lado, a menor ação antioxidante foi observada no extrato de raízes obtidas a partir de segmentos internodais cultivados em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μM (CE₅₀ = 446,7 gL⁻¹).

Figura 23 - Porcentagem de captura do radical DPPH por extratos de folhas e raízes de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e *in vitro*.



Legenda: (A) Folhas de plantas mantidas *in vivo* e *in vitro*. (B) Extratos de raízes primárias e secundárias de plantas mantidas *in vivo*, raízes de plantas mantidas *in vitro*, raízes obtidas a partir de segmentos radiculares cultivados em meio MSM suplementado com AIA a 2,85 μM e raízes obtidas a partir de segmentos caulinares cultivados em meio MSM suplementado com ANA a 2,7 μM .

Tabela 4 - Potencial antioxidante de diferentes materiais vegetais de *P. pohlii* obtidos *in vivo* ou produzidos *in vitro*.

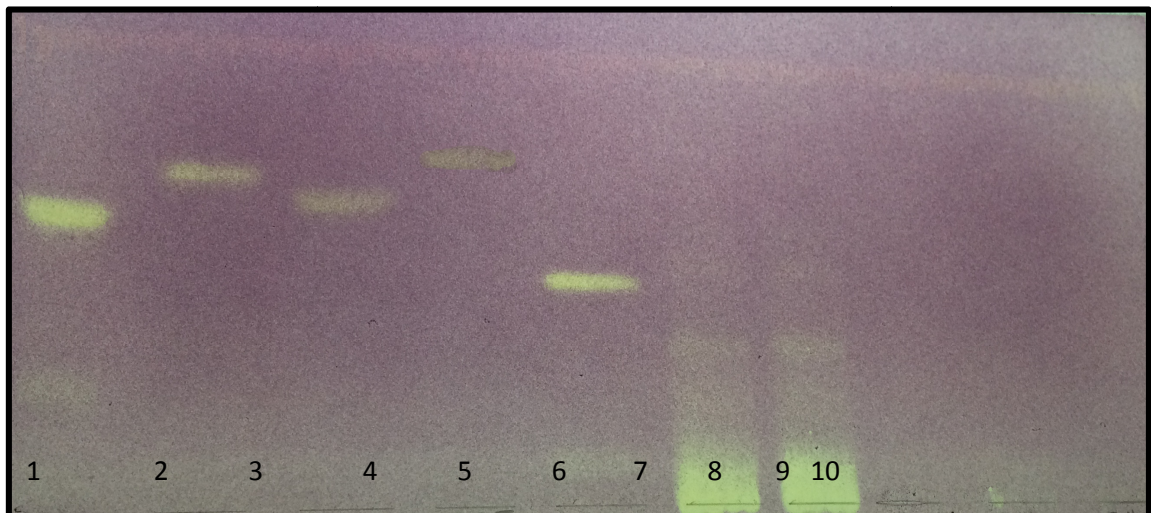
Amostras	Concentração (gL⁻¹)	Captura (%)	CE₅₀ (gL⁻¹)
Folhas obtidas <i>in vivo</i>	1-50	3-64	36,35
Folhas obtidas <i>in vitro</i>	1-50	2-34	72,49
Raízes primárias obtidas <i>in vivo</i>	1-35	14-91	0,18
Raízes secundárias obtidas <i>in vivo</i>	1-35	21-91	3,07
Raízes obtidas <i>in vitro</i>	1-35	2-17	106,41
Raízes adventícias derivadas de segmentos caulinares	1-35	11-13	446,70
Raízes adventícias derivadas de segmentos radiculares	1-35	3-61	26,23

5.4.2. Análise qualitativa por CCD-DPPH

Para a análise qualitativa do potencial antioxidante dos extratos de diferentes materiais de *P. pohlii*, foram realizadas análises utilizando a metodologia de CCD-DPPH. Após a separação dos compostos em placas de CCD utilizando fases móveis específicas para flavonoides e saponinas, a capacidade de captura do radical DPPH foi determinada *in situ*.

Na análise para flavonoides foi possível observar que, embora os padrões utilizados tenham apresentado ação antioxidante, evidenciada por bandas amarelas sobre o fundo arroxado, o mesmo não foi observado nas substâncias previamente detectadas nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro* (Figura 24).

Figura 24 - Perfil cromatográfico para a avaliação da atividade antioxidante de flavonoides em diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*.



Legenda: (1) isorientina ($R_F = 0,65$), (2) orientina ($R_F = 0,7$), (3) isovitexina ($R_F = 0,68$), (4) vitexina ($R_F = 0,77$), (5) rutina ($R_F = 0,55$), (6) raízes secundárias de plantas mantidas *in vivo*, (7) raízes primárias de plantas mantidas *in vivo*, (8) raízes de plantas mantidas *in vitro*, (9) folhas de plantas mantidas *in vivo* (10) folhas de plantas mantidas *in vitro*. Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26 v/v). Revelação com 0,2% DPPH.

Na análise para saponinas, os extratos de raízes primárias e secundárias mantidas *in vivo* apresentaram elevada atividade antioxidante (Figura 25), corroborando os resultados já observados no ensaio de DPPH. Foram visualizadas duas manchas amarelas com alta intensidade em ambas as amostras, uma na base da placa e outra com $R_F = 0,2$, indicando que a capacidade antioxidante apresentada por esses extratos está associada à presença dessas substâncias altamente polares. Foram observadas ainda pequenas manchas amarelas, também na base da placa, nos extratos de folhas de plantas mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*. Por outro lado, não foram visualizadas bandas amarelas no extrato de raízes de plantas mantidas *in vitro*, raízes obtidas de segmentos internodais cultivados em meio MSM sólido suplementado com ANA a $2,7\mu\text{M}$ e raízes obtidas de segmentos radiculares cultivados em meio MSM líquido suplementado com AIA a $2,85\mu\text{M}$ (dados não mostrados).

Figura 25 - Perfil cromatográfico para avaliação da atividade antioxidante de possíveis saponinas em extratos de diferentes materiais vegetais de *P. pohlii*.



Legenda: (1) Raízes secundárias de plantas mantidas *in vivo*, (2) Raízes primárias de plantas mantidas *in vivo*, (3) Raízes de plantas mantidas *in vitro*, (4) Folha de plantas mantidas *in vivo*, (5) Folhas de plantas mantidas *in vitro*. Fase móvel: clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8 v/v). Revelação com 0,2% DPPH.

6. DISCUSSÃO

Técnicas de biotecnologia vegetal baseadas na cultura de células, tecidos e órgãos vegetais constituem ferramentas importantes para a produção de metabólitos secundários de interesse (BAQUE et al., 2012). Entre essas técnicas, as culturas de raízes adventícias são bastante utilizadas, uma vez que esses órgãos são fontes potenciais de uma grande diversidade de moléculas bioativas (BAIS et al., 2001; FLORES; VIVANCO; LOYOLA-VARGAS, 1999), constituindo uma via segura para a sua produção. Além disso, quando comparadas às culturas desorganizadas, como as suspensões celulares, as raízes adventícias são consideradas mais estáveis nas condições de desenvolvimento, além de acumular maior quantidade de metabólitos secundários nos espaços intercelulares, o que torna mais fácil seu isolamento (SIVAKUMAR, 2006).

As culturas de raízes adventícias podem ser realizadas através do processo de transformação ou pela indução de raízes adventícias, por meio da manipulação das condições de cultura. De uma forma geral, os sistemas de indução de raízes não transformadas são mais vantajosos, devido à facilidade de manipulação, sem a necessidade de alterações no genoma da planta (MARTIN et al., 2008). Neste trabalho, foram desenvolvidos protocolos eficientes para a indução de raízes adventícias a partir de segmentos internodais e radiculares de *P. pohlii*, em resposta a ANA e AIA, respectivamente, utilizando diferentes sistemas de cultura.

Embora muitas culturas de raízes adventícias sejam rotineiramente utilizadas para diversas espécies cultivadas *in vitro* e *in vivo*, por meio da utilização de estacas, os mecanismos que controlam a indução de rizogênese são ainda pouco compreendidos (VERSTRAETEN; BEECKMAN; GEELLEN, 2013). De um modo geral, o desenvolvimento dessas raízes é um processo complexo, controlado por sinais hormonais, especialmente por auxinas, e fatores ambientais, envolvendo a rediferenciação celular, na qual células pré-determinadas mudam a rota morfogênética para agir como células-mãe para o primórdio radicular.

Em condições naturais, a formação de raízes adventícias é geralmente precedida por um rápido aumento na concentração de etileno, causado principalmente pela retenção física desse hormônio na raiz submersa, aumentando a sensibilidade do tecido às auxinas endógenas (ZOLMAN; YODER; BARTEL, 2000; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; HASAN; HUSSEIN, 2013). Nas condições *in vitro*, entretanto, a liberação de etileno está relacionada às

injúrias mecânicas causadas pela excisão de explantes, fornecendo então o estímulo necessário para a captação das auxinas endógenas e exógenas para a formação de tecidos desorganizados ou de raízes e brotos adventícios (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Além da formação de raízes laterais, as auxinas estão associadas a vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o desenvolvimento vascular, dominância apical, fototropismo e gravitropismo. A auxina endógena mais abundante é o AIA, e seu papel *in vivo* já foi exaustivamente estudado. Mais recentemente, foi observado que o AIB também ocorre naturalmente em algumas espécies (ZOLMAN, YODER, BARTEL; 2000). Essas auxinas, juntamente com ANA, são as mais amplamente utilizadas para a indução de raízes adventícias a partir de diferentes tipos de explantes, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* (POP; PAMFIL; BELLINI, 2011).

Embora grande parte dos trabalhos aponte a auxina AIB como a mais eficiente para indução de rizogênese, independente do tipo de explante utilizado (LUDWIG-MÜLLER; VERTOCNIK; TOWN, 2005; ROUT, 2006; LING et al., 2009; HASAN; HUSSEIN, 2013; PAZ et al., 2013; MARTÍNEZ-BONFIL et al., 2014), no presente estudo, as maiores taxas de formação de raízes adventícias a partir de explantes caulinares e radículas foram observadas em resposta a ANA e AIA, respectivamente, em diferentes concentrações e sistemas de cultura. No entanto, as raízes adventícias obtidas a partir de ambos os explantes em meio de cultura suplementado com ANA eram morfologicamente diferentes daquelas obtidas em resposta a AIA ou AIB, sendo mais grossas e curtas, com ocasional formação de calos. Estes mesmos aspectos foram observados em culturas de raízes adventícias de *Decalepis arayalpathra* (SUDHA; SEENI, 2001) e *Cichorium intybus* L. (NANDAGOPAL; KUMARI, 2007).

O aumento da eficiência de indução de rizogênese pela ausência de luz foi outro aspecto importante observado neste trabalho, com exceção dos segmentos internodais cultivados em meio líquido sob agitação suplementado com ANA a 2,7 μ M. Este resultado está de acordo com o observado em *Decalepis arayalpathra* (SUDHA; SEENI, 2001), *Eleutherococcus sessiliflorus* (JIN-WOOK; CHA-GYUN; YONG-EUI, 2003) e *Cichorium intybus* L. (NANDAGOPAL; KUMARI 2007), e pode estar associado ao efeito inibidor da luz na modificação da peroxidase e atividade de compostos fenólicos endógenos necessários para o metabolismo das auxinas e indução da rizogênese (DRUART et al., 1982).

No presente trabalho, foram também testados diferentes sistemas para o cultivo *in vitro* de raízes, nos quais as respostas obtidas variaram de acordo com o tipo de explante utilizado.

Segmentos internodais apresentaram a melhor taxa de indução de rizogênese em meio solidificado com ágar, enquanto que segmentos radiculares tiveram maior taxa de proliferação em meio líquido sob agitação.

Culturas desenvolvidas em meio sólido são mantidas estáticas, e por essa razão apenas a região inferior dos explantes fica em contato com o meio de cultura. Contudo, a adição de agentes gelificantes ao meio restringe, de modo geral, o acesso a nutrientes e fitorreguladores, uma vez que os minerais e compostos orgânicos ficam retidos nas malhas formadas por essas substâncias. Além disso, dependendo do tempo de cultura, pode haver ainda a formação de um gradiente de concentração de nutrientes e fatores de crescimento, além do acúmulo de produtos do metabolismo das células, entre o explante e o meio. Dessa forma, a indisponibilidade de nutrientes nas regiões do meio próximas aos explantes pode ser um fator importante para estimular o desenvolvimento de raízes nas plantas e/ou explantes cultivados *in vitro* (BLIDAR; ARDELEAN; TURCUS, 2001; GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008) e pode estar relacionada às altas taxas de rizogênese observadas neste trabalho a partir de segmentos internodais de *P. pohlii* cultivados em meio solidificado com ágar.

Contudo, para a multiplicação das raízes adventícias obtidas a partir dos segmentos internodais em meio sólido, e também para a proliferação dos segmentos radiculares excisados de plantas *in vitro* de *P. pohlii*, os sistemas líquidos de cultura mostraram-se mais adequados. O sucesso na utilização de sistemas líquidos de cultura tem sido relatado por diversos autores (VINOCUR et al., 2000; SUDHA; SEENI, 2001; BETSUI; TANAKA-NISHIKAWA; SHIMOMURA, 2004; NANDAGOPAL; KUMARI, 2007; GOEL; KUKREJA; BISHT, 2009; CUI et al., 2010; HUANG et al., 2010; CUI et al., 2011), e pode ser atribuído à melhor disponibilidade de água e nutrientes para os explantes (ADELBERG; TOLER, 2004).

Embora a maior capacidade de proliferação de segmentos radiculares tenha sido obtida em meio líquido mantido sob agitação, possivelmente devido à maior aeração, à redução dos efeitos da polaridade dos explantes na morfogênese e à diluição dos exsudatos tóxicos dos explantes (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008), as raízes adventícias obtidas a partir de segmentos internodais apresentaram as melhores taxas de multiplicação em meio dupla-fase. Este comportamento pode estar relacionado com a necessidade de um suporte físico, oferecido pela camada basal de meio sólido, o que permite que os explantes não fiquem totalmente submersos no meio, facilitando ainda as trocas gasosas entre os tecidos e o ambiente de cultura (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Outra vantagem do sistema dupla-fase é a redução da manipulação durante o cultivo *in vitro*, uma vez que é possível adicionar apenas meio líquido fresco, eliminando a necessidade de realização de subculturas periódicas (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). A utilização de sistemas de dupla-fase já foi relatada com sucesso para a micropropagação de pêra japonesa (KADOTA; IMIZU; HIRANO, 2001), porta-enxertos de macieira (MACHADO; CARVALHO; BIASI, 2004) e abacaxi (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

O sistema de pontes de papel filtro sobre meio líquido também atua como um suporte físico, permitindo que os explantes fiquem parcialmente em contato com o meio de cultura líquido, realizando trocas gasosas em taxas adequadas. Entretanto, neste trabalho, o sistema de pontes de papel filtro não se mostrou tão eficaz quando comparado à utilização do meio dupla-fase, provavelmente devido ao papel filtro funcionar como uma barreira física, dificultando a captação de nutrientes e reguladores de crescimento do meio de cultura (DE LA VIÑA; BARCELÓ-MUÑOZ; PLIEGO-ALFARO, 2001). Resultados similares foram descritos por Savio, Astarita e Santarém (2012) para a micropropagação de *Hypericum perforatum* L., onde os explantes cultivados em meio sob pontes de papel de filtro apresentaram baixas taxas de desenvolvimento e multiplicação, ocorrendo necrose do tecido.

O material botânico produzido *in vitro* neste trabalho, incluindo plantas completas e raízes adventícias obtidas a partir de segmentos internodais e radiculares, assim como plantas obtidas *in vivo*, foi utilizado para a produção de extratos etanólicos para a avaliação do perfil fitoquímico e da atividade antioxidante de *P. pohlii*.

Diversos compostos bioativos já foram descritos em espécies da família Passifloraceae, incluindo alcaloides, saponinas e polifenóis, sendo predominantes os flavonoides C-glicosídeos (OGA et al., 1984; MORAES; VILEGAS; LANÇAS, 1997; PETRY et al., 2001). Flavonoides e saponinas são consideradas substâncias adequadas para serem utilizadas como marcadores químicos no gênero devido a sua grande diversidade estrutural e estabilidade química, possibilitando a diferenciação entre espécies semelhantes e a autenticação de amostras através da detecção de adulterações (GOSMANN et al., 2011). A detecção e identificação dessas substâncias têm sido realizadas principalmente por meio de análises cromatográficas, incluindo CCD, CLAE e CLAE-EM.

Neste trabalho, a CCD foi utilizada como técnica preliminar para a detecção de flavonoides e saponinas em extratos de diferentes materiais vegetais de *P. pohlii* por ser considerada uma técnica rápida, de baixo custo e fácil execução e interpretação, permitindo

ainda a análise simultânea de várias amostras (BIRK; PROVENSI; GOSMANN, 2005). A resolução da corrida foi otimizada utilizando diferentes sistemas de solventes visando à melhor caracterização do perfil cromatográfico dos extratos. Além disso, para a análise de possíveis flavonoides, foram utilizados ainda dois reveladores distintos: vanilina-ácido sulfúrico e NP/PEG.

A utilização de vanilina-ácido sulfúrico revelou um perfil cromatográfico diferente do obtido com a revelação por NP/PEG, com o surgimento de bandas não reveladas anteriormente. Embora ambos reveladores sejam utilizados rotineiramente para a análise de flavonoides, a solução de vanilina-ácido sulfúrico é capaz de revelar uma gama maior de constituintes, permitindo também a detecção de terpenoides e fenilpropanoides (WAGNER; BLADT, 2001). Entretanto, as bandas indicativas de flavonoides detectadas nos extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e daquelas produzidas *in vitro*, caracterizadas pela coloração amarela, não puderam ser relacionadas aos padrões de flavonoides utilizados, independente do tipo de revelador.

A revelação com NP/PEG em UV_{365nm} permite a visualização de bandas de diferentes colorações, dependendo do flavonoide detectado. De um modo geral, os derivados de luteolina, como a orientina e a isoorientina, apresentam fluorescência laranja, enquanto que os derivados de apigenina (isovitexina e vitexina) apresentam coloração amarelo esverdeada, e a quercetina e seus derivados, como a rutina, são laranja-amarelados (MARSTON; HOSTETTMANN, 2006). Dessa forma, embora não tenha sido possível associar o flavonoide encontrado nos extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* aos padrões analisados, o mesmo pode ser considerado um derivado de apigenina, pois apresentou coloração semelhante a dos padrões de vitexina e isovitexina. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores com outras espécies de *Passiflora*, que descrevem a grande ocorrência de derivados glicosilados de apigenina e luteolina no gênero (PEREIRA; VILEGAS, 2000).

Os métodos de CLAE oferecem vantagens em relação à CCD por serem mais específicos e, portanto, mais precisos. Diversos trabalhos com espécies de *Passiflora* descrevem com sucesso a utilização da CLAE como método quantitativo para a avaliação de compostos bioativos (GOSMANN et al., 2011).

A análise cromatográfica por CLAE dos extratos de folhas de plantas de *P. pohlii* obtidas *in vivo* e produzidas *in vitro* indicou a presença de duas substâncias caracterizadas como flavonoides, por apresentarem padrões característicos de absorção em UV. Visando então à identificação dessas substâncias, foram realizadas coinjeções com padrões de

flavonoides já descritos no gênero. Entretanto, assim como o ocorrido anteriormente na análise por CCD, não foi possível associar as substâncias presentes nos extratos de folhas aos padrões testados.

Os cromatogramas dos extratos de raízes primárias e secundárias excisadas de plantas mantidas *in vivo* de *P. pohlii* apresentaram picos de absorção significativos, com tempos de retenção semelhantes, indicando serem as mesmas substâncias. No entanto, como não apresentaram absorbância a UV_{340nm}, as mesmas não foram caracterizadas como flavonoides. Esses resultados, associados aos observados anteriormente nas análises cromatográficas por CCD, sugerem que essas substâncias pertencem, provavelmente, ao grupo das saponinas. Embora a utilização de padrões seja uma estratégia eficiente e bastante utilizada para a identificação de flavonoides em *Passiflora* (CHABARIBERI et al., 2009), as análises quantitativas de saponinas em espécies do gênero foram apenas realizadas por Reginatto et al. (2004), que determinaram a quantidade da saponina quadrangulosídeo em extratos aquosos de folhas de *P. alata*.

Para a investigação da estrutura dos flavonoides detectados por CLAE-UV/DAD nos extratos de folhas excisadas de plantas de *P. pohlii* obtidas *in vivo* e produzidas *in vitro*, foram realizadas análises por CLAE-EM. Esta técnica é considerada uma ferramenta bastante útil para a análise de produtos naturais, já que pode fornecer informações significativas sobre a estrutura dos compostos, por meio da massa molecular dos diferentes constituintes de misturas complexas. Além disso, a CLAE-EM pode ser utilizada ainda para determinar a ocorrência de compostos anteriormente identificados, reduzindo os esforços necessários para seu isolamento (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

Apesar de possuir um detector menos seletivo que a CLAE, a técnica de CLAE-EM tem se mostrado bastante eficiente para a análise de flavonoides em plantas, pois além de determinar a massa molecular, pode fornecer ainda outras informações, como a estrutura da aglicona e os tipos de carboidratos presentes na molécula (mono, di, tri ou oligossacarídeos, e hexoses, deoxihexoses ou pentoses), além de detectar a presença de outros substituintes, ligações interglicosídicas e os pontos de ligação dos substituintes na aglicona (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). No gênero *Passiflora*, a técnica de CLAE-EM e suas variações já foram amplamente utilizadas para a descrição e identificação de diversos flavonoides (PEREIRA; YARIWAKE; MCCULLAGH, 2005; ICHMURA et al., 2006; WOHLMUTH et al., 2010; ZUCOLOTTO et al., 2011; SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2012; SIMIGIOTIS et al., 2013).

Neste trabalho, a análise por CLAE-UV-ESI-EM indicou a presença de duas substâncias, possivelmente flavonoides, como observado na análise por CLAE-UV-DAD, tanto no extrato de folhas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e quanto no extrato de folhas obtidas *in vitro*. Estas duas substâncias, além de possuírem a mesma massa molecular, apresentaram ainda padrões de fragmentação semelhantes, podendo ser considerados isômeros. Os fragmentos significativos obtidos em ambos os extratos são também comumente encontrados nos padrões de fragmentação de outros flavonoides, como os fragmentos de m/z 255 e 283, este último observado também em vitexina e isovitexina (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; HARBAUM et al., 2007; YE et al., 2011; ZUCOLOTTO et al., 2011; LI; GAO; LI, 2011). De acordo com Pereira e Vilegas (2000), a presença de isômeros de flavonoides C-glicosilados é bastante comum no gênero *Passiflora*.

Apesar da grande sensibilidade e precisão, os métodos de EM disponíveis atualmente raramente permitem a elucidação estrutural completa das amostras analisadas. Assim, a combinação da EM com outras técnicas, como CLAE-UV e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), constituem métodos alternativos para a identificação de substâncias polifenólicas complexas (CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

A análise da capacidade antioxidante de diferentes materiais de *P. pohlii* foi um outro aspecto estudado, pela primeira vez, neste trabalho. O potencial antioxidante de extratos de outras espécies de *Passiflora* já foi confirmado em ensaios *in vitro* (ALI et al., 2010; RUDNICKI et al., 2007a) e *in vivo* (RUDNICKI et al., 2007b; RASOOL et al., 2011; SILVA et al., 2013) e associado à presença dos flavonoides C-glicosídeos. Esses antioxidantes naturais, que podem apresentar grande diversidade estrutural, vêm sendo muito utilizados nos últimos anos devido aos seus efeitos biológicos benéficos, principalmente a prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (KRIS-ETHERTON et al., 2002; NILSSON et al., 2005). Além disso, são também explorados pela indústria de cosméticos (GESZTESI; LUZ, 2007).

Para a determinação do potencial antioxidante de extratos vegetais *in vitro*, diversas técnicas tem sido utilizadas, sendo o ensaio de determinação da capacidade de captação do radical livre DPPH mais comum. Este ensaio baseia-se na capacidade de redução do DPPH, o que gera o composto 2-(4-hidroxifenil)-2-fenil-1-picrilhidrazina, pela ação de antioxidantes presentes no extrato. Como o DPPH muda a sua coloração de roxa para amarela durante o processo de redução, é possível quantificá-lo pela medida da absorbância da solução em 515

nm. Dessa forma, é possível também correlacionar a intensidade da cor à concentração de substâncias com potencial antioxidante presentes na amostra.

Em *Passiflora*, o ensaio DPPH já foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante de extratos de folhas (FERRERES et al., 2007; SUNITHA & DEVAKI, 2009; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; SAPTARINI; WARDATI; JULIAWATI, 2013; COLOMEU et al., 2014; LUGATO et al., 2014; RAMAIYA; BUJANG; ZAKARIA, 2014), frutos (ALI et al., 2010; SASIKALA; SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2011; ZERAIK et al., 2012; LÓPEZ-VARGAS et al., 2013; SIMIRGIOTIS et al., 2013; ROTILI et al., 2013; WONG et al., 2014, GIL et al., 2014) e sementes (MALACRIDA; JORGE, 2012), além de materiais obtidos *in vitro* (ANTOIGNONI et al. 2007; LUGATO et al., 2014). Entretanto, existem poucos relatos da avaliação do potencial antioxidante de raízes de espécies do gênero. Sasikala, Saravanan e Parimelazhagan, (2011) utilizaram o ensaio DPPH para avaliar o potencial antioxidante de extratos de raízes de *P. foetida* obtidos com diferentes tipos de solventes, sendo a maior porcentagem de inibição do radical observada com o extrato em éter de petróleo (13,97 %), seguido dos extratos obtidos em etanol (11,52 %) e em água quente (11,20 %). Neste trabalho, a maior atividade antioxidante foi observada nos extratos etanólicos de raízes primárias e secundárias de plantas mantidas *in vivo*, que apresentaram os maiores valores de captura do radical DPPH (91% em ambos os extratos) e, conseqüentemente, os menores valores de EC₅₀ (0,18 e 3,07g L⁻¹ respectivamente).

Uma das principais desvantagens da utilização do método espectrofotométrico para a avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres está associada à impossibilidade de determinar quais as substâncias presentes no extrato são responsáveis pela atividade antioxidante (CIESLA et al., 2012). Dessa forma, o ensaio de DPPH em placas de CCD pode ser utilizado como uma alternativa adequada para a análise qualitativa, pois permite a localização e a identificação de substâncias com potencial capacidade antioxidante (MASOKO; ELOFF, 2007).

A maioria dos ensaios de CCD-DPPH relatados na literatura indica que a atividade antioxidante de extratos vegetais está associada à presença de compostos polifenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Estes compostos são frequentemente associados à atividade antioxidante por atuarem como sequestradores de radicais livres, devido à sua capacidade de doação de hidrogênio ou elétrons (CIESLA et al., 2012). Contudo, a eficiência dos compostos fenólicos como antirradicais e antioxidantes é diversa e depende

de muitos fatores, tais como o número de grupos hidroxilas, o sítio de ligação e o posicionamento destas no anel aromático (SROKA; CISOWSKI, 2003). Neste trabalho, a baixa capacidade antioxidante observada nos extratos de folhas de *P. pohlii* no ensaio de DPPH foi corroborada pela análise qualitativa por CCD-DPPH, uma vez que não foram observadas bandas indicativas de atividade antioxidante nas regiões referentes aos flavonoides detectados anteriormente nestes extratos. Esses resultados podem estar associados à dificuldade dos flavonoides presentes nesses materiais em doar átomos de hidrogênio ao radical, devido ao baixo número de hidroxilas, ou ao fato destas se encontrarem protegidas.

Por outro lado, o menor valor de EC_{50} e, conseqüentemente, a maior atividade antioxidante foi observada nos extratos de raízes primárias e secundárias excisadas de plantas obtidas *in vivo*. Esses fatos foram corroborados pela alta intensidade das bandas detectadas nessas mesmas amostras por CCD-DPPH, nas condições específicas para análise de saponinas. Com base nesses resultados, é possível sugerir que a capacidade de sequestrar radicais livres observada nos extratos de raízes de plantas mantidas *in vivo* de *P. pohlii* está, provavelmente, relacionada à presença de substâncias do grupo das saponinas, cuja atividade antioxidante já foi demonstrada em diversos trabalhos (SUR et al., 2001; FRANCIS et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; ASHRAF et al., 2013; CHEN et al., 2014). Além disso, outras atividades biológicas já foram associadas a essas substâncias, incluindo anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética e antitumoral (CHEN et al., 2014).

As estratégias de cultura de raízes *in vitro* descritas neste trabalho foram aplicadas com sucesso para *P. pohlii*, tendo sido alcançados resultados inéditos para a espécie. Além disso, foram determinadas condições eficientes para análises cromatográficas, por meio de CCD, CLAE e CLAE-EM, do material obtido *in vitro*, assim como de folhas e raízes excisadas de plantas mantidas *in vivo*. Foi detectada a presença de dois flavonoides nos extratos de folhas obtidas de plantas *in vivo* e *in vitro*, possivelmente isômeros, cuja identificação e elucidação estrutural encontram-se em andamento. Adicionalmente, as análises do potencial antioxidante dos diferentes materiais constataram uma relação positiva apenas com a presença de saponinas nos extratos de raízes. Esses resultados são bastante promissores, uma vez que demonstram, pela primeira vez, o potencial farmacológico da espécie.

CONCLUSÕES

- A indução de raízes adventícias a partir de segmentos internodais foi mais eficiente em meio sólido suplementado com ANA a 2,7 μM , após 60 dias de cultura, na ausência de luz. Entretanto, a maior taxa de multiplicação dessas raízes foi observada no sistema de dupla-fase, nas mesmas condições da indução;
- A maior capacidade de proliferação de raízes adventícias a partir de segmentos radiculares foi observada em meio MSM líquido suplementado com AIA a 2,85 μM , na ausência de luz;
- As análises cromatográficas realizadas neste trabalho indicaram a presença de flavonoides e saponinas nos extratos de folhas e raízes, respectivamente, de plantas de *P. pohlii* mantidas *in vivo* e obtidas *in vitro*. A análise por CLAE-UV-ESI-EM indicou ainda a presença de dois flavonoides, possivelmente isômeros, nos extratos de folhas;
- Os extratos das raízes primárias e secundárias excisadas de plantas obtidas *in vivo* apresentaram significativa ação antioxidante, evidenciada pelos ensaios de DPPH e CCD-DPPH.

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – I. Application to Passiflora Flavonoids **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 81-91, 2002.
- ADELBERG, J.; TOLER, J. Comparison of agar and thin-film liquid system for micropropagation of ornamental *Alocasia* and *Colocasia*. **HortScience**, v. 39, n. 5, p. 1088-1092, 2004.
- ALI, M. A.; DEVI, L. I.; NAYAN, V.; CHANU, K. V.; RALTE, L. Antioxidant Activity of Fruits Available in Aizawl Market of Mizoram, India. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v.1, n. 2, p. 76-81, 2010.
- ALI, M.; ABBASI, B.H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400–406, 2013.
- AMUGUNE, N. O., GOPALAN, H. N. B.; BYTEBIER, B. Leaf disc regeneration of passion fruit. **African Crop Science Journal**, v.1, n.2, p. 99-104, 1993.
- ANAND, S.P.; JAYAKUMAR, E.; JEYACHANDRAN, R.; NANDAGOBALAN, V.; DOSS, A. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, v.22, n.1, p.87-91, 2012.
- 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.
- APEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. Anatomical Studies of *in vitro* Organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.11, p. 2007-2013, 1999.
- ASHRAF, M. F.; AZIZ, M. A.; STANSLAS, J. ISMAIL, I.; KADIR, M. A. Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of *Chlorophytum borivilianum*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 7p, 2013.
- ASLANARGUN, P.; CUVAS, O.; DIKMEN, B.; ASLAN, E.; YUKSEL, M.U. *Passiflora incarnata* Linnaeus as an anxiolytic before spinal anesthesia. **Journal of Anesthesia**, v. 26, n.1, p. 39-44, 2012.
- BAIS, H. P.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.37, n. 6, p. 730–741, 2001.

- BAQUE, M.A.; MOH, S.; LEE, E.; ZHONG, J.; PAEK, K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1255–1267, 2012.
- BAQUE, M.D.; HAHN, E.; PAEK, K. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p.71–80, 2010.
- BARBALHO, S.M.; DAMASCENO, D.C.; SPADA, A.P.M.; LIMA, I.E.R.N.; ARAÚJO, A.C.; GUIGER, E. L.; MARTUCHI, K.A.; OSHIWA, M.; MENDES, C.G. Effects of *Passiflora edulis* on the metabolic profile of diabetic Wistar rat offspring. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.12, p. 1490-1495, 2011.
- 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. 87-90, 2004.
- BENNATI, E. Quantitative determination of harmine and harmine in the extract of *Passiflora incarnate*. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 110, n. 11, p. 664-669, 1971.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. (Acesso em 10 de novembro de 2013)
- BETSUI, F.; TANAKA-NISHIKAWA, N.; SHIMOMURA, K. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. **Plant Biotechnology**, v.21, n. 5, p.387–391, 2004.
- BIASI, L.A.; FALCO, M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M.; MENDES, B.M.J. Organogenesis from internodal segments of yellow passionfruit. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.661-665, 2000.
- BIRK, C.D.; PROVENSÍ, G.; GOSMANN, G. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from *Passiflora* Species. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2285-2291, 2005.
- BLIDAR, C. F.; ARDELEAN, A.; TURCUS, V. Efficient initiation of *in vitro* culture at wheat. **Fascicula Biologie**, v. 18, n. 2, p. 176-181, 2011.
- BOKSTALLER, S.; SCHMIDT, P. C. A comparative study on the content of passionflower flavonoids and sesquiterpenes from valerian root extracts in pharmaceutical preparations by HPLC. **Pharmazie**, v. 52, n. 7, p. 552-557, 1997
- BOMBARDELLI, E.; BONATI, A.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E. M.; MUSTICH, G. Passiflorine, a New Glycoside from *Passiflora edulis*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2661-2665, 1975.

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

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

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

CABRERA, G. M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. **Phytochemistry: Advances in Research**, v. 37, n. 2, p. 1-22, 2006.

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

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 flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, v. 4, p. 860-864, 2009.

CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruits. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 1998.

CHEN, Y.; MIAO, Y.; HUANG, L.; LI, J.; SUN, H.; ZHAO, Y.; YANG, J.; ZHOU, W. Antioxidant activities of saponins extracted from *Radix Trichosanthis*: an *in vivo* and *in vitro* evaluation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, 2014.

CHOI, S. M.; SON, S. H.; YUN, S. R.; KWON, O. W.; SEON, J. H.; PAEK, K.Y. Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, n. 3, p. 187-193, 2000.

CIESLA, L.; KRYSZEN, J.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 126-135, 2012.

COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C.B.B.; SCHUMACHER, N.S.G.; MARÓSTICA JR, M.R.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata*, Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v.18, p. 106-115, 2014.

COSTA, G.M.; ORTMANN, C.F.; SCHENKEL, E.P. REGINATTO, F.H. Na HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6.; p. 1096-1102, 2011.

CUI, X.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.; PAEK, K. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4708-4716, 2010.

CUI, X.; MURTHY, H.N.; JIN, Y.; YIM, Y.; KIM, J.; PAEK, K. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift reactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10072–10079, 2011.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.

DE MATTOS, J.C.P.; DANTAS, F.J.S.; BEZERRA, R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J.B.; LAGE, C.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicology Letters**. v. 116, 159-163, 2000.

DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E. P. Pharmacochemical Study of Aqueous Extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5-8, 2002.

DEWICK, P. M. (2002) Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. In: DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach . 2 ed. **John Wiley & Sons**, 507p.

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

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

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

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

- DOYAMA, J.T.; RODRIGUES, H.G.; NOVELLI, E.L.B.; CEREDA, E.; VILEG, W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 371–374, 2005.
- DREW, R.A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, p.23-27, 1991.
- DRUART, P.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPAR, T. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 108, n. 5, p. 429-436, 1982.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH^{•1}. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ELSAS, S. M.; ROSSI, D. J.; RABER, J.; WHITE, G.; SEELEY, C. A.; GREGORY, W. L.; MOHR, C.; PFANKUCH, T.; SOUMYANATH, A. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons *in vitro*, and show anxiogenic and anticonvulsant effects *in vivo*, varying with extraction method. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 940-949, 2011.
- FALCÃO, Erica. **Cultura de Tecidos e Conservação *in vitro* de *Passiflora foetida* L.** 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre/Florianópolis: **Editora da UFRGS/Editora da UFSC**, 2010. 1104p.
- FARIA, F. S.; STEHMANN, J. R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, p. 262-269, 2010.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M.A.P. Meio de Cultura e Tipo de Explante no Estabelecimento *In Vitro* de Espécies de Maracujazeiro. **Bragantia**, v.66, n.4, p.535-543, 2007.
- 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, 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.
- FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; MACHADO, S.R.; APPEZZATO-DA-GLORIA, 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.

- FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, n. 55, v. 25, p. 10187-10193, 2007.
- FEUILLET, C.; MAC DOUGAL, J.M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003.
- 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.
- FINE, P.V.A.; MILLER, Z.J.; MESONES, I.; IRAZUZTA, S.; APPEL, H.M.; STEVENS, M.H.H. The growth-defense trade-off and habitat specialization by plants in Amazonian forests. **Ecology**, v. 87, n. 7, p. 150-162, 2006.
- FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. “Radicle” biochemistry: the biology of root-specific metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 6, p. 220–226, 1999.
- FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; GUZZO, F.; LEVI, M.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 2031–2036, 2008.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587–605, 2002.
- FRYE, A.; HAUSTEIN, C. Extraction, Identification, and Quantification of Harmala Alkaloids in Three Species of *Passiflora*. **American Journal of Undergraduate Research**, v.6, n.3, 2007.
- GADZOVSKA-SIMIC, S.; TUSEVSKI, O.; ANTEVSKI, S.; ATANASOVA-PANCEVSKA, A.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M.; KUNGULOVSKI, D.; SPASENOSKI, M. Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. **Archives of Biological Science**, v. 64, n. 1, p. 113-121, 2012.
- GARCIA, R.O.; PACHECO, G.; FALCÃO, E.; BORGES, G.; MANSUR, E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 47-54, 2011a.
- GARCIA, R.O.; PACHECO, G.; VIANNA, M.G.; MANSUR, E. *In vitro* conservation of *Passiflora suberosa* L.: slow growth and cryopreservation. **Cryo Letters**, v.32, n.5, p.377-388, 2011b.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. (2008). Plant propagation by tissue culture, 3 ed. **Springer**, v. 1, 501p.

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

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

GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; BISHT, N. S. In vitro manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up micropropagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 1-9, 2009.

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

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandulas* pp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres et al. (ed.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p.183-260, 1998.

GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A.; GRIFFTHS, L. R. Identification and simultaneous analysis of harmine, harmine, harmol, isovitexin and vitexin in *Passiflora incarnate* extracts with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 16, 2001.

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

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

HARBAUM, B.; HUBBERMANN, E. M.; WOLFF, C.; HERGES, R.; ZHU, Z.; SCHWARZ, K. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in Pak Choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSⁿ and NMR and their quantification by HPLC-DAD. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8251-8260, 2007.

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

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

HUANG, T.; GAO, W. Y.; WANG, J.; CAO, Y.; ZHAO, Y. X.; HUANG, L. Q.; LIU, C. X. Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, p. 765–772, 2010.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2012). Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=p&o=26>>. (Acesso em 10 de novembro de 2013).

ISUTSA, D.K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 395-400, 2004.

JEONG, C.S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; LEE, H. L.; PAEK, K. Y. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 252–263, 2006.

JIN-WOOK, S.; CHA-GYUN, S.; YONG-EUI, C. Mass Production of Adventitious Roots of *Eleutherococcus sessiliflorus* through the Bioreactor Culture. **Journal of Plant Biotechnology**, v.5, n .3, p. 187-191, 2003.

JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K. P.; FIALHO, J. F. **Melhoramento genético do maracujá-doce**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, n. 89,p. 207-215, 2001.

KANTHARAJAH, A.S.; DODD, W.A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (purple passion fruit). **Annals 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. **Scientia Horticulturae**, v. 100, p.1-4, 2004.

- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of Passionfruit from Subcultured Multiple Shoot Primordia. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p.281-284, 1995.
- KLEIN, N.; GAZOLA, A.C.; LIMA, T.C.M.; SCHENKEL, E.; NIEBER, K.; BUTTERWECK, V. Assessment of Sedative Effects of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata* Extracts in Mice, Measured by Telemetry. **Phytotherapy Research**, 2013
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; KANG, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71-88, 2002.
- KROSNICK, S.E.; FORD, A. J.; FREUDENSTEIN, J. V. Taxonomic Revision of *Passiflora* Subgenus *Tetrapathea* Including the Monotypic Genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a New Species of *Passiflora*. **Systematic Botany**, v.34, n.2, p. 375–385, 2009.
- KROSNICK, S.E.; PORTER-UTLEY, K.E.; MACDOUGAL, J.M.; JØRGENSEN, P.M.; MCDADE, L.A. New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, n.3, p. 692–713, 2013.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Modernae a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LEE, Y.S.; YANG, T.; PARK, S.; BAEK, J.H.; WU, S.; LIM, K. Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin. **Plant Omics Journal**, v.4, n.4, p. 190-194, 2011.
- LI, K.; GAO, C.; LI, W. Study on fragmentation of vitexin and isorhamnetin-3-O-beta D-rutinoside using electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 36, n. 2, p. 180-184, 2011.
- LING, A. P. K.; KOK, K. M.; HUSSEIN, S.; ONG, S. L. Effects of plant growth regulators on adventitious roots induction from different explants of *Orthosiphon stamineus*. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 493-501, 2009.
- LOMBARDI, S.P.; PASSOS, I.R.S.; NOGUEIRA, M.C.S.; APPEZATO-DA-GLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* Mast. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 239–247, 2007.
- LÓPEZ-VARGAS, J.H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, p. 756–763, 2013.

- LUDWIG-MÜLLER, J.; VERTOCNIK, A.; TOWN, C. D. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2095–2105, 2005.
- LUGATO, D.; SIMÃO, M. J.; GARCIA, R.; MANSUR, E.; PACHECO, G. Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from *in vivo* plants and *in vitro* materials of *Passiflora alata* Curtis. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 339-346, 2014.
- LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Pharmacological investigations on the raw material of the genus *Passiflora*. IV. The comparison of contents of alkaloids in some harman raw materials. **Planta Medica**, v. 27, p. 381-384, 1975.
- 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.
- MACHADO, M. P.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.
- 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.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation and Quantification of Flavonoids. In: ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1 ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, p. 1-36, 2006.
- MARTIN, K. P.; ZHANG, C.; HEMBROM, M. E.; SLATER, A.; MADASSERY, J. Adventitious root induction in *Ophiorrhiza prostrata*: a tool for the production of camptothecin (an anticancer drug) and rapid propagation. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, 163-169, 2008.
- MARTÍNEZ-BONFIL, B. P.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-LAREDO, A. R.; TREJO-TAPIA, G.; TREJO-ESPINO, J. L. Effects of culture médium and auxins on growth of adventitious root cultures of *Cuphea aequipetala* Cav. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 401-408, 2014.
- MASOKO, P.; ELOFF, J.N. Screening of twenty-four south african combretum and six *Terminalia* species (Combretaceae) for antioxidant activities. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p. 231-239, 2007.

- MELETTI, L. M. M. Maracujá-Roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 194 – 348, 2005.
- MENGHINI, A.; MANCINI, L. A. TLC Determination of Flavonoid Accumulation in Clonal Populations of *Passiflora incarnate* L. **Pharmacological Research Communications**, v. 20, n. 5, p. 113-116, 1988.
- MERHY, T. S. M. **Cultura de Tecidos e Conservação *in vitro* de *Passiflora pohlii***. 2014. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.
- MERHY, T.S.M.; VIANNA, M.G.; GARCIA, R.O.; PACHECO, G.; MANSUR, E. Cryopreservation and assessment of genetic stability by RAPD and ISSR of *Passiflora pohlii*. **Cryo Letters**, no prelo, 2014.
- MIN, J.Y.; JUNG, H.Y.; KANG, S.M.; KIM, Y.D.; KANG, Y. M.; PARK, D.J.; PRASAD, D.T.; CHOI, M. S. Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1748–1753, 2007.
- MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P. L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 91–804, 2013.
- MONTEFUSCO-PEREIRA, C.V.; CARVALHO, M.J.; BOLETI, A.P.A.; TEIXEIRA, L.S.; MATOS, H.R.; LIMA, E.S. Antioxidant, Anti-inflammatory, and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1367–1378, 2013.
- MONTEIRO, A.C.B.A; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 571-573, 2000a.
- MONTEIRO, A.C.B.A; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000b.
- MORAES, M. L. L; VILEGAS, J. H.Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.
- MORAN ROBLES, M.J. *In vitro* vegetative multiplication of axillary buds of *P. edulis* var. *flavicarpa* Degener and *P. mollissima* Bairley. **Fruits**, v. 33, p. 701- 715, 1978.
- MORRONE, M.S.; ASSIS, A.M.; ROCHA, R.F.; GASPAROTTO, J.; GAZOLA, A.C.; COSTA, G.M.; ZUCOLOTO, S.M.; CASTELLANOS, L.H.; RAMOS, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.F. *Passiflora manicata* (Juss.)

aqueous leaf extract protects against reactive oxygen species and protein glycation *in vitro* and *ex vivo* models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 45–51, 2013.

MÜLLER, S. D. **Determinação de alcaloides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de *Passiflora alata* Curtis, Passifloraceae – Maracujá Doce**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale Itajaí, Itajaí. 2006.

MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p.399–403, 2005.

MÜLLER, V.; CHAVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTI, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARADI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970-974, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURTHY, H. N., HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Adventitious roots and secondary metabolism. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 711-716, 2008.

NAGELLA, P.; MURTHY, H.N. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6735–6739, 2010.

NAKAYAMA, F. Cultivo *in vitro* de tejidos de *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata**, v.42, n.1, p.63-74, 1966.

NANDAGOPAL, S.; KUMARI, B. D. R. Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. **Journal Central European Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2007.

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

NILSSON, J.; PILLAI, D.; ÖNNING, G.; PERSSON, C.; NILSSON, A.; AKESSON, B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruits and vegetables. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 239-246, 2005.

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

OZAROWSKI, M.; BŁASZKIEWICZ, S.; GRYSZCZYNSKA, A.; THIEM, B.; BUDZIANOWSKI, J. Search for C-glycosyl flavones and phenolic acids in callus and shoot

in vitro culture of *Passiflora caerulea* L. International conference: "Business meets science to cooperate in current topics". Bioconnect. Poznan, Poland. 2012.

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

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

PAEK, K. Y.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J. Establishment of adventitious root cultures of *Echinacea purpurea* for the production of caffeic acid derivatives. **Methods in Molecular Biology**, v.547, p.3-16, 2009.

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

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

PAZ, T. A.; SANTOS, V. A. F. F. M.; INÁCIO, M. C.; PINA, E. S.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Production of the Quinone-Methide Triterpene Maytenin by *In Vitro* Adventitious Roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and Rapid Detection and Identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Research International**, 2013.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; MCCULLAGH, M. Distinction of the flavone C-glycoside pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using LC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 295-301, 2005.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J.; 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.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes Químicos e Farmacologia do Gênero *Passiflora* com Ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGA, G. G.; SCHENKEL, E. P. Comparative pharmacological study of hydroethanol 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.A.; STIPP, L.C.L.; MENDES, B.M.J. *In vitro* organogénesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 28-33, 2010.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; 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.

POP, T. I.; PAMFIL, D.; BELLINI, C. Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. 1, p. 307-316, 2011.

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

RAGAVENDRAN, C.; KAMALANATHAN, D.; REENA, G.; NATARAJAN, D. *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. an exotic medicinal plant. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v.2, n.6, p. 707-711, 2012.

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

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

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

RASOOL, S. N.; JAHEERUNNISA, S.; JAYAVEERA, K. N.; SURESH KUMAR, C. *In vitro* callus induction and *in vivo* antioxidant activity of *Passiflora foetidas* L. leaves. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011

REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E.P. Assay of Quadranguloside, the Major Saponin of Leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v.15, p.195–197, 2004.

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

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

- REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.6, n.2, p. 96–100, 1995.
- REIS, L.B.; SILVA, M.L.; LIMA, A.B.P.; OLIVEIRA, M.L.P.; PINTO, D.L.P.; LANI, E.R.G.; OTONI, W.C. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of passionfruit species: *Passiflora cincinnata* and *P. edulis flavicarpa*. **Acta Horticulturae**, v. 738, p.425–431, 2007.
- RIBEIRO, S.F.; TAVEIRA, G.B.; CARVALHO, A.O.; DIAS, G.B.; DA CUNHA, M.; SANTA-CATARINA, C.; RODRIGUES, R.; GOMES, M.V. Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein Journal**, v. 31, n.1, p. 59-67, 2012.
- ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.249, p. 747-758, 2012.
- RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; GALHARDI, C. M.; BURNEIKO, R. C.; ALMEIDA, J. A.; RIBAS, B. O.; NOVELLI, E. L. B. Antioxidant effect of saponin: potencial action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 79-85, 2005.
- RODRIGUES, T. R. **Estudos de alcaloides harmônicos em sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Maracujá Azedo) por SBSE/CLAE-Flu dual**. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.
- ROSA, Y. B. C. J.; BELLO, C. C. M.; DORNELAS, M. C. Species-dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2014.
- 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.
- ROTILI, M.C.C.; COUTRO, S.; CELANT, V.M.; VORPAGEL, J.A.; BARP, F.K.; SALIBE, A.B.; BRAGA, G.C. Composição, atividade antioxidante e qualidade do maracujá amarelo durante armazenamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 227-240, 2013.
- ROUT, G. R. Effect of auxin on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. **Plant Growth Regulation**, v. 48, p. 111-117, 2006.
- 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.

- RUDNICKI, M.; 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.
- SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1219-1232, 2012.
- SALGADO, J.M.; BOMBARDE, T.A.D.; MANSI, D.N.; PIEDADE, S.M.S.; MELETTI, L.M.M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glyemic control in diabetic rat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30 n.3, 2010.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.
- SANTOS, F.C; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C.; SANTOS, F.C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Ceres**, v. 57, n.1, p. 112-117, 2010.
- SAPTARINI, N. M.; WARDATI, Y.; JULIAWATI, R. Antioxidant Activity of Extract and Fraction of Yellow Passion Fruit (*Passiflora flavicarpa*) Leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 194-196, 2013.
- SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.600-603, 2011.
- SAVIO, L. E. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 3, p. 465-472, 2012.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; LIMA, E. C. A.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 263-269, 2012.
- SEVERIN, C.; BUENO, M.; SANTÍN, F.; GIUBILEO, M.G. Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n.1, p. 73-79, 2011.
- SILVA, C.V.; OLIVEIRA, L.S.; LORIATO, V.A.P.; SILVA, L.C.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F.; 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.
- SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; COLOMEU, T.C.; BATISTA, A.G.; MELETTI, L.M.M.; PASCHOAL, J.A.R.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; FURLAN, M.F.; REYES, F.G.R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; ZOLLNER, R.L. Antioxidant activity of aqueous extract

of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.

SILVA, M.L.; PINTO, D.L.P.; GUERRA, M.P.; FLOH, E.I.S.; BRUCKNER, C.H.; OTONI, W.C. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant, Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 47-54, 2009.

SILVEIRA, F.; ROSSI, S.; FERNÁNDEZ, C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.; FERREIRA, F. Alum-type Adjuvant Effect of Non-haemolytic Saponins Purified from *Ilex* and *Passiflora* spp. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1783-1788, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BÓRQUEZ, J.; KENNELLY, E. J. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, p. 1672-1692, 2013.

SIVAKUMAR, G. Bioreactor technology: A novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 1419-1427, 2006.

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

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p. 219-243, 2004.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 753-758, 2003.

STRASSER, M. **Triagem fitoquímica e farmacológica e formulação de nanopartículas de produtos derivados de *Passiflora serratodigitata* L.** 2011. 89p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.

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

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

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

TREVISAN, F.; MENDES, B.M.J. Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Scientia Agricola**, v.62, n.4, p.346-350, 2005.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Quantitative analysis of all types of β -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection.

Phytochemical Analysis, v. 10, n. 5, p. 247-253, 1999.

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

ULUBELEN, A.; OSKUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 783, 1982.

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

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v.1, p. 13-25, 2002.

VERSTRAETEN, I.; BEECKMAN, T.; GEELLEN, D. Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 959, p. 159-175, 2013.

VINOCUR, B.; CARMI, T.; ALTMAN, A.; ZIV, M. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 1146-1154, 2000.

VON ARNOLD, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: GEORGE, E. F; HALL, M. A.; DE KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture. 3 ed. **Springer**, v. 1, 501p.

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

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

WINKLER, L.M.; QUOIRIN, M. Organogenesis and Genetic Transformation of Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) with the genes *CMe-ACO1* and *nptII* via *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Horticulture**, v. 632, p. 31-40, 2002.

WOHLMUTH, H.; PENMAN, K. G.; PEARSON, T.; LEHMANN, R. P. Pharmacognosy and chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 1015-1018, 2010.

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

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

WU, C.; DEWIR, Y.H.; HAHN, E.; PAEK, K. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 3, p. 193-199, 2006.

WU, C.; MURTHY, H. N.; HAHN, E.; PAEK, K. Establishment of adventitious root co-culture of Ginseng and Echinacea for the production of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 891-896, 2008.

WU, C.H.; MURTHY, H. N.; HAHN, E.; PAEK, K. Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1179-1182, 2007.

YE, M.; YANG, W.; LIU, K.; QIAO, X.; LI, B.; CHENG, J.; FENG, J.; GUO, D.; ZHAO, Y. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35-42. 2012.

YIN, S.; ZHANG, Y.; GAO, W.; WANG, J.; MAN, S.; LIU, H. Effects of nitrogen source and phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Acta Physiologiae Plantarum**, 2013.

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

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

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

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Analysis of Passion Fruits Rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidante (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 541-545, 2012.

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

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

ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.

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

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

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

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