

Jenny Sumara Sozo

**PERFIS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE FRUTOS, SEMENTES E CALOS
CULTIVADOS *in vitro* DE *Passiflora setacea* E *Passiflora
tenuifila* (Passifloraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Bióciências da Universidade Federal de
Santa Catarina, para a obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria
Viana
Co-orientadora: Dr^a. Ana Maria Costa

FLORIANÓPOLIS
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sozo, Jenny Sumara

Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados in vitro de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae) / Jenny Sumara Sozo ; orientadora, Ana Maria Viana ; coorientadora, Ana Maria Costa. - Florianópolis, SC, 2014.

127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Maracujá. 3. Frutos. 4. Calos. 5. Atividade Antioxidante. I. Viana, Ana Maria . II. Costa, Ana Maria. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

“Conhecimento não é aquilo que
você sabe, mas o que você faz com
aquilo que você sabe.”

Aldous Huxley

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Viana, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, dedicação e paciência. Gratidão!

À Dr^a. Ana Maria Costa, pelo aceite da coorientação, todo o auxílio e ensinamentos durante o período de estágio na Embrapa Cerrados.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin por disponibilizar seu laboratório para os experimentos de fitoquímica e pelas contribuições ao trabalho.

À equipe do laboratório de alimentos da Embrapa Cerrados, Dr^a. Sônia Celestino, Daniela e Manaíra pelo acolhimento e trocas de idéias.

À equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Dr^a. Fernanda Ramlov, pela ajuda com as análises, à Claudia pelo auxílio com as análises em HPLC, por ficar muitos dias até tarde comigo no laboratório nas corridas das amostras, à Fernanda Pillati e a Regina, por eventualmente me emprestar seus reagentes pelas dicas e trocas de idéias.

Ao Prof. Dr. Flavio Reginatto, por disponibilizar seu laboratório para os experimentos, por suas valiosas contribuições com as metodologias e todos os ensinamentos.

Ao pessoal do laboratório de Farmacognosia, especialmente a Fernanda Martins, por toda a ajuda prestada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de cursar o Mestrado, à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de realizar este trabalho, e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Severino e Laura, por todo carinho e amor em todos os momentos, por toda força, auxílio e apoio em todas as decisões que tomo. Sem o suporte de vocês, certamente essa conquista não seria possível.

Às minhas irmãs, Jéssica e Marjorie, por toda ajuda durante esse período, pelas conversas descontraídas, e todas as energias boas que emanaram em minha direção. Sou feliz por tê-las ao meu lado e saber que posso contar com vocês!

Ao meu namorado Bernardo, pelo companherismo, por me escutar falando de vias de biossíntese de compostos e por estar ao meu lado.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a construção desse trabalho. Obrigada!

RESUMO

Passiflora tenuifila Killip e *Passiflora setacea* DC. são espécies endêmicas do Brasil que ocorrem no Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (*P. setacea* DC.) e que foram selecionadas pelo programa de melhoramento genético realizado pela Embrapa Cerrados, visando o desenvolvimento tecnológico para uso funcional das *Passifloras* silvestres. Este trabalho teve como objetivo gerar conhecimentos sobre a produção de vitamina C (frutos), compostos fenólicos, flavonóides, carotenóides, clorofilas *a* e *b* e atividade antioxidante de frutos e sementes, em diferentes estádios de desenvolvimento, e de culturas celulares produzidas *in vitro*, a partir de diferentes tipos de explantes. Os calos de *P. setacea* foram produzidos a partir de explantes de segmentos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédone e nó foliar de plântulas de 8 semanas de idade, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2% de Phytigel e 2,5 μ M de 2,4-D. Os calos de *P. tenuifila* foram produzidos a partir do cultivo de sementes em desenvolvimento e de segmentos de caules de microplantas, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 0,2% de Phytigel e 2,5 μ M de 2,4-D ou de ANA. As análises indicaram que os níveis de fenólicos totais, flavonóides, carotenóides, clorofilas *a* e *b*, atividade antioxidante, os perfis metabólicos dos calos, determinados através de varredura em UV-vis e os tipos de carotenóides, através da análise por CLAE, variaram com a espécie e dependeram dos estádios de desenvolvimento dos frutos e sementes, assim como dos tipos de explantes e idade das culturas de calos. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram detectar, para cada espécie estudada e para cada grupo de compostos, os estádios adequados de desenvolvimento das sementes e frutos, para a utilização no enriquecimento funcional de alimentos ou aplicação em estudos farmacológicos. Foram, também, definidas as condições de cultura de calos ideais, em que ocorreu a maior biossíntese de cada grupo de metabólitos e atividade antioxidante, confirmando o potencial de utilização das culturas celulares de ambas as espécies em futuras estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: maracujá, frutos, sementes, calos, metabólitos secundários, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Passiflora tenuifila Killip e *Passiflora setacea* DC are endemic of the Brazilian biomas Cerrado, Atlantic Forest and Caatinga (*P. setacea* DC.) which were selected by the Embrapa Cerrados genetic improvement program aiming the technological development for the functional utilization of the native *Passifloras*. The aim of this work was to generate knowledge on the production of vitamin C (fruits), phenolics, flavonoids, carotenoids, chlorophyll a and b and antioxidant activity of fruits and seeds at different developmental stages and calluses cultures produced *in vitro*, from different explant types. Calluses of *P. setacea* were produced from root, hypocotyl, cotyledonary and leaf nodal segments and cotyledon from 8-week-old seedlings cultured on Murashige & Skoog basal medium supplemented with 88,5 mM sucrose, 0,2% Phytigel and 2.5 μM de 2,4-D. The *P. tenuifila* calluses were produced from developing seeds and microplant stem segments cultured on Murashige & Skoog basal medium supplemented with either 88,5 mM sucrose or fructose, 2% Phytigel and 2.5 μM of either 2,4-D or NAA. The analysis carried out have shown the levels of vitamin C, phenolics, flavonoids, carotenoids, chlorophyll a and b, the antioxidant activity, the metabolic profiles, determined by the UV-vis scanning and the types of carotenoids, analysed by the HPLC varied according to species, with the developmental stages of fruits and seeds, type of explants and callus culture age. These results allowed the establishment, for each species and group of metabolite, the adequate fruit and seed developmental stages for functional food enrichment and application in pharmacological studies. The ideal callus culture conditions were also established to optimize the biosynthesis of each group of metabolite and antioxidant activity, confirming the potential use of cell cultures as tools for further application of biotechnological approaches for secondary metabolite production.

Key Words: passion fruit, fruits, seeds, callus, secondary metabolites, antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ACN	Acetonitrila
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BuOH	Butanol
CHY- β	β -caroteno hidroxilase
CLAE	Cromatografia de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjos de Diodo
DCPIP	2,6-dichlorophenolindophenol
DMSO	Dimetilsufóxido
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine
DPPH	2,2- difenil-1- picrilhidrazil
EAG	Equivalentes em Ácido Gálico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GA ₃	Ácido giberélico
H ₂ SO ₄	Ácido Sufúrico
IDR	Ingestão Diária Recomendada
MeOH	Metanol
MS	Murashige & Skoog
NaCl	Cloreto de Sódio
NDGA	Ácido nordihydroguaiaretico
PAL	Fenilalanina Amonialiase
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Tempo de Retenção
TAL	Tirosina amônio liase
TDZ	Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)
UV- Vis	Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta/visível
VDE	Violaxantina de-epoxidase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frutos e Flor de *P. setacea*..... 7
- Figura 2.** Fruto de *P. tenuifila*. 8
- Figura 3.** Estrutura dos flavonóides..... 12
- Figura 4.** Estrutura de alguns carotenóides. 14
- Figura 5.** Estrutura das clorofilas *a* e *b*..... 17
- Figura 6.** Desenvolvimento do fruto de *P. tenuifila* com base em indicadores de maturidade. 1 e 2 - Fruto imaturo incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta. 3 a 5 fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta. 6 Fruto totalmente maduro. 7. Fruto senescente. 20
- Figura 7.** Desenvolvimento do fruto de *P. setacea* com base em indicadores de maturidade. 1 e 2 - Fruto imaturo incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta. 3 a 5 fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta. 6 Fruto totalmente maduro. 7. Fruto senescente. 21
- Figura 8.** Sementes de *P. tenuifila* nos estádios de desenvolvimento 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D). Barra=5 mm. 22
- Figura 9.** Sementes de *P. setacea* nos estádios de desenvolvimento 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D). Barra=5 mm..... 22
- Figura 10.** Plântula de *P. setacea* (A) de 8 semanas de idade cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. As setas indicam, da base para o ápice radícula pouco desenvolvida, hipocótilo, nó cotiledonar, epicótilo, nó foliar. Barra=12,5 mm. Microplantas de *P. tenuifila* (B) de 6 meses de idade cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose, 0,2% (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido giberélico (GA₃). Barra=20 mm..... 25
- Figura 11.** Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos (A) e sementes (B) de *P. tenuifila* em diferentes estádios de desenvolvimento. C) Polpas e sementes. STE1: Sementes *P. tenuifila* estágio 1; STE2: Sementes *P. tenuifila* estágio 2; STE3: Sementes *P. tenuifila* estágio 3; STE4: Sementes *P. tenuifila* estágio 4; STE5: Sementes *P. tenuifila* estágio 5; PTE1: Polpa *P. tenuifila*

estádio 1; PTE2: Polpa *P. tenuifila* estágio 2; PTE3: Polpa *P. tenuifila* estágio 3; PTE4: Polpa *P. tenuifila* estágio 4..... 32

Figura 12. Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos (A) e de sementes (B) de *P.setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento. C) Polpas e sementes. PSE1: Polpa *P. setacea* estágio 1; PSE2: Polpa *P. setacea* estágio 2; PSE3: Polpa *P. setacea* estágio 3; PSE4: Polpa *P. setacea* estágio 4; SSE1: Semente *P. setacea* estágio 1; SSE2: Semente *P. setacea* estágio 2; SSE3: Semente *P. setacea* estágio 3; SSE4: Semente *P. setacea* estágio 4; SSE5: Semente *P. setacea* estágio 5..... 33

Figura 13. Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *P. tenuifila* (A) e *P. setacea* (B) iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 µM de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 µM de ANA. C) Calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*..... 35

Figura 14. Calos originados a partir do cultivo de sementes de frutos verdes em desenvolvimento (A, B, C, D) e de segmentos de caules de microplantas (E, F) de *P. tenuifila* em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, após 80 e 90 dias, respectivamente. Barras=5 mm..... 46

Figura 15. Calos originados a partir de segmentos de nó cotiledonar (A, B), hipocótilo (C, D), raiz (E, F), e cotilédone (G, H) de plântulas de *P. setacea* cultivados em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, após 60 dias. Barras=5mm. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).	10
Tabela 2. Alguns agentes de defesa antioxidante.	11
Tabela 3. Estádios de maturação de frutos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> coletados em Planaltina-DF.	19
Tabela 4. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante de polpas de frutos de <i>Passiflora tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	37
Tabela 5. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ MS) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de polpas de frutos de <i>Passiflora tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	39
Tabela 6. Conteúdos de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> de polpas de frutos de <i>Passiflora tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	40
Tabela 7. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	42
Tabela 8. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ MS) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de sementes de <i>Passiflora tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	44
Tabela 9. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante de calos de <i>P. setaceae</i> <i>P. tenuifila</i> iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μM de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 μM de ANA.	50
Tabela 10. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ MS) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i> iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μM de 2,4-D.	52
Tabela 11. Conteúdos de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> de calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i> iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM	

de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 μ M de ANA. 54

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	OBJETIVOS	2
1.1.1.	Objetivo geral.....	2
1.1.2.	Objetivos específicos	2
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	O GÊNERO <i>Passiflora</i> : OCORRÊNCIA, BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO	3
2.2.	IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E MEDICINAL DAS <i>Passifloras</i>	4
2.3.	IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>PASSIFLORAS</i> SILVESTRES: <i>P. setacea</i> E <i>P. tenuifila</i>	5
2.4.	ESTRESSE OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	9
2.5.	CLOROFILAS.....	16
2.6.	BIOTECNOLOGIA DE <i>Passifloras</i>	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.	MATERIAL.....	19
3.1.1.	Frutos	19
3.1.2.	Sementes	21
3.1.3.	Calos.....	23
3.2.	MÉTODOS	23
3.2.1.	Indução de calos	23
3.2.1.1.	Desinfecção de sementes e germinação <i>in vitro</i>	23
3.2.1.2.	Preparação de meio de cultura	23
3.2.1.3.	Indução de calos a partir de diferentes tipos de explantes de plântulas de <i>P. setacea</i>	24
3.2.1.4.	Indução de calos a partir de sementes de <i>P. tenuifila</i>	24
3.2.1.5.	Indução de calos a partir de segmentos de caules de microplantas de <i>P. tenuifila</i>	25

3.2.1.6. Determinação de massa seca e do teor de água dos calos.....	26
3.2.2. Análise do perfil metabólico	26
3.2.2.1. Espectrofotometria de UV-Vis	26
3.2.3. Análises quantitativas de fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides, ácido ascórbico e clorofila	27
3.2.3.1. Compostos fenólicos totais	27
3.2.3.2. Flavonóides Totais.....	27
3.2.3.3. Carotenóides	28
3.2.3.4. Determinação dos teores de Ácido ascórbico	28
3.2.3.5. Clorofila.....	29
3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH	29
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. PERFIS METABÓLICOS OBTIDOS POR ESPETROFOTOMETRIA DE VARREDURA EM UV-VIS DE POLPAS E SEMENTES DE <i>Passiflora tenuifila</i> E <i>Passiflora setacea</i>	31
4.2. PERFIS METABÓLICOS OBTIDOS POR ESPETROFOTOMETRIA DE VARREDURA EM UV-Vis DE CALOS DE <i>Passiflora tenuifila</i> E <i>Passiflora setacea</i>	34
4.3. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, VITAMINA C, CLOROFILAS <i>a</i> E <i>b</i> E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM POLPAS DE FRUTOS DE <i>P. tenuifila</i> E <i>P. setacea</i> EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO.....	36
4.4. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE <i>P. tenuifila</i> E <i>P. setacea</i> EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO	41
4.5. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, CLOROFILAS <i>a</i> E <i>b</i> E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CULTURAS DE CALOS DE <i>Passiflora</i>	

<i>tenuifila</i> E <i>Passiflora setacea</i> ORIGINADAS A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES	45
5. DISCUSSÃO	56
5.1. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, VITAMINA C (FRUTOS) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FRUTOS DE <i>P. setacea</i> E <i>P. tenuifila</i>	56
5.1.1. Fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante em frutos	56
5.1.2. Ácido ascórbico e atividade antioxidante em frutos	59
5.2. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE <i>P. setacea</i> E <i>P. tenuifila</i>	61
5.3. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CALOS DE <i>P. setacea</i> E <i>P. tenuifila</i>	65
5.3.1. Elicitação como estratégia para otimizar a produção de fenolicos totais e flavonóides por culturas celulares.	67
5.3.2. Diferenciação celular e idade das culturas celulares como estratégia para otimizar a biossíntese de fenólicos totais e flavonóides.....	69
5.4. PERFIS DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS, SEMENTES E CALOS DE <i>P. setacea</i> E <i>P. tenuifila</i>	71
5.4.1. Transformação genética como estratégia para otimizar a biossíntese de carotenóides em calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i>.....	82
5.5. RELEVÂNCIA DA TÉCNICA DE VARREDURA EM UV-VIS NOS ESTUDOS DE METABÓLICOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES DE <i>Passifloras</i>	83
5.6. PERSPECIVAS.	84
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	87

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Passiflora* apresentam grande importância pela qualidade de seus frutos ricos em sais minerais e vitaminas, pelas propriedades farmacológicas, nutricionais e ornamentais (ZUCARELI *et al.*, 2009). Algumas espécies são popularmente conhecidas pelas propriedades medicinais, das quais as mais citadas na literatura são: *Passiflora alata* Dryander, espécie oficial da Farmacopéia Brasileira 3ª edição, *Passiflora incarnata* L., mencionada em monografias da Farmacopéia Francesa, Européia, Sueca e Britânica, e *Passiflora edulis* Sims, incluída na 5ª edição da Farmacopéia Brasileira, espécie mais comercializada e consumida no Brasil, devido à característica sensorial dos frutos, ideal para produção de sucos. Encontram-se registros do uso das folhas em forma de chá como calmante e suave indutor do sono, no combate de febres e inflamações cutâneas (PIO CORRÊA, 1978; LORENZI & MATOS, 2008). Em *P. edulis*, o suco dos frutos é sedativo (LORENZI & MATOS, 2008). Além da indicação medicinal de muitas das espécies como sedativas, também são reportadas às espécies desse gênero atividades diuréticas, analgésicas, vermífugas, antitumorais, incluindo também uso no tratamento de dependência química, obesidade, controle de tremores e distúrbios nervosos diversos (DHAWAN *et al.*, 2004; COSTA & TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK *et al.*, 2010). Os antioxidantes detectados em várias espécies de maracujá podem produzir uma ação protetora efetiva contra processos oxidativos que ocorrem no organismo, prevenindo tumores e doenças do sistema cardiovascular, distúrbios neurológicos entre outros benefícios à saúde (COSTA & TUPINAMBÁ, 2005).

A grande variabilidade de espécies de *Passifloras* coloca nosso país entre um dos principais centros de diversidade genética desse gênero, porém, dentre toda essa diversidade, somente algumas têm destaque econômico o que demonstra a importância da realização de estudos investigativos relacionados às espécies silvestres menos exploradas, como *P. tenuifila* e *P. setacea*, nativas do Cerrado brasileiro. O programa de melhoramento genético realizado pela Embrapa Cerrados selecionou populações de *P. setacea*, por exemplo, objetivando aumentar o tamanho do fruto para o mercado de frutas frescas e para produção de matéria-prima, para produção de doces e sorvetes. O produto tecnológico resultante deste trabalho já está registrado como BRS Pérola do Cerrado e acessos desta espécie e da *P. tenuifila* estão também sendo avaliados com base em características bioquímicas, toxicológicas e medicinais.

Nesse contexto, o presente estudo buscou gerar conhecimentos sobre a produção de vitamina C, carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante de frutos, sementes e sistemas de culturas de calos *in vitro*, permitindo, também, avaliar o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção dos compostos bioativos de interesse e contribuir para o desenvolvimento do uso funcional/medicinal das *Passifloras* silvestres.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Prover conhecimentos sobre a biossíntese de compostos fenólicos, vitamina C (apenas em frutos), clorofilas, carotenóides e atividade antioxidante em culturas de calos, frutos e sementes de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, em diferentes estádios de desenvolvimento.

1.1.2. Objetivos específicos

1- Quantificar os compostos fenólicos, flavonóides totais, vitamina C (apenas em frutos), carotenóides, clorofilas e atividade antioxidante de frutos e de sementes de *Passiflora setacea* e de *Passiflora tenuifila* em diferentes estádios de desenvolvimento.

2- Proceder à avaliação qualitativa dos perfis de carotenóides produzidos por frutos e sementes em diferentes estádios de desenvolvimento.

3- Quantificar os compostos fenólicos, flavonóides totais, carotenóides, clorofilas e atividade antioxidante em calos provenientes de explantes de nó cotiledonar, hipocótilo, nó foliar e raiz de plântulas de *Passiflora setacea* e de sementes em desenvolvimento e segmentos de caules de *Passiflora tenuifila*.

4- Comparar os perfis metabólicos de calos, frutos e sementes de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, através de espectrofotometria de varredura em UV-vis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O GÊNERO *Passiflora*: OCORRÊNCIA, BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

A América tropical originou a maioria das espécies de maracujá que compõem a família *Passifloraceae*. Os maracujazeiros pertencem a Ordem *Violales*, Classe *Magnoliopsida* e Filo *Magnoliophyta*. O nome do fruto “maracujá” provém da cultura indígena, de origem Tupi, que significa “alimento em forma de cuia”, também são conhecidos como frutos-da-paixão, que tem origem na correlação da morfologia da flor com os símbolos da Paixão de Cristo (SOUZA & MELETTI, 1997). As características que se relacionam ao nome “*passionfruit*” são: os cinco filetes-estames, que representariam as cinco chagas, à corona-verticilos, representando a coroa de espinhos de Jesus Cristo e os três estiletos-estigmas, que representariam a Santíssima Trindade (HOEHNE, 1937).

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família *Passifloraceae*, sendo de maior ocorrência nas Américas e no continente Africano, que possuem clima tropical. Estima-se que no gênero *Passiflora* existem cerca de 600 espécies sendo que no Brasil, são conhecidas mais de 150 espécies, pelo menos 70 delas produzem frutos comestíveis (CUNHA *et al.*, 2002; MELETTI & BRÜCKNER, 2001). O país também é o maior produtor e consumidor do maracujá, em 2010 a produção foi de 920 toneladas, produzidas em uma área de 62 mil hectares, o que representa 70% da produção mundial. Em 2005 produzia aproximadamente 70% a menos do que é produzido atualmente, sendo utilizada pela indústria alimentícia. Apesar da grande diversidade, poucas espécies do gênero *Passiflora* são domesticadas e exploradas comercialmente.

O maracujazeiro é uma planta trepadeira largamente distribuída pelo Brasil é cultivado em diferentes tipos de solos e condições ambientais, apresentando variações comportamentais pela influência desses fatores (CARVALHO-OKANO & VIEIRA, 2001). Um dos desafios na produção de mudas reside no fato que as sementes apresentam baixas taxas germinativas, dormência, baixa tolerância ao armazenamento ou à desidratação e viabilidade curta (MELETTI *et al.*, 2005). As dificuldades na produção de mudas geram um *déficit* na cadeia produtiva, inclusive em espécies domesticadas, uma vez que as *Passifloras*, principalmente as espécies silvestres, vêm sofrendo uma erosão genética devido à ação antrópica no Cerrado, ficando restritas à pequenos fragmentos. Nesse sentido, é necessária a aplicação de técnicas biotecnológicas para que se possa conservar esse germoplasma,

apresentar soluções para a produção de mudas e possibilitar o aperfeiçoamento de protocolos que viabilizem a produção de metabólitos secundários em condições controladas.

2.2. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E MEDICINAL DAS *Passifloras*

Apesar da grande diversidade no gênero *Passiflora* e do uso popular associado aos benefícios à saúde, apenas três espécies são produzidas em escala comercial no Brasil, o maracujá azedo ou amarelo (*Passiflora edulis* va. *flavicarpa* deg), o maracujá doce também chamado de maracujina (*Passiflora alata* Curtis) e a *Passiflora incarnata*, que não produz frutos comestíveis, mas possui valor medicinal. A *Passiflora edulis*, é a espécie mais popularizada devido à sua polpa e às propriedades sedativas e tranqüilizantes de suas folhas, que são preparadas em infusões (COLETA *et al.*, 2006; FERRERES *et al.*, 2007; PETRY *et al.*, 2001, PETRY & REGINATTO, 1998). *P. edulis*, juntamente com as *P. alata* e *P. incarnata* foram relacionadas pelo Ministério da Saúde como apropriadas para uso fitoterápico (COSTA & TUPINAMBÁ, 2005). A produção de flavonóides reconhecidos pela Farmacopéia Brasileira como anti-ansiolítico, se concentra na comercialização das folhas, apesar do alto valor do fruto *in natura* (COSTA & TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK *et al.*, 2010). Diversas espécies de maracujá são utilizadas popularmente pelas propriedades sedativas, diuréticas, analgésicas, vermífugas, antitumorais, além de serem recomendados no tratamento de dependência química, obesidade, para controlar tremores e distúrbios nervosos diversos (DHAWAN *et al.*, 2004, COSTA & TUPINAMBÁ, 2005, ZERAIK *et al.*, 2010). Outra potencialidade do fruto é a utilização do óleo da semente de maracujá na indústria cosmética, devido à composição de emolientes que atuam na reposição e restauração das frações lipídicas da pele (PEREIRA, 2011).

A atividade biológica mais estudada é a ação antioxidante atribuída aos polifenóis, principalmente aos flavonóides, que apresentam vários efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, vasodilatadora e ansiolítica (ZERAIK *et al.*, 2010). AKANBI *et al.* (2011) estudaram as atividades fitoquímicas e antimicrobiana de *P. edulis*, e constataram a presença de carboidratos, glicosídeos e flavonóides, sendo que todos os extratos (folhas, caule e frutos) apresentaram potencial para ação antimicrobiana dos diversos patógenos testados (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella*

pneumoniae e *Escherichia coli*). RUDNICKI *et al.* (2007) demonstraram que os extratos de folhas de *P. edulis* e *P. alata* possuem atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*.

Nas *Passifloras* são encontrados flavonóides do tipo C-glicosídeos, como vitexina, isovitexina, schaftosideo, orientina e isoorientina (OGA *et al.*, 1984; PEREIRA *et al.*, 2004) com maior concentração nas folhas. Os alcalóides presentes são do tipo indólico, para a espécie *P. edulis* var. *flavicarpa* foi relatada a presença de harmana, harmina, harmalina e harmol nas folhas (LUTOMSKI; MALEK, 1976; LUTOMSKI; MALEK; RYBACKA, 1975). Em *P. edulis* Sims foram identificadas saponinas nas partes aéreas, codificadas como ciclopasiflosídeos VII, VIII, IX, X e XI. Todas as saponinas são triterpênicas, do tipo cicloartano e monodesmosídicas (YOSHIKAWA *et al.*, 2000).

2.3 IMPORTÂNCIA DAS ESPÉCIES DE *Passifloras* SILVESTRES: *P. setacea* E *P. tenuifila*

O interesse pela produção de frutos de espécies de *Passifloras* silvestres tem aumentado significativamente devido, principalmente, às potencialidades nutricionais e terapêuticas, bem como às propriedades sensoriais, demonstrados em estudos científicos (COSTA & TUPINAMBÁ, 2005; WONDRACEK, 2009). Além do potencial de consumo do fruto *in natura*, as espécies silvestres de maracujá são fontes de genes de resistência à doenças e patógenos, sendo importantes para os programas de melhoramento genético.

A espécie *P. setacea* foi descrita por DC em 1828, o nome da espécie *setacea* tem origem do latim e significa “em forma de setas” devido ao formato das estípulas. Essas plantas são encontradas em ambientes com alta incidência solar, comum em florestas primárias como capoeiras e restinga litorânea, a qual floresce e frutifica de setembro a maio (CERVI, 1997). Ocorre nos biomas do Cerrado e Caatinga e áreas de transição, como o semi-árido norte-mineiro (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005).

Uma importante característica de *P. setacea* é a sua resistência à doenças. Essa espécie de maracujazeiro vem sendo estudada pela Embrapa Cerrados, e as pesquisas evidenciam a existência de acessos com folhas resistentes à virose e de frutos e folhas resistentes à antracnose (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Em um trabalho realizado em 1999 por Lara *et al.*, essa espécie mostrou-se resistente à lagarta *Dione juno juno*. Também mostrou resistência à nematóides de raízes e apresentou-se

pouco acometida pela verrugose dos frutos (PAULA, 2006; YAMASHIRO 1979, *apud* SANTOS, 2006). Essas características são promissoras no aspecto biotecnológico, podendo essa espécie servir como porta-enxerto para o maracujá-amarelo comercial.

Através dos estudos com essa espécie realizados pela Embrapa Cerrados, foi possível obter uma variedade por policruzamentos de plantas selecionadas, que objetivou aumentar a produtividade e o tamanho dos frutos. Após vinte anos de pesquisas, a *P. setacea* foi a primeira *Passiflora* silvestre a ser registrada (RNC N° 21714) e protegida (SNPC Certificado N° 20120197) no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o nome de Pérola do Cerrado. No ano de 2013 aconteceu o lançamento oficial da espécie para os produtores, sendo repassadas informações para o cultivo da mesma, bem como o credenciamento de viveiros para disponibilizar as mudas.

As propriedades físico-químicas dos frutos de *P. setacea* atendem às necessidades das indústrias, assim, há um grande potencial, seja para a indústria alimentícia, com a utilização de sua polpa com sabor exótico, para a indústria farmacêutica, para a produção de suplementos e fármacos que possam prevenir ou curar doenças, e na produção de cosméticos (SANTOS *et al.*, 2005). Os frutos de *P. setacea* são ovóides e globosos com aproximadamente 5 cm de comprimento e 4 cm de circunferência, o suco é doce- acidulado. Quando maduros os frutos caem da planta, a polpa apresenta coloração amarelo clara e a casca verde clara com listras verde escuras.



Figura 1. Frutos e Flor de *P. setacea*.
Fonte: Embrapa Cerrados

A *Passiflora tenuiflora* é nativa do Brasil, também é conhecida como maracujá-alho, podendo ser encontrada em Goiás, Minas Gerais, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (BRAGA *et al.*, 2005). A *P. tenuiflora* apresenta características favoráveis para a aceitação na indústria alimentícia, a acidez é baixa e o teor de sólidos solúveis é maior que outras espécies de *Passiflora*, são frutos com coloração de casca amarelo-alaranjada, e de polpa amarela (BRAGA *et al.*, 2005).

A *P. tenuiflora* apresenta resistência à doenças e patógenos, como bacterioses (*Xantomonas axonopodis* PV. Passiflorae) e à verrugose (*Cladosporium herbarum*) (BRAGA *et al.*, 2005), contudo tem se mostrado sensível à fusariose nos estudos conduzidos pela Rede Passitec (não publicados), necessitando de ajustes de manejo para a sua produção. Essas propriedades são de grande importância para os programas de melhoramento genético.

Na literatura, são encontradas poucas referências sobre as análises químicas ou físicas dos frutos de *P. tenuiflora*, e até mesmo sobre o seu comportamento agrônomo. Utilizando um acesso da Embrapa Cerrados, BRAGA *et al.* (2005), avaliou algumas características de *P. tenuiflora*

demonstrando que os frutos apresentam baixo peso médio e a casca possui pouca espessura, uma interessante característica quando se visa aumento da produtividade da polpa. São frutos pequenos, de aproximadamente 44,73 mm de diâmetro longitudinal e 39,92 mm de diâmetro transversal. Possuem baixa acidez, aproximadamente 0,30 %, e Brix de 23,60, valor diretamente associado ao rendimento de suco, o 'ratio', que é a relação entre sólidos solúveis totais e acidez titulável total, também apresenta valores altos.

Segundo Costa *et al.* (2009), a elevação nos teores de fósforo no solo promoveu redução nos valores da acidez titulável nos frutos de *P. tenuifila*, mas sem interferência na concentração de sólidos solúveis totais, pH e ratio, o que sugere a influência deste elemento na regulação da via metabólica de ácidos orgânicos, em especial na via de síntese e acúmulo de citratos. A composição química do maracujá pode variar em razão de vários fatores, tais como: espécie, variedade, fertilidade do solo, práticas culturais, época de colheita, estágio de desenvolvimento do fruto, grau de maturação, manuseio pós-colheita e condições de armazenamento.



Figura 2. Fruto de *P. tenuifila*.
Fonte: Daniel Grasel. Flora, RS

Estudos têm sido conduzidos no INCOR (Instituto do Coração) sobre as avaliações das fibras dessas espécies de maracujá nativo sobre o controle do colesterol e sobre os tremores, estão sendo realizadas as avaliações pré-clínicas. Foi demonstrado o efeito positivo de uma formulação de preparado da polpa nas funções neuronais, com efeito anti-estresse e diminuição da sonolência diurna (MULLER *et al.*, 2011). O biodisponibilizado no soro foi avaliado por Costa *et al.* (2011) quando se verificou que a resposta neuronal pode estar sendo mediada via sinalizador secundário instável, cuja expressão é desencadeada pelo consumo da polpa. Um refinamento do estudo está sendo realizado com o apoio das equipes de Metabolismo e Saúde do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), França.

2.4. ESTRESSE OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O termo “radicais livres” é utilizado para denominar moléculas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, essas moléculas são instáveis, quimicamente muito reativas e com meia-vida curta. Muitas das funções fisiológicas normais podem ser afetadas pelos radicais livres (POMPELLA, 1997). O alvo dos radicais livres, que podem ser: lipídeos, carboidratos, DNA ou proteínas, está relacionado ao seu sítio de formação, ou seja: no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997) A utilização de oxigênio é fundamental na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos para a produção de energia. Porém, o consumo de oxigênio também pode ocasionar a formação de substâncias tóxicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As ERO também podem ser formadas a partir da poluição, tabagismo, radiação entre outros (CERUTTI, 1994). A ineficiência de defesas antioxidantes ou excesso de formação de ERO podem levar ao estresse oxidativo, que gera ciclos de reações oxidativas (REGOLI *et al.*, 2002). Diferentes tipos de ERO são listados abaixo.

Tabela 1. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

Símbolo	Nome
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxila
NO^-	Óxido nítrico
ONOO^-	Peroxinitrito

Fonte: Adaptado de Pompella, 1997.

A inibição de formação de ERO ocorre pela ação dos antioxidantes, que são substâncias que atrasam, previnem ou removem um dano oxidativo de uma molécula alvo. As células possuem mecanismos de defesa endógenos ou os adquiridos pela dieta, exógenos, os antioxidantes. Essas substâncias possuem níveis de proteção diferenciados que atuam principalmente inibindo a formação de ERO, neutralizando as ERO e reparando os danos ocasionados por essas espécies. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Vários tipos de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são listados a seguir, incluindo-se compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, dentre eles: os flavonóides, carotenos e ácido ascórbico. As vias de síntese desses metabólitos podem ser ativadas sob certas condições ambientais ou em determinadas fases do desenvolvimento das plantas (HIRATA *et al.*, 2004).

Tabela 2. Alguns agentes de defesa antioxidante.

Enzimáticos (endógenos)	Não Enzimáticos (exógenos)
Superóxido Dismutase	Flavonóides
Catalase	Glutationa
NADPH-quinona oxidoreductase	Carotenos
Glutationa Peroxidase	Ácido ascórbico
Enzimas de Reparo	Clorofilina
	α - tocoferol

Fonte: adaptado de Sies, 1993.

Os compostos bioativos com atividade antioxidante podem ser adquiridos pela dieta, através do consumo de frutas e verduras, alimentos ricos nesses compostos. Estudos demonstram que essa prática reduz o risco de doenças degenerativas e crônicas (JONH *et al.*, 2002; ZIBADI *et al.*, 2007). Os efeitos protetores das frutas e vegetais têm sido atribuídos aos polifenóis, carotenóides, e vitaminas C e E. Atualmente, a busca por fontes naturais de antioxidantes é uma forte tendência (FERRERES *et al.*, 2007). Nesse panorama, a investigação dos bioativos dos frutos é uma importante estratégia para conhecer a constituição química que pode representar uma fonte potencial para o consumo *in natura* ou uso como aditivos naturais em alimentos, representando uma alternativa mais saudável à adição de conservantes químicos.

Os compostos fenólicos são substâncias naturais que estão presentes em plantas, frutas e vegetais incluindo também óleo de oliva, vinho tinto e chá. São divididos em ácidos fenólicos, flavonóides e polifenóis não-flavonóides (RAMASSAMY, 2006). Os compostos polifenólicos possuem pelo menos um anel benzênico ligado a um grupamento hidroxila. São sintetizados pela via do ácido chiquímico, originando o aminoácido aromático fenilalanina, sendo esse o intermediário inicial da síntese dos fenilpropanóides. A fenilalanina, através da ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), origina ácido cinâmico, que é hidroxilado a ácido-p-cumárico, que por sua vez é convertido a *p*-cumaroil-CoA, sendo esse o substrato para a síntese das classes de compostos fenólicos. A via do acetil-CoA também pode sintetizar

cumaroil-CoA (VERMERRIS & NICHOLSON, 2008). O consumo desses compostos está relacionado a efeitos protetores contra o câncer e doenças cardiovasculares, bem como a vitamina C e os carotenóides (HEIM *et al.*, 2002). Nas plantas, são formados em condições de estresse, como ferimentos, radiações UV, infecções, dentre outras, e nos alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (NACZK & SHAHIDI, 2006; ANGELO & JORGE, 2007).

Os flavonóides são uma ampla classe de metabólitos secundários fenólicos que possuem propriedades antioxidantes e quelantes. Atualmente, mais de 8.000 flavonóides já foram identificados (PIETTA, 2000), estão amplamente distribuídos em plantas nas mais diversas partes como: folhas, sementes, cascas, flores, polpas de frutas (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Também são encontrados em algas, briófitas e pteridófitas. Nas angiospermas, apresentam enorme diversidade estrutural (SIMÕES *et al.*, 2000). A estrutura desses compostos consiste de um esqueleto de difenil propano (C₆C₃C₆) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (Figura 3).

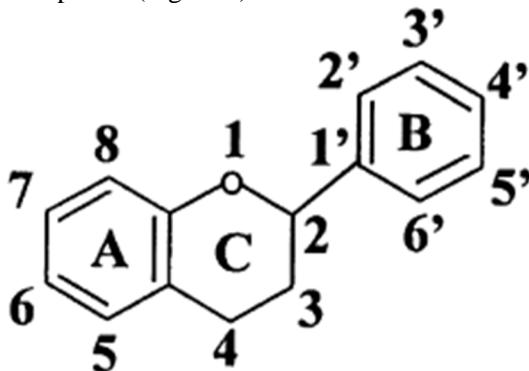


Figura 3. Estrutura dos flavonóides.

Os tipos e concentrações de flavonóides podem variar dependendo da planta e do órgão em que se encontram. O metabolismo desses compostos também pode ser influenciado por diversos fatores como: períodos de seca ou chuva, radiação solar, estação do ano e poluição (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Nas plantas, têm função de proteção de raios UV, contra patógenos, inibição enzimática e ação antioxidante, sendo, os pigmentos responsáveis pela atração de polinizadores (HEIM *et al.*, 2002).

Na via de biossíntese dos compostos fenólicos e flavonóides, o ácido cinâmico e o ácido *p*-cumárico são os principais precursores dos flavonóides, lignina, suberina, antraquinonas (ácido cinâmico) e naftaquinonas (ácido *p*-cumárico). Esses compostos têm origem a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, que são sintetizadas através da via do ácido chiquímico. Na biossíntese do ácido chiquímico, a eritrose-4-fosfato e o fosfoenol piruvato (PEP) (dois compostos originados a partir do metabolismo da glucose) reagem e produzem o DAHP (ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosônico-7-fosfato), um açúcar fosforilado de sete carbonos. O DAHP sofre ciclização formando o ácido -3- desidrochiquímico que é convertido em ácido chiquímico. Os ácidos cinâmico e *p*-cumárico são intermediários fundamentais da biossíntese de flavonóides, que ocorrem nas raízes das plantas em baixas concentrações, mas que tem como sítios principais de biossíntese as folhas, pétalas e frutos em amadurecimento. A biossíntese de ácido cinâmico é catalizada pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL), a partir da fenilalanina, cuja atividade é determinada pela luz e o ácido *p*-cumárico, que é sintetizado a partir da tirosina, através da enzima TAL (tirosina amônio liase). O ponto essencial de controle da biossíntese de flavonóides ocorre com a deaminação do aminoácido fenilalanina (tirosina em algumas espécies) catalizado pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL) e pela TAL (tirosina amônio liase).

Os pigmentos carotenóides podem ser encontrados em frutas, raízes, flores, peixes, algas, bactérias, crustáceos, mofos e leveduras, estão amplamente distribuídos e estima-se que na natureza podem ser encontrados mais de 600 tipos de carotenóides (RODRIGUEZ- AMAYA, 1997). Esses compostos são caracterizados por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas contendo 40 átomos de carbono, sempre com uma ou duas cadeias cíclicas (CARDOZO *et al.*, 2007). Uma interessante propriedade de alguns carotenóides é a capacidade de serem convertidos em vitamina A, desempenhando um importante papel nutricional. Em países de terceiro mundo, os carotenoides representam uma das principais fontes de vitamina A (OLSON, 1989). Outras funções dos carotenóides estão relacionadas á diminuição do risco de doenças degenerativas, prevenção da formação de catarata, redução da degeneração macular relacionada ao envelhecimento, e redução do risco de doenças coronárias (KRINSKY, 1994). O β -caroteno e β -criptoxantina possuem atividade pró-vitáminica A, a luteína e zeaxantina não possuem essa capacidade, porém são importantes na degeneração macular associada à idade. Vários tipos de carotenóides são apresentados na Figura 4.

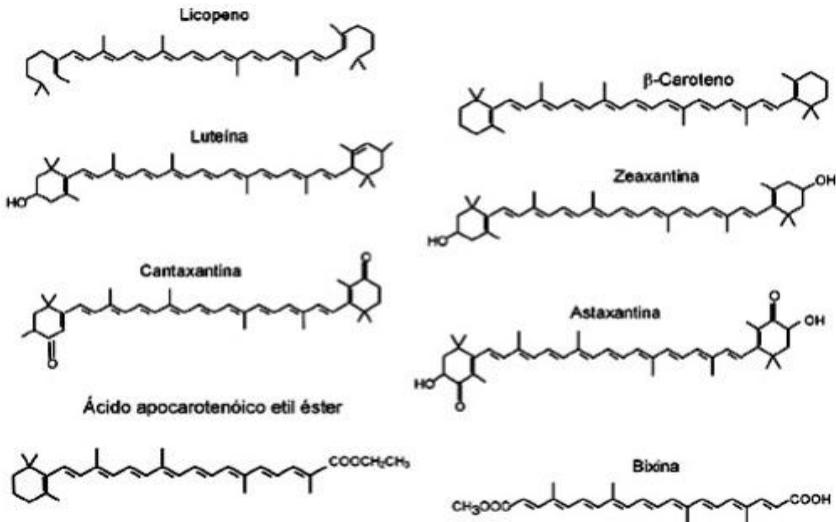


Figura 4. Estrutura de alguns carotenóides.

Os carotenóides possuem capacidade de bloquear e inativar espécies reativas de oxigênio formadas na presença de luz e ar. O β-caroteno reage com um radical peroxil e interrompe a cadeia de propagação das ERO. A zeaxantina e luteína são excelentes antioxidantes lipossolúveis que bloqueiam radicais livres. Os compostos fitoquímicos também podem ter efeitos sinérgicos e aumentar a capacidade antioxidante.

Segundo Hannoufa & Hossain (2012) os carotenóides, nas plantas, são componentes essenciais dos sistemas fotossintéticos envolvidos na absorção da luz e desempenham importante papel na prevenção dos danos fotoxidativos. Os carotenóides são sintetizados nas plantas superiores a partir do gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, que são convertidos através de várias reações em geranyl geranyl difosfato e fitoeno, através da enzima fitoeno sintase (PSY). Essa enzima é codificada por famílias de multi-genes na maioria das plantas, exceto em *Arabidopsis* em que é codificada por um único gene. A partir do fitoeno são produzidos o ζ-caroteno e depois o licopeno, que a partir da ação das ε- e β-ciclasas pode seguir a rota de conversão em α-caroteno e depois luteína, através da ação das ε- e β-hidroxilases, ou então a rota de conversão em β-caroteno (através das β-ciclasas), que em seguida é convertido em β-criptoxantina, zeaxantina (através das β-hidroxilases), anteraxantina, violaxantina (através da

epoxidase), que através de várias reações é convertida finalmente no ácido abscísico. Os passos considerados gargalos da regulação do fluxo da via biossintética dos carotenoides são: a formação de fitoeno, sob controle da enzima fitoeno sintase (PSY), a formação do licopeno (sob controle das enzimas fitoeno e caroteno desaturases e isomerases), a conversão de licopeno em α - ou β - caroteno (sob controle dos dois tipos de enzimas licopeno ciclases, as ϵ - e β -ciclases) e o ciclo da xantofila (sob controle das enzimas zeaxantina epoxidase (ZE, zeaxantina > violaxantina) e violaxantina de-epoxidase (VDE, violaxantina > zeaxantina). Assim, segundo esses autores, nos tecidos verdes a zeaxantina pode ser epoxidada à violaxantina, via intermediário anteraxantina, reação catalizada pela zeaxantina epoxidase, ativada no escuro. Essa reação é reversível e a violaxantina pode ser convertida de volta para a zeaxantina na luz, pela ativação da violaxantina de-epoxidase (VDE). Além da luz, o pH regula a ação dessas enzimas.

Os produtos do catabolismo dos carotenóides são também importantes nos mecanismos de defesa das plantas, como por exemplo, as beta-iononas, produto do catabolismo envolvido na interação inseto-planta. Além disso, dois fitormônios ABA (ácido abscísico) e estrigolactonas são derivados de carotenoides e mostram a importância desses compostos como reguladores do crescimento das plantas. O nível de carotenóides que será acumulado na célula vegetal depende da taxa de biossíntese, que é regulada no nível transcricional e epigenético, do nível de catabolismo (atividade das dioxigenases) e da habilidade da célula de sequestrar e armazenar os carotenóides.

A vitamina C, também denominada ácido ascórbico, é considerada um nutriente essencial, que previne contra o escorbuto. Em períodos longos em viagem, os marinheiros alimentavam-se essencialmente de charques e pães, não consumindo frutas e verduras. A ocorrência de escorbuto era comum entre esses indivíduos, devido à ausência de vitamina C, que está presente nesses alimentos. A doença caracteriza-se por inflamações da gengiva, perda dos dentes, rompimento dos vasos sanguíneos que acarretam hemorragias e comprometimento do sistema imunológico, podendo levar pacientes à óbito. A descoberta do ácido ascórbico se deu em 1927, pelo cientista húngaro Albert Szent-Györgyi, mas ganhou notoriedade com o químico Linus Carl Pauling por suas propriedades antioxidantes (PAULING, 1988). Outras importantes características dessa vitamina são a capacidade de conversão do colesterol em ácidos biliares e no metabolismo iônico de minerais, também estimula a absorção de ferro não-hêmico pelo intestino, por meio de sua redução, e modula os transportes de íons, bem como seu armazenamento

(WINTERGERST *et al.*, 2006; HALLBERG & HULTHEN, 2000). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), preconiza a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina C para adultos sendo de 45 mg/ dia. Após atingir a concentração máxima nos tecidos, o excesso de ácido ascórbico é eliminado pelos rins (ARANHA *et al.*, 2000). Autores sugerem que a vitamina C faça parte da primeira linha de defesa do organismo (SILVA & COZZOLINO, 2007), protegendo as proteínas, os lipídios e o DNA da oxidação (WINTERGERST *et al.*, 2006).

2.5. CLOROFILAS

As clorofilas são pigmentos que absorvem luz, responsáveis pela fotossíntese nas plantas. Nas reações luminosas esses pigmentos absorvem a energia luminosa e a conservam na forma química de ATP e NADPH, que por sua vez reduzem o CO₂ para formar glicose. A molécula de clorofila é uma porfirina, possui anéis de pirrol (que contêm 4 carbonos e um nitrogênio) com um Mg central. A molécula contém ainda um anel isocíclico e um resíduo do ácido propiônico, na posição do carbono 17, o qual possui, no último dos três carbonos, uma cadeia alcoólica saturada e hidrofóbica (STREIT *et al.*, 2005). A clorofila b difere da clorofila a pela presença de um resíduo aldeído no lugar do grupo metila na posição 7, o que lhe confere maior polaridade. A clorofila a realiza a fotossíntese e a clorofila b é um pigmento acessório que absorve luz e transfere energia para os centros de reação (STREIT *et al.*, 2005; SENGE *et al.*, 2006). O teor de clorofila diz respeito à quantidade de energia transferida para a assimilação do carbono (STREIT *et al.*, 2005; SENGE *et al.*, 2006; CIGANDA *et al.*, 2008). Com o amadurecimento dos frutos, ocorrem mudanças adaptativas estruturais e bioquímicas, como o tamanho dos cloroplastos, a atividade das enzimas de assimilação de carbono e relação entre clorofila a e b (KULL, 2002; NIINEMETS, 2007).

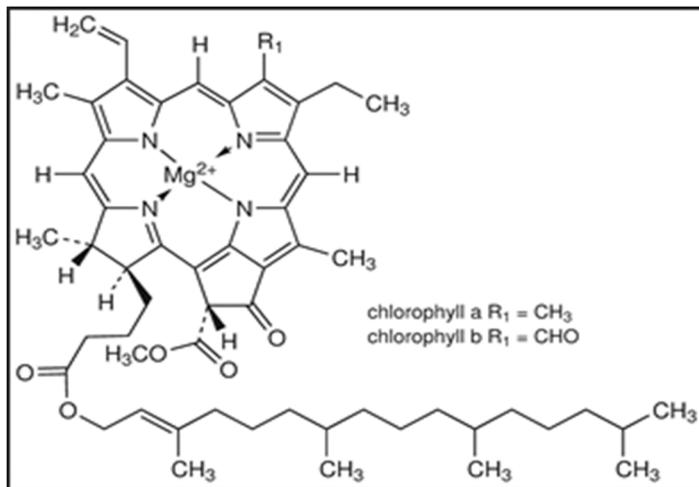


Figura 5. Estrutura das clorofilas *a* e *b*.

O interesse relativo à atividade antioxidante das clorofilas iniciou-se na década de 80. Sakata *et al.* (1990) estudaram a inibição de peroxidação lipídica da clorofila em modelos *in vitro* e testes químicos. Vários autores relatam a atividade antioxidante da clorofila *in vitro* (NAGUIB, 2000; CAHYANA *et al.*, 1993). Le Tutour *et al.* (1996) estudaram o efeito sinérgico Vitamina E à Clorofila a, concluindo que a mesma aumentou em 24% a preservação do lenoleato de metila em um sistema modelo. A atividade antimutagênica já foi relatada para clorofila e seu derivado sintético, clorofilina cúprica (CHENORMORSKY *et al.*, 1999; DASHWOOD *et al.*, 1998). Gentile & Gentile (1991) demonstraram que a clorofila tem atividade inibitória frente à condensados de substâncias carcinógenas. Além disso, isolados de clorofilas de algas apresentaram atividade antimutagênica (CHENORMORSKY *et al.*, 1999), porém o mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado e parece estar parcialmente relacionado com a formação do complexo com a substância carcinogênica (BREINHOLT *et al.*, 1995).

2.6. BIOTECNOLOGIA DE *Passifloras*

Várias técnicas podem ser utilizadas para viabilizar o desenvolvimento tecnológico para o uso funcional e medicinal das *passifloras* silvestres. As técnicas moleculares podem ser utilizadas na

caracterização de germoplasma e no melhoramento genético. As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam o desenvolvimento de sistemas de regeneração de plantas, de micropropagação, de culturas de células para a biossíntese de metabólitos secundários e de conservação *in vitro*. Entretanto, a falta de protocolos de regeneração eficientes para a maioria das espécies de *Passifloras* e a escassez de pesquisas sobre conservação *in vitro*, não tem permitido, ainda, o uso extensivo desta tecnologia. Dessa forma, de acordo com Antognoni *et al.* (2007) os trabalhos sobre culturas de tecidos de *Passifloras* têm se restringido em viabilizar a rápida multiplicação clonal de cultivares geneticamente superiores, em programas de melhoramento e conservação de germoplasma, mas não tem sido direcionados para avaliar o potencial das culturas *in vitro* de células, tecidos e órgãos de *Passifloras* para a produção de metabólitos secundários, estratégia promissora para atender a grande demanda atual por produtos naturais.

A maioria dos estudos sobre biotecnologia de *Passifloras* concentra-se sobre as espécies comercializadas. Estudos sobre cultura *in vitro* de espécies de *Passifloras* foram desenvolvidos por Dornelas & Vieira MLC (1994), por Rodriguez *et al.* (2007) para *P. alata* e sobre criopreservação para *P. pohlii* por Merhy *et al.* (2012). Sistemas de organogênese e regeneração de plantas *in vitro* foram estabelecidos para o híbrido de *Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (HALL *et al.*, 2000), para *P. alata* (PINTO *et al.*, 2010), para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (TREVISAN *et al.*, 2005; APPEZATO-DA -GLÓRIA *et al.*, 1999; BECERRA *et al.*, 2004; DESAI *et al.*, 1985), para *P. suberosa* (GARCIA *et al.*, 2011) e para *P. cincinnata* (LOMBARDI *et al.*, 2007). Sistemas de micropropagação foram desenvolvidos para variedades de *Passiflora edulis* Sims. (ITSUTSA, 2004; KAWATA *et al.*, 1995) e *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg (MONTEIRO *et al.*, 2000).

Os poucos trabalhos disponíveis sobre culturas de calos e suspensões celulares foram desenvolvidos para *P. alata* (PACHECO *et al.*, 2012), para *P. suberosa* (GARCIA *et al.*, 2011) e por Desai *et al.* (1985). O único trabalho encontrado na literatura, em que as culturas celulares foram manipuladas por elicitores foi o realizado por Antognoni *et al.* (2007), que demonstrou que a irradiação por UV-B e o tratamento com metil jasmonato de calos produzidos *in vitro* de *P. quadrangularis* aumentou a produção de flavonoides e a atividade antioxidante, indicando o potencial de sucesso da aplicação da abordagem biotecnológica para a produção de metabólitos secundários de *Passifloras*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Frutos

Os frutos das espécies de *Passiflora setacea* variedade BRS Pérola do Cerrado e *Passiflora tenuifila*, utilizados para esse experimento foram coletados na unidade de cultivo da Embrapa Cerrados Unidade de Planaltina, Brasília a qual está localizada na Lat: 15° 35' 30" S e long. 47° 42' 30" W; com altitude de 1007 m, em fevereiro de 2013. Para *P. tenuifila* foram estabelecidos quatro pontos de estádios de maturação estipulados por Lima *et al.* (2010). Para *P. setacea* também foram estabelecidos quatro estádios de desenvolvimento a serem analisados a partir da abertura da flor (Tabela 3).

Tabela 3. Estádios de maturação de frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* coletados em Planaltina-DF.

Estádio de Maturação	Definição	Idade (dias)
Estádio 1	Fruto imaturo incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta	8
Estádio 2	Fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta	25
Estádio 3	Fruto maduro, com um dia de queda da planta	50
Estádio 4	Fruto com 4 dias de prateleira	54

Os quatro estádios de desenvolvimento estabelecidos para as análises com *Passiflora tenuifila*, podem ser observados na Figura 6,

onde: Estádio 1: fruto imaturo, incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta (Figura 6, fruto 1); Estádio 2: Fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta (Figura 6, fruto 3); Estádio 3: Fruto maduro, com um dia de queda da planta (Figura 6, fruto 5); Estádio 4: Fruto maduro, com quatro dias de prateleira (Figura 6, fruto 6).



Figura 6. Desenvolvimento do fruto de *P. tenuifila* com base em indicadores de maturidade. 1 e 2 - Fruto imaturo incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta. 3 a 5 fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta. 6 Fruto totalmente maduro. 7. Fruto senescente.

Fonte: LIMA *et al.* 2010.

Os quatro estádios de desenvolvimento estabelecidos para as análises com *Passiflora setacea*, podem ser observados na Figura 7, onde: Estádio 1: fruto imaturo, incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta (Figura 7, fruto 1); Estádio 2: Fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta (Figura 6, fruto 3); Estádio 3: Fruto maduro, com um dia de queda da planta (Figura 7, fruto 5); Estádio 4: Fruto maduro, com quatro dias de prateleira (Figura 7, fruto 6).

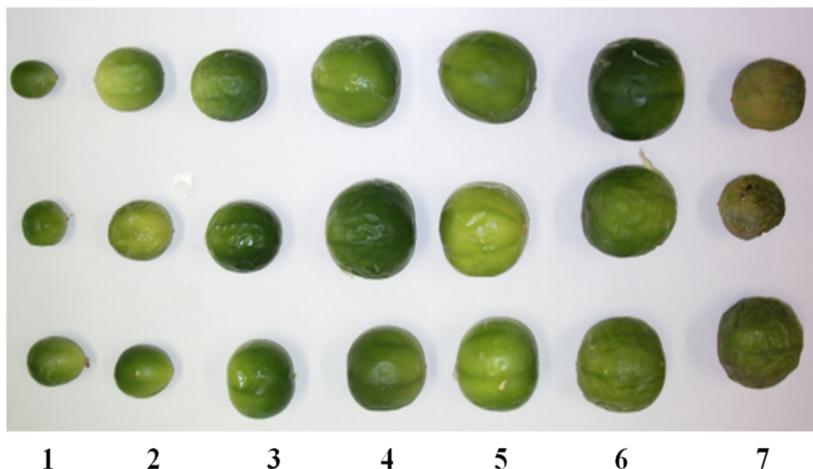


Figura 7. Desenvolvimento do fruto de *P. setacea* com base em indicadores de maturidade. 1 e 2 - Fruto imaturo incapaz de completar o ciclo de desenvolvimento fora da planta. 3 a 5 fruto capaz de completar o processo de maturação independente da planta. 6 Fruto totalmente maduro. 7. Fruto senescente.

Fonte: BOMTEMPO, 2011.

No processamento os frutos foram sanitizados, cortados com faca de aço inoxidável e o despulpamento foi realizado com auxílio de uma espátula e peneira separando polpa e semente em *P. setacea*, os frutos de *P. tenuifila* foram processados integralmente conforme POP CPAC-2012. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises.

3.1.2. Sementes

As sementes de ambas as espécies foram separadas dos frutos, trituradas e lavadas com CH_2Cl_2 (1:1; m/v) e armazenadas em ultrafreezer -80°C até o momento das análises.

Foram estabelecidos 5 estádios de desenvolvimento, baseados nos indicadores de maturação dos frutos para *P. tenuifila* (Figura 6, frutos de 1 ao 5) e *P. setacea* (Figura 7, frutos de 1 ao 5). As sementes de *P. tenuifila* podem ser observadas na Figura 8, e as sementes de *P. setacea*, na Figura 9.

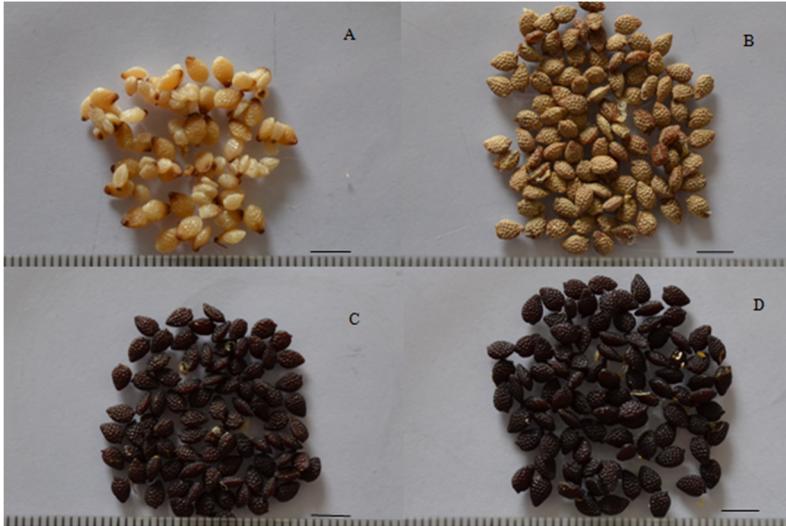


Figura 8. Sementes de *P. tenuifila* nos estádios de desenvolvimento 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D). Barra=5 mm.



Figura 9. Sementes de *P. setacea* nos estádios de desenvolvimento 2 (A), 3 (B), 4 (C) e 5 (D). Barra=5 mm.

3.1.3. Calos

Para a produção de calos foram utilizadas sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* do banco de germoplasma de *Passifloras*, cedidas pela Embrapa Cerrados.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Indução de calos

3.2.1.1. Desinfecção de sementes e germinação *in vitro*

As sementes foram lavadas com água da torneira e detergente neutro, enxaguadas quatro vezes e, em fluxo laminar, foram imersas por 10 minutos em solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa®) com 2,5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de algumas gotas de detergente. Em seguida, foram enxaguadas por quatro vezes com água destilada esterilizada para a remoção de resíduos de hipoclorito e detergente e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

3.2.1.2. Preparação de meio de cultura

A preparação do meio de cultura foi realizada conforme descrito por Nunes *et al.* (2007). O meio de cultura utilizado para o estabelecimento de plântulas e indução dos calos foi o meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), uma mistura em pó preparada pela Sigma Chemical Co., na concentração de 4,4 g/L, suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, utilizando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou de ácido clorídrico 0,1 N. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 20 x 150 mm (8 ml de meio por tubo). Todos os tubos foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 18 minutos a $1,1 \text{ Kgf/cm}^2$ e 121°C .

3.2.1.3. Indução de calos a partir de diferentes tipos de explantes de plântulas de *P. setacea*

Segmentos (1 cm de comprimento) de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar e nó foliar foram removidos de plantas axênicas com 8 semanas de idade, originadas a partir da germinação das sementes e inoculados em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2% (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.2.1.1. Após 45 e 60 dias as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos e coletadas para as análises fitoquímicas.

3.2.1.4. Indução de calos a partir de sementes de *P. tenuifila*

Frutos verdes, em desenvolvimento, de *P. tenuifila* foram coletados, lavados com água corrente e detergente comercial e imersos em álcool comercial por 5 min. Em seguida foram dissecados e as sementes removidas e inoculadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2 % (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido 2-4-diclorofenóxiacético (2,4-D). As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.2.1.1. Após 50 e 80 dias as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos e coletadas para as análises fitoquímicas. Também foram analisados, em um dos experimentos, culturas de calos de 80 dias de idade, produzidos a partir de sementes inoculadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de frutose, 0,2% (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido naftalenoacético (ANA).



Figura 10. Plântula de *P. setacea* (A) de 8 semanas de idade cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel. As setas indicam, da base para o ápice radícula pouco desenvolvida, hipocótilo, nó cotiledonar, epicótilo, nó foliar. Barra=12,5 mm. Microplantas de *P. tenuifila* (B) de 6 meses de idade cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose, 0,2% (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido giberélico (GA_3). Barra=20 mm.

3.2.1.5. Indução de calos a partir de segmentos de caules de microplantas de *P. tenuifila*

Segmentos de caules de 3 mm foram removidos de microplantas de 11 meses iniciadas a partir de segmentos apicais de plântulas de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose, 0,2 % (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de ácido giberélico (GA_3). Os segmentos de caules foram removidos e inoculados em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2 % (m/V) de Phytigel e 2,5 μ M de 2,4-D. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.2.1.1. Após 90 dias as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos e coletadas para as análises fitoquímicas.

3.2.1.6. Determinação de massa seca e do teor de água dos calos

Para a determinação da massa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura e, para a determinação da massa seca, os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro e mantidos em estufa, por 24 horas a 85°C. O teor de água dos calos foi expresso em porcentagem da massa fresca e em mg de água por mg de massa seca, determinados através da seguinte fórmula (LAUDANO, 2005):

$$\text{Teor de água (\% da massa fresca)} = \frac{(\text{massa fresca} - \text{massa seca})}{\text{massa fresca}} \times 100$$

3.2.2. Análise do perfil metabólico

3.2.2.1. Espectrofotometria de UV-Vis

Para a espectrofotometria de varredura UV-Vis, aproximadamente 2 g de massa fresca de amostra (calos, polpa ou semente) de cada tratamento foram triturados em solvente clorofórmio: metanol (1:1 v/v) em quantidade equivalente a 3 volumes da massa utilizada, durante 2 minutos, com o auxílio de cadinho e pistilo. Cada extrato foi transferido para um tubo de ensaio e ficou em repouso em temperatura ambiente durante 15 minutos. Os extratos foram então filtrados a vácuo e colocados em placa de Petri até que o solvente evaporasse completamente, dentro da capela de exaustão. Para acelerar este processo, as placas foram deixadas *overnight* em estufa aberta a 60°C. Os extratos secos foram re-suspendidos em 4 mL de metanol e centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Em cubeta de vidro, 3 mL de cada amostra foram submetidos a 5 varreduras em espectrofotômetro UV-vis (200 – 800 nm). Os valores de absorvância obtidos foram plotados em planilha do Microsoft Office Excel 2007 e um gráfico foi gerado a partir da média dos valores obtidos nas varreduras.

3.2.3. Análises quantitativas de fenólicos totais, flavonóides totais, carotenóides, ácido ascórbico e clorofila

3.2.3.1. Compostos fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais foram preparados extratos com 1 g de massa fresca de amostra (calos, polpa ou semente) de cada tratamento macerada em 10 mL de metanol 80% (MeOH 80%). Após permanecerem em repouso por 1 hora ao refúgio da luz, as amostras foram filtradas a vácuo e centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com a metodologia de Rhandir *et al.* (2002), com modificações. Em um tubo de ensaio foi adicionado 40 μL do extrato de amostra, 3,16 mL de água destilada, 200 μL de Reagente de Folin- Ciocalteau e 600 μL de Carbonato de sódio a 20%, as misturas foram agitadas em vórtex e deixadas em repouso no escuro por 2 horas. Em microplacas de poliestileno com 96 cavidades foram transferidos 300 μL de cada amostra e do controle e a leitura foi realizada em leitora de microplacas à 750 nm. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 1250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $r^2 = 0,998$; $y = 210,7x$). Os resultados foram expressos em μg de ácido gálico por g de massa seca.

3.2.3.2. Flavonóides Totais

Para a determinação de flavonóides totais foi preparado um extrato metanólico com 1g de massa fresca de amostra (calos, polpa ou semente) macerada em 10 mL de MeOH 80%. Após permanecerem em repouso por 1 hora ao refúgio da luz, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e filtradas a vácuo. As quantificações foram realizadas de acordo com Zacarias *et al.* (2007), com modificações. Em um tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de etanol, 0,5 mL da amostra e 0,5 mL de cloreto de alumínio 2%. As misturas passaram em vórtex e permaneceram em repouso no escuro por 1 hora. As leituras foram feitas em espectrofotômetro com UV-Vis, em comprimento de onda de 420 nm e a quantificação dos flavonóides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (0,5 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $r^2 = 0,999$; $y = 0,313x$). Os resultados foram expressos em μg de quercetina por g de massa seca.

3.2.3.3. Carotenóides

As amostras de 1g de massa fresca (calos, polpa ou semente) foram maceradas em 10 mL de solução hexano: acetona (50:50, v/v), contendo 100 mg.L⁻¹ de BHT (butil-hidroxi-tolueno) na proporção 1:10 (p/v). Após a maceração, as amostras foram mantidas em repouso por 1 hora em câmara escura, filtradas sob vácuo e o solvente evaporado sob fluxo de Nitrogênio gasoso. O extrato recuperado foi ressuspense em 3 mL de metanol PA e, posteriormente, submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL.min⁻¹. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina, β e α – caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenoides foi feita utilizando-se curva padrão externa de luteína (2,5 a 50 µg.mL⁻¹; r² = 0,99; y = 7044x) e β – caroteno (0,01 a 5 µg.mL⁻¹; r² = 0,99; y = 1019x) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de carotenóides foi expressa em µg por g de massa seca.

3.2.3.4. Determinação dos teores de Ácido ascórbico

A determinação do conteúdo de vitamina C total foi baseada na metodologia descrita por Terada *et al.* (1979), modificada por Nunes *et al.* (1995) e Moretti *et al.* (1998). Em tubos de 50 mL foram adicionadas 2g das amostras frescas de polpa e homogeneizadas com 20mL de mistura ácida (ácido metafosfórico e ácido acético 2N), essas amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 4. Ao atingir a temperatura ambiente 1,0 mL do extrato foi incubado com 50µL de DCPIP 0,2% por 1 hora. Ao final do período de incubação, 1 mL de tiouréia 2% foi adicionado à cada tubo e homogeneizado em vórtex, então 0,5mL de DNPH 2% foram adicionados aos tubos, que foram novamente agitados em vórtex e levados ao banho-maria à 60° C por 3 horas. Após esse período, os tubos foram colocados em banho de gelo e 2,5mL de H₂SO₄ 90% gelado foram cuidadosamente adicionados aos tubos. As

leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 540 nm e as concentrações determinadas através de curva padrão de ácido ascórbico (5 a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $r^2=0,9991$, $y=0,0224x$).

3.2.3.5. Clorofila

A clorofila foi dosada conforme metodologia descrita por Hiscox & Israelstam (1979), com modificações. A amostras de 100 mg de massa fresca adicionou-se 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e os tubos foram mantidos em estufa a 50° C durante 6 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis, em 645 e 663 nm. Para a quantificação das clorofilas foi utilizada a Fórmula de Arnon (1949) e os resultados foram expressos em μg de clorofila por g de massa seca.

$$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ de clorofila a} = 0,0127\cdot D_{663} - 0,00269\cdot D_{645}$$

$$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ de clorofila b} = 0,0229\cdot D_{645} - 0,00468\cdot D_{663}$$

3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH• (2,2- difenil-1- picrilhidrazil) pelos compostos antioxidantes presentes na amostra através do método de Kim *et al.* (2003). O extrato foi preparado com 1 g de amostra fresca (de calos, polpa ou semente) macerada com 10 mL de metanol 80%. Após permanecerem em repouso por 1 hora ao refúgio da luz, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Paralelamente, uma solução metanólica de DPPH 0,05 mM foi preparada de modo que apresentasse 0,6 de absorbância a 540 nm. Em microplacas de poliestileno de 96 cavidades foram adicionados 290 μL de solução DPPH e 10 μL de amostra. As leituras foram feitas em leitora de microplaca à 540nm de comprimento de onda. O BHT foi utilizado como padrão. A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$$\% \text{ de descoramento do DPPH} = \frac{(\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância da amostra})}{\text{Absorbância do Controle}} \times 100$$

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram executados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) simples ou multifatorial com separação de médias pelo teste de Tukey com nível de probabilidade de 95%. As análises de variância foram realizadas com o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. PERFIS METABÓLICOS OBTIDOS POR ESPETROFOTOMETRIA DE VARREDURA EM UV-VIS DE POLPAS E SEMENTES DE *Passiflora tenuifila* E *Passiflora setacea*

Os resultados de espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos e de sementes de *P. tenuifila* em diferentes estádios de desenvolvimento são apresentados na Figura 11. Os dados indicam que os extratos de polpas de frutos dos estádios 3 e 4 apresentaram as maiores absorbâncias nos intervalos entre 280 – 450 nm, sendo que os extratos dos estádio 1 e 2 apresentaram menor absorção nessa região, essas significativas diferenças de absorbâncias evidenciam que as amostras de extratos de polpas de frutos apresentaram perfis metabólicos distantes. Na região de absorção do UV-Vis, que compreende os comprimentos de onda de 650 até 690 nm, houve absorção pelos extratos de frutos do estádio 1 e 2. Os extratos metanólicos de sementes em diferentes estádios de maturação estão apresentadas na Figura 11B. Houve formação de picos de absorbância na região de 270 nm - 340 nm, ocorrendo a fusão de picos que levaram à formação de “ombros” mais evidentes no extrato de sementes no estádio 4. A menor absorbância ocorreu no extrato de sementes no estádio 1.

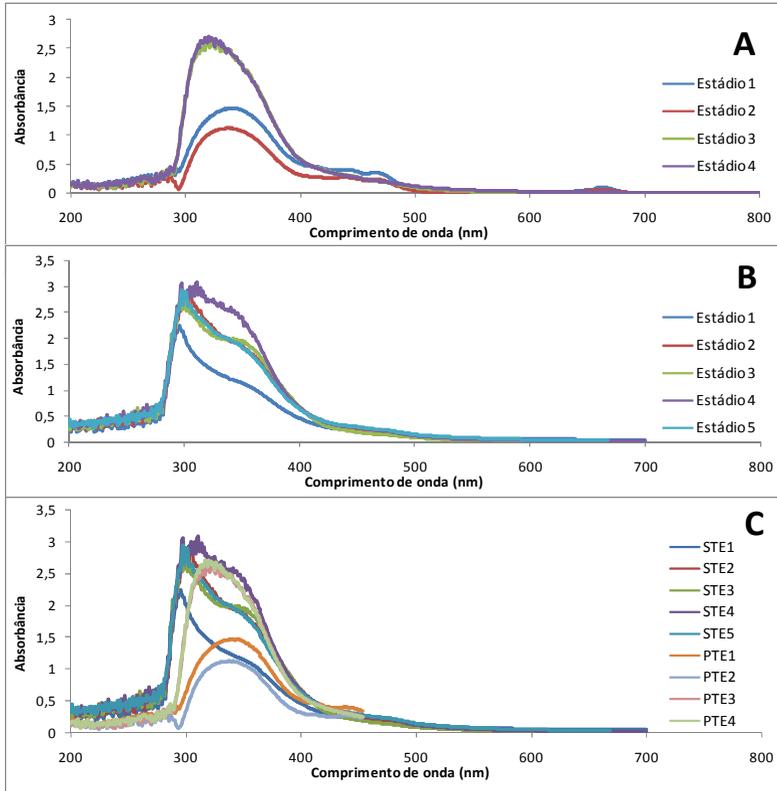


Figura 11. Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos (A) e sementes (B) de *P. tenuifila* em diferentes estádios de desenvolvimento. C) Polpas e sementes. STE1: Sementes *P. tenuifila* estágio 1; STE2: Sementes *P. tenuifila* estágio 2; STE3: Sementes *P. tenuifila* estágio 3; STE4: Sementes *P. tenuifila* estágio 4; STE5: Sementes *P. tenuifila* estágio 5; PTE1: Polpa *P. tenuifila* estágio 1; PTE2: Polpa *P. tenuifila* estágio 2; PTE3: Polpa *P. tenuifila* estágio 3; PTE4: Polpa *P. tenuifila* estágio 4.

Os resultados de espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos e de sementes de *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento, são apresentados na Figura 12. Observa-se na Figura 12A a ocorrência de picos de absorção na região 290nm – 350 nm, sendo que a menor absorção ocorreu em extrato de polpa do estágio 1 e a maior absorção ocorreu no extrato de polpa no estágio 4, a qual foi seguida por um ombro na região de 350nm –430 nm. Nas sementes (Figura 12B) houve absorção na faixa 290- 350 nm, com

menor absorção no estágio 1, maior absorção nos estádios 3 e 4, seguidas de formação de ombro entre 350- 430 nm.

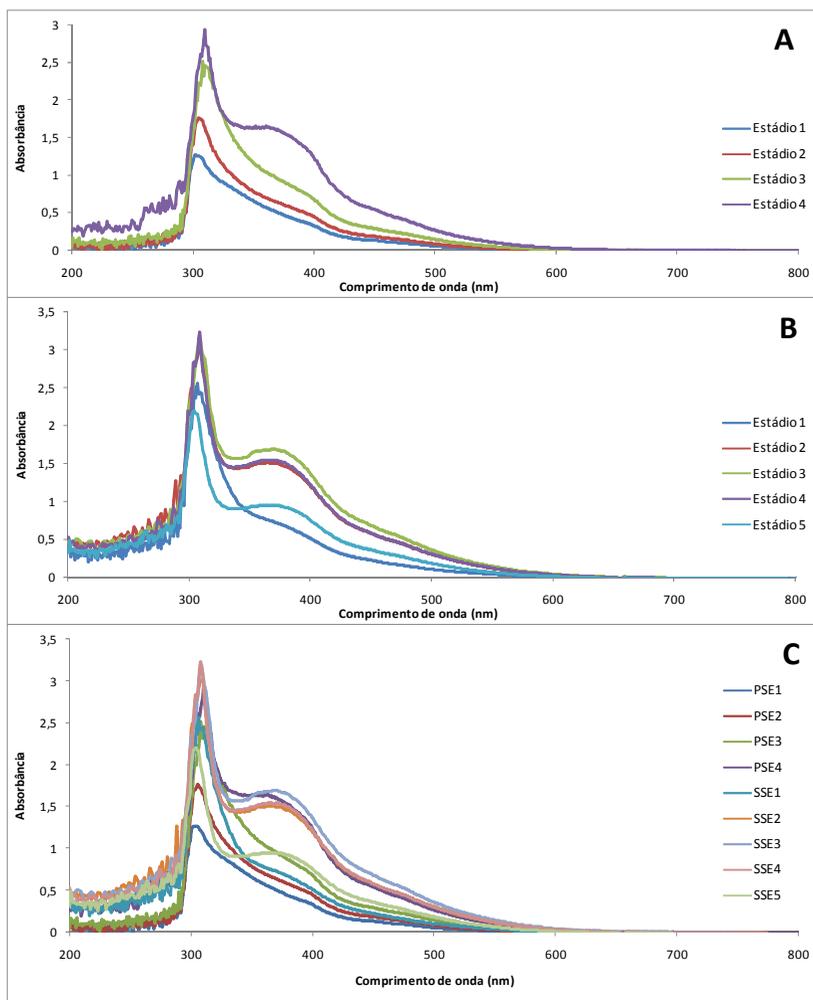


Figura 12. Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de polpas de frutos (A) e de sementes (B) de *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento. C) Polpas e sementes. PSE1: Polpa *P. setacea* estágio 1; PSE2: Polpa *P. setacea* estágio 2; PSE3: Polpa *P. setacea* estágio 3; PSE4: Polpa *P. setacea* estágio 4; SSE1: Semente *P. setacea* estágio 1; SSE2: Semente *P. setacea* estágio 2; SSE3: Semente *P. setacea* estágio 3; SSE4: Semente *P. setacea* estágio 4; SSE5: Semente *P. setacea* estágio 5.

4.2. PERFIS METABÓLICOS OBTIDOS POR ESPETROFOTOMETRIA DE VARREDURA EM UV-VIS DE CALOS DE *Passiflora tenuifila* E *Passiflora setacea*

Os resultados de espectrofotometria de varredura em UV-Vis em extratos metanólicos de calos de sementes em desenvolvimento e de segmentos de caules de microplantas de *P. tenuifila* com diferentes idades são apresentados na Figura 13A. Houve absorção na região 290- 400nm, o maior pico foi observado em calos de sementes em desenvolvimento com 50 dias e o menor em explantes de caule com 90 dias. Os resultados das análises de calos com diferentes idades obtidos a partir de diferentes explantes de plântulas de *P. setacea* estão apresentados na Figura 13B. Observa-se a ocorrência de picos de absorção entre 290- 400 nm. Explantes de cotilédone com 45 dias e 60 dias apresentaram maior absorção, e em calos de raiz com 60 dias de cultivo houve menor absorção.

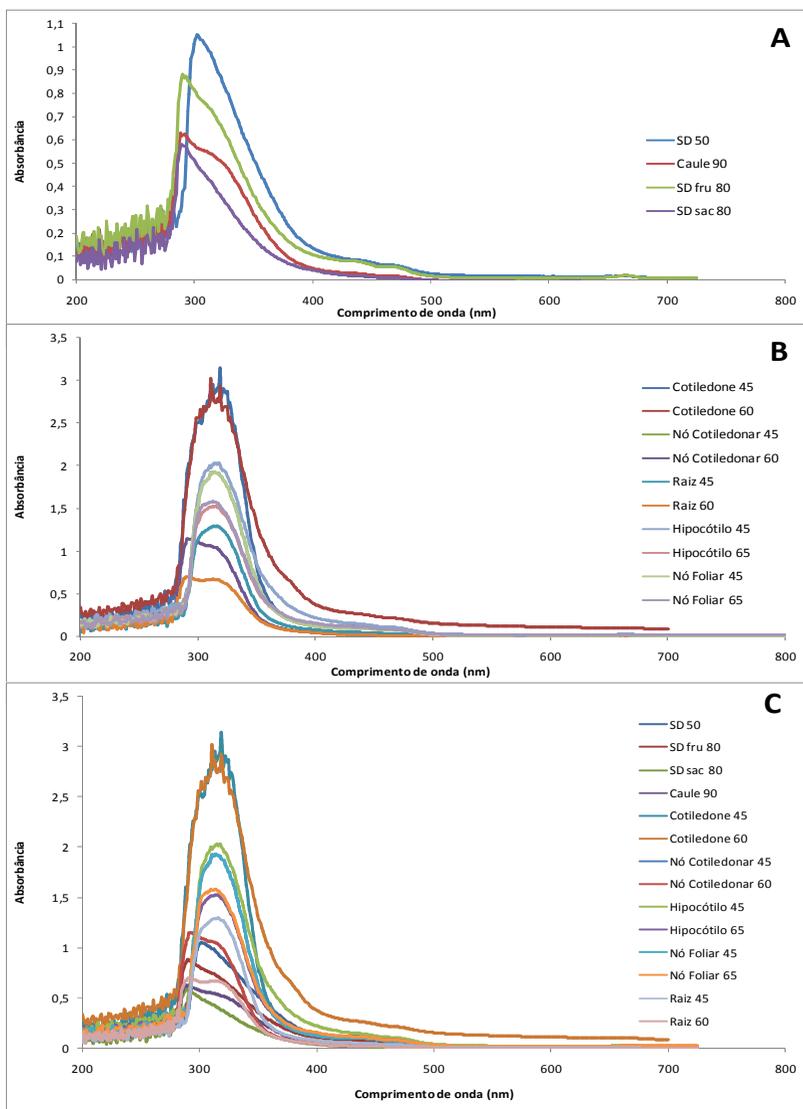


Figura 123. Espectrofotometria de varredura em UV-Vis de extratos metanólicos de calos de *P. tenuifila* (A) e *P. setacea* (B) iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 μ M de ANA. C) Calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

4.3. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, VITAMINA C, CLOROFILAS *a* E *b* E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM POLPAS DE FRUTOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea* EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Os resultados das análises de fenólicos totais, flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante de extratos de polpas de frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, em diferentes estádios de desenvolvimento, são apresentados na Tabela 4. Verifica-se que as concentrações de fenólicos totais aumentaram significativamente com o estádio de desenvolvimento dos frutos, tanto para *P. setacea* como para *P. tenuifila*, sendo que as maiores concentrações foram detectadas nos frutos no estádio 4, em ambas as espécies (146,06 µg EAG/g MS e 133,47 µg EAG/g MS, respectivamente). Observa-se que o maior nível de fenólicos totais foi detectado em frutos de *P. tenuifila* no estádio 4, sendo superior ao conteúdo dos frutos de *P. setacea*.

Os maiores níveis de flavonóides (entre 0,28 µg quercetina/g MS e 0,30 µg quercetina/g MS) foram observados em frutos nos estádios 1 e 2 de *P. tenuifila* e nos estádios 1 e 4 de *P. setacea*, não havendo diferença significativa entre eles.

Os conteúdos de vitamina C em frutos de *P. tenuifila* decresceram com o maior desenvolvimento dos frutos, variando de 44,96 mg/ 100 g no estádio 1 para 25,91 mg/100, g no estádio 4, enquanto que para *P. setacea* os valores aumentaram, variando de 8,20 mg/100 g, no estádio 1 para 20,11 mg/100 g, no estádio 4. Verifica-se que a maior concentração de vitamina C foi detectada nos frutos de *P. tenuifila* no estádio 1 (44,96 mg/100 g) valor que foi mais do que o dobro do valor máximo observado em *P. setacea* (20,11 mg/100 g).

A maior porcentagem de inibição de DPPH (Tabela 4) foi observada em frutos no estádio 4 de *P. setacea* (85,66%) enquanto que em *P. tenuifila* (68,77%) ocorreu nos frutos no estádio 3. Verifica-se que para *P. tenuifila* as porcentagens de inibição aumentaram significativamente nos frutos nos estádios 3 e 4 (68,77% e 61,27%, respectivamente), o mesmo ocorrendo com os frutos de *P. setacea* (76,33% e 85,66%, respectivamente).

Tabela 4. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides, vitamina C e atividade antioxidante de polpas de frutos de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Espécie	Estádios	Fenólicos totais (μg EAG/g MS) ^z	Flavonóides (μg quercetina/g MS) ^z	Vitamina C (mg/100 g MF) ^z	DPPH (% de inibição) ^z
<i>P. tenuifila</i>	1	93,56 \pm 0,50 g	0,29\pm0,01 ab	44,96\pm0,07 a	57,22 \pm 0,92 f
	2	115,15 \pm 1,00 c	0,28 \pm 0,05 ab	34,57 \pm 0,35 b	47,44 \pm 0,51 g
	3	109,81 \pm 0,36 d	0,23 \pm 0,06 c	32,77 \pm 0,75 c	68,77\pm 0,95 c
	4	146,06\pm0,26 a	0,27 \pm 0,02 b	25,91 \pm 0,02 d	61,27 \pm 1,36 d
<i>P. setacea</i>	1	90,68 \pm 0,47 h	0,30\pm0,01 a	8,20 \pm 0,18 h	68,77 \pm 0,59 c
	2	99,89 \pm 0,25 e	0,25 \pm 0,01 c	17,85 \pm 0,90 g	59,25 \pm 2,84 e
	3	96,00 \pm 0,85 f	0,23 \pm 0,00 c	19,87 \pm 0,92 f	76,33 \pm 1,24 b
	4	133,47\pm0,30 b	0,29\pm0,01 ab	20,11\pm0,44 e	85,66\pm0,17 a

^zMédias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). EAG=equivalente em ácido gálico. MS=massa seca; MF=massa fresca.

As análises dos carotenóides por CLAE (Tabela 5) indicam que os frutos de *P. tenuifila* nos estádios 1 e 3 apresentaram as maiores concentrações de luteína (entre 13,69 $\mu\text{g/g}$ MS e 14,01 $\mu\text{g/g}$ MS, respectivamente) do que os frutos de *P. setacea* (máximo de 1,43 $\mu\text{g/g}$ MS no estágio 1). Houve diminuição significativa nas concentrações de luteína nos frutos de *P. tenuifila* conforme passaram do estágio 2 para os estádios posteriores de desenvolvimento, enquanto que para *P. setacea* essa diminuição nos níveis de luteína já ocorreu a partir do estágio 1.

A zeaxantina foi detectada em todos os estádios de desenvolvimento de frutos de *P. tenuifila*, sendo as maiores concentrações observadas nos estádios 1 e 2 (3,91 $\mu\text{g/g}$ MS e 3,92 $\mu\text{g/g}$ MS, respectivamente), decrescendo significativamente nos estádio subseqüentes, enquanto que foi quantificada apenas no estágio 1 de frutos de *P. setacea* (máximo de 0,23 $\mu\text{g/g}$ MS), sendo observados apenas traços desse composto nos estádios 2 e 3.

A β -criptoxantina foi detectada apenas em frutos de *P. tenuifila*, nos três últimos estádios de desenvolvimento, sendo a maior concentração

(1,44 $\mu\text{g/g MS}$) observada em frutos do estágio 2, enquanto que o trans- β -caroteno foi detectado apenas no estágio 1 de frutos de *P. tenuifila* (1,77 $\mu\text{g/g MS}$) mas nos três primeiros estágios de desenvolvimento de frutos de *P. setacea*.

O α -caroteno foi detectado apenas nos frutos de *P. tenuifila* no estágio 1 (1,65 $\mu\text{g/g MS}$), assim como cis- β -caroteno (0,32 $\mu\text{g/g MS}$). Outros picos de carotenóides não identificados apareceram apenas nos frutos nos estágios 1 e 2 de *P. tenuifila*.

Tabela 5. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g MS}$) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de polpas de frutos de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Espécie	Estádios	Luteína ^z Rt (min)=3,8	Zeaxantina ^z Rt(min)= 4,2	β -criptoxantina ^z Rt (min)= 8,9	α -caroteno ^z Rt (min)=10,4	<i>trans</i> - β -caroteno ^z Rt (min)=11,9	Cis- β -caroteno ^z Rt (min)= 12,8	Não identificado
<i>P. tenuifila</i>	1	13,69 \pm 0,21 b	3,91 \pm 0,25 a	Ausente	1,65 \pm 0,13 a	1,77 \pm 0,31 a	0,32 \pm 0,02 a	7,3;
	2	14,01\pm 0,13 a	3,92\pm 0,27 a	1,44\pm 0,01 a	Ausente	Ausente	Ausente	6,3; 7,1; 7,3; 9,4;
	3	2,19 \pm 0,05 c	0,72 \pm 0,05 b	0,47 \pm 0,03 b	Ausente	Ausente	Ausente	
	4	1,61 \pm 0,11 d	0,48 \pm 0,00 b	0,46 \pm 0,04 b	Ausente	Ausente	Ausente	
<i>P. setacea</i>	1	1,43\pm 0,05 e	0,23 \pm 0,00 c	Ausente	Ausente	0,12 \pm 0,00 b	Ausente	
	2	0,37 \pm 0,07 g	Tr	Ausente	Ausente	0,12 \pm 0,00 b	Ausente	
	3	0,96 \pm 0,04 f	Tr	Ausente	Ausente	0,11 \pm 0,01 b	Ausente	
	4	0,31 \pm 0,03 h	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

^zMédias de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS=massa seca. Rt=tempo de retenção.

Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* foram maiores nos frutos de *P. tenuifila* no estágio 1 (2,42 µg/g MS, e 2,22 µg/g MS, respectivamente), valores quase quatro vezes maiores do que os observados nos frutos no mesmo estágio de *P. setacea* (0,57 µg/g MS e 0,62 µg/g MS, respectivamente (Tabela 6). Verifica-se também que em ambas as espécies houve diminuição significativa das concentrações de clorofilas de acordo com o maior desenvolvimento dos frutos.

Tabela 6. Conteúdos de clorofilas *a* e *b* de polpas de frutos de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Espécie	Estádios	Clorofila <i>a</i> (µg/g MS)^z	Clorofila <i>b</i> (µg/g MS)^z
<i>P. tenuifila</i>	1	2,41±0,14 a	2,22 ±0,11 a
	2	1,55±0,07 b	1,18 ±0,07 b
	3	0,38±0,07 e	0,55±0,02 f
	4	0,36 ±0,02 f	0,66±0,02 d
<i>P. setacea</i>	1	0,57±0,04 c	0,62±0,42 e
	2	0,50±0,11 d	1,03±1,03 c
	3	0,22±0,04 g	0,21±0,07 g
	4	0,14 ±0,02 h	0,20 ±0,05 g

^zMédias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS=massa seca.

Comparando-se os resultados de DPPH apresentados na Tabela 4 com os resultados das demais análises verifica-se que, para *P. setacea* a maior porcentagem de inibição do DPPH, no estágio 4, coincidiu com os maiores níveis de fenólicos totais, flavonóides e vitamina C nos frutos, mas não coincidiu com a maior concentração de luteína e nem com as maiores concentrações de clorofilas. Para *P. tenuifila* as maiores porcentagens de inibição do DPPH nos estádios 3 e 4 não coincidiram com os picos de nenhum dos outros compostos analisados.

4.4. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE *P. tenuifila* E *P. setacea* EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Os resultados das análises de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante de extratos de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, em diferentes estádios de desenvolvimento, são apresentados na Tabela 7.

Verifica-se que a maior concentração de fenólicos totais foi detectada em sementes de *P. tenuifila* no estádio 4 (4403,0µg EAG/g MS), valor aproximadamente cinco vezes maior que o maior valor detectado em sementes de *P. setacea* (875,0µg EAG/g MS), também no estádio 4. Observa-se ainda que, no estádio 1 a concentração de fenólicos totais para *P. tenuifila* (564,63µg EAG/g MS) foi 6,5 vezes maior do que o de *P. setacea* (86,41µg EAG/g MS) e as concentrações aumentaram drasticamente nos estádios mais avançados de desenvolvimento das sementes, em *P. tenuifila* a partir dos estádios 4 e 5 e em *P. setacea* a partir do estádio 3. Exceto para o estádio 3, as sementes de *P. tenuifila* apresentaram, em todos os outros estádios de desenvolvimento, concentrações de fenólicos totais superiores aos estádios correspondes de sementes de *P. setacea*.

A maior concentração de flavonóides foi observada em sementes de *P. setacea* no estádio 4 (3,72 µg quercetina/g MS), sendo esse valor duas vezes maior que a maior concentração detectada em sementes de *P. tenuifila* no estádio 5 (1,84 µg quercetina/g MS). Observa-se, para ambas as espécies, que os conteúdos de flavonóides aumentaram drasticamente a partir do estádio 3 de desenvolvimento das sementes, cerca de cinco vezes, na passagem do estádio 2 para o estágio 3. As sementes de *P. setacea* em todos os estádios de desenvolvimento apresentaram concentrações de flavonóides superiores às sementes de *P. tenuifila*, nos estádios correspondentes.

As sementes de *P. setacea* no estádio 1 apresentaram a maior porcentagem de inibição de DPPH (86,11%), valor que não diferiu estatisticamente do detectado em sementes de *P. tenuifila* (85,44%), mas em sementes no estádio 5 de desenvolvimento. Em sementes de *P. tenuifila* verifica-se que a partir do estádio 2 de desenvolvimento as porcentagens de inibição de DPPH já alcançaram 82,55% e os valores tenderam a aumentar de acordo com os estádios mais avançados do desenvolvimento das sementes, enquanto que em sementes de *P. setacea* as porcentagens de inibição permaneceram ao redor de 80%, até o estádio 2 de desenvolvimento, diminuindo nos estádios mais avançados, 3, 4 e 5.

Tabela 7. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante de sementes de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Espécie	Estádios	Fenólicos totais ($\mu\text{g EAG/g MS}$)^z	Flavonóides ($\mu\text{g quercetina/g MS}$)^z	DPPH (% de inibição)^z
<i>P. tenuifila</i>	1	564,63 \pm 0,10 e	0,22 \pm 0,02 i	64,44 \pm 0,54 g
	2	693,39 \pm 0,13 de	0,24 \pm 0,05 i	82,55 \pm 0,42 c
	3	310,56 \pm 0,07 c	1,00 \pm 0,01 f	80,05 \pm 0,25 d
	4	4403,00 \pm 0,06 a	1,66 \pm 0,01 e	83,11 \pm 0,10 bc
	5	4054,90\pm0,11 b	1,84\pm 0,01 d	85,44\pm0,51 ab
<i>P. setacea</i>	1	86,41 \pm 0,00 f	0,43 \pm 0,13 h	86,11\pm 0,67 a
	2	137,93 \pm 0,01 f	0,59 \pm 0,02 g	80,11 \pm 0,82 d
	3	577,13 \pm 0,00 e	2,92 \pm 0,19 b	77,05 \pm 2,02 e
	4	875,00\pm0,02 d	3,72\pm 0,22 a	72,77 \pm 0,69 f
	5	667,54 \pm 0,01 de	2,59 \pm 0,04 c	76,81 \pm 0,67 e

^zMédias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). EAG=equivalente em ácido gálico. MS=massa seca.

Os resultados das análises de carotenóides por CLAE apresentados na Tabela 8 indicam que as maiores concentrações de luteína foram observadas nos estádios 3, 4 e 5 de sementes de *P. tenuifila*, sendo que os valores variaram de 2,35 $\mu\text{g/g MS}$, no estágio 3 a 2,90 $\mu\text{g/g MS}$, no estágio 5. Em *P. setacea* as maiores concentrações foram detectadas nos estádios 1, 2 e 3 e variaram entre 1,73 $\mu\text{g/g MS}$ e 1,94 $\mu\text{g/g MS}$. Verificase que em sementes de *P. tenuifila* as concentrações de luteína aumentaram com o estágio de desenvolvimento das sementes enquanto que em *P. setacea* ocorreu diminuição das concentrações nos estádios mais avançados. Nenhum outro tipo de carotenóides, além da luteína, foi encontrado em sementes de *P. setacea* independente do estágio de desenvolvimento, o mesmo ocorrendo com as sementes de *P. tenuifila*, exceto para o estágio 5 em que foi detectada a β -criptoxantina.

Tabela 8. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g MS}$) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de sementes de *Passiflora tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estádios de desenvolvimento.

Espécie	Estádios	Luteína ^z Rt (min)=3,8	Zeaxantina ^z Rt (min)= 4,2	β -criptoxantina ^z Rt (min)= 8,9	α -caroteno ^z Rt (min)=10,4	<i>trans</i> - β -caroteno ^z Rt (min)=11,9	Cis- β -caroteno ^z Rt (min)= 12,8
<i>P. tenuifila</i>	1	0,43 \pm 0,04 i	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	2	1,93 \pm 0,02 d	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	3	2,35 \pm 0,52 c	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	4	2,77 \pm 0,07 b	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	5	2,90\pm 0,25 a	Ausente	8,4 \pm 0,50 a	Ausente	Ausente	Ausente
<i>P. setacea</i>	1	1,94\pm 0,15 d	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	2	1,79 \pm 0,02 e	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	3	1,73 \pm 0,03 f	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	4	1,37 \pm 0,04 h	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	5	1,48 \pm 0,12 g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

^zMédias de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS=massa seca. Rt=tempo de retenção.

Comparando-se os resultados de DPPH apresentados na Tabela 7 com os resultados das demais análises verifica-se que, para *P. tenuifila* as maiores porcentagens de inibição de DPPH coincidiram com as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonóides e luteína de sementes nos estádios 4 e 5, enquanto que para *P. setacea* as maiores porcentagens de inibição do DPPH coincidiram apenas com as maiores concentrações de luteína na sementes nos estádios 1 e 2.

4.5. ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, CAROTENÓIDES, CLOROFILAS *a* E *b* E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CULTURAS DE CALOS DE *Passiflora tenuifila* E *Passiflora setacea* ORIGINADAS A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES

Os calos originados a partir do cultivo *in vitro* de sementes de frutos verdes em desenvolvimento e de segmentos de caules de microplantas de *P. tenuifila* podem ser observados na Figura 14.

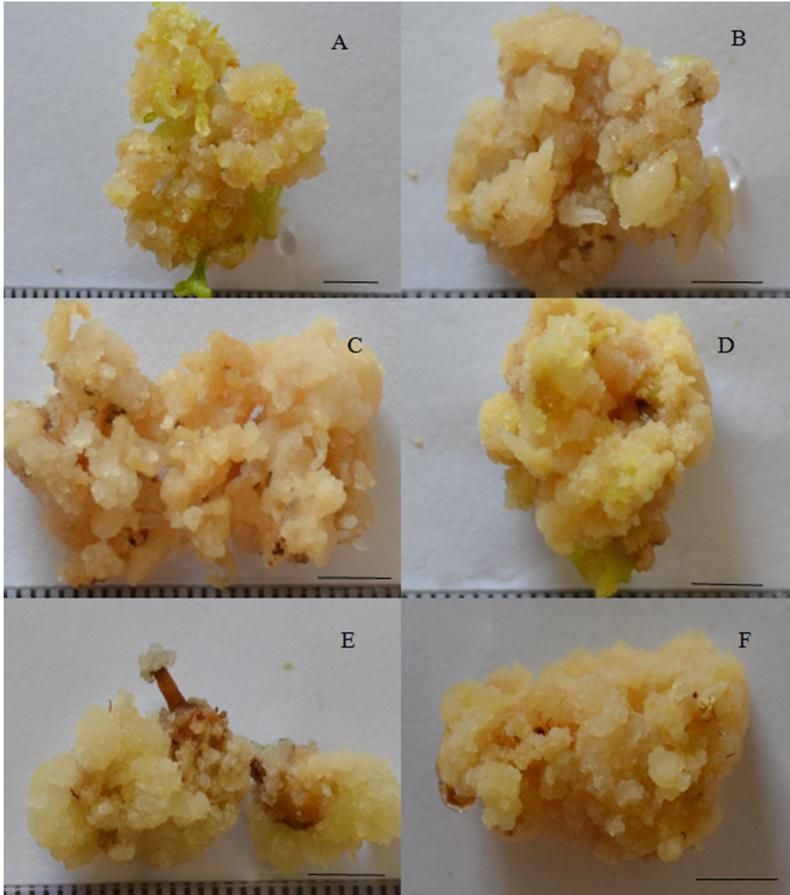


Figura 14. Calos originados a partir do cultivo de sementes de frutos verdes em desenvolvimento (A, B, C, D) e de segmentos de caules de microplantas (E, F) de *P. tenuifila* em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, após 80 e 90 dias, respectivamente. Barras=5 mm.

Os calos obtidos através do cultivo de diferentes explantes de *P. setacea* são mostrados na Figura 15.

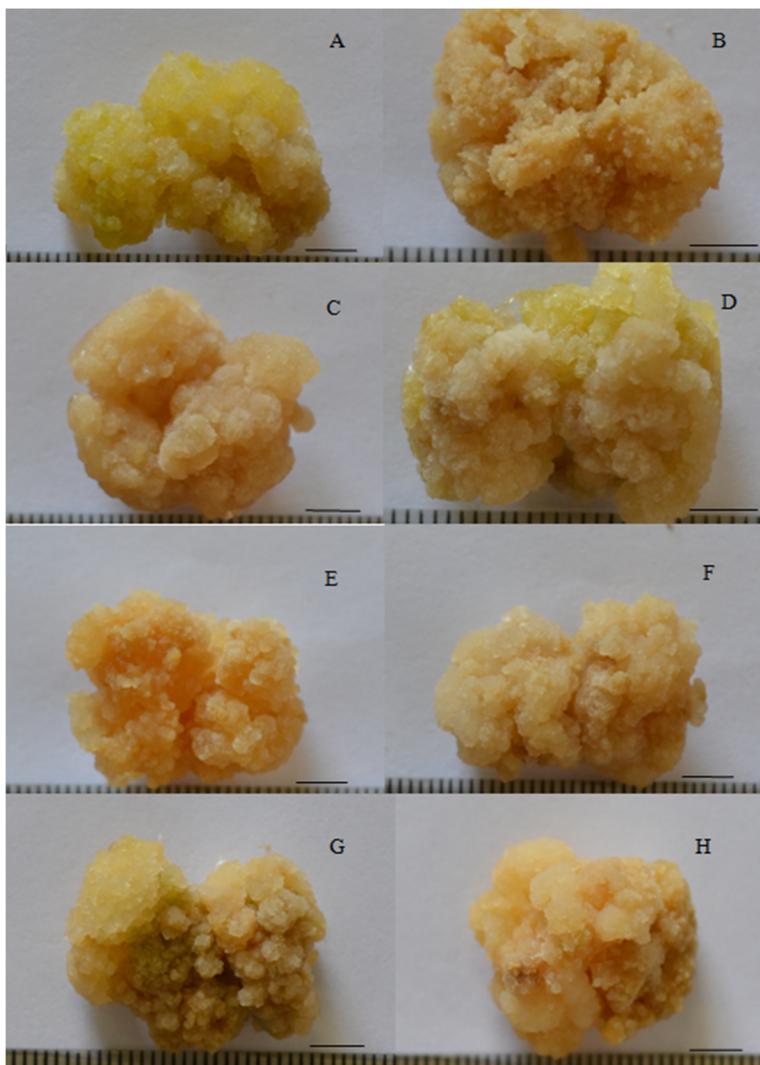


Figura 15. Calos originados a partir de segmentos de nó cotiledonar (A, B), hipocótilo (C, D), raiz (E, F), e cotilédone (G, H) de plântulas de *P. setacea* cultivados em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, após 60 dias. Barras=5 mm.

Na Tabela 9 são apresentados os conteúdos de fenólicos totais e flavonóides e atividade antioxidante de extratos de calos, com diferentes idades, de *P. setacea* e *P. tenuifila* originados a partir da cultura de diferentes tipos de explantes em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D ou 2,5 μ M de ANA (sementes de *P. tenuifila* em desenvolvimento em meio de cultura contendo frutose; segmentos de caules de microplantas de *P. tenuifila*). Os resultados indicam diferenças significativas entre as espécies, entre os tipos de explantes e entre as idades dos calos com relação aos teores de fenólicos totais e flavonóides de calos das diferentes espécies. Observa-se que os maiores conteúdos de fenólicos totais e de flavonóides (20,41 μ g EAG/g MS e 0,33 μ g quercetina/g MS, respectivamente) foram detectados em calos de 50 dias de *P. tenuifila* originados de sementes em desenvolvimento.

Entre os calos de *P. setacea* os maiores níveis de fenólicos totais e flavonóides (17,26 μ g EAG/g MS e 0,21 μ g quercetina/g MS) foram observados em calos de cotilédone de 45 dias e de flavonóides, em calos de cotilédone de 45 dias e de nó foliar de 65 dias (0,21 μ g quercetina/g MS e 0,22 μ g quercetina/g MS, respectivamente). Os menores níveis de fenólicos totais foram observados em calos de raiz de *P. setacea* de 45 e 65 dias e em calos de hipocótilo de 65 dias e os menores níveis de flavonóides foram detectados em calos de raiz de 45 e 65 dias, e de nó cotiledonar 65 dias.

Para *P. setacea* os níveis de fenólicos totais decresceram com a idade dos calos nos casos de cotilédone; permaneceram iguais nos calos de hipocótilo, raiz e nó cotiledonar e aumentaram no caso de nó foliar. Os flavonóides aumentaram com a idade dos calos apenas para nó foliar, diminuíram para hipocótilo, nó cotiledonar e permaneceram iguais para raiz e cotilédone.

Para *P. tenuifila* os níveis de fenólicos totais de calos de sementes em desenvolvimento diminuíram com a idade dos calos. Não houve diferença significativa quando as sementes foram cultivadas em frutose com ANA, nem para fenólicos totais e nem para flavonóides, porém, os resultados para fenólicos totais e flavonóides permaneceram elevados quando comparados com os resultados obtidos para *P. setacea*. Os calos de caule de *P. tenuifila* de 90 dias apresentaram níveis de fenólicos também elevados, similares aos níveis apresentados pelos cotilédones de 45 dias de *P. setacea*, mas os níveis de flavonóides foram reduzidos em relação aos calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila* e aos calos de cotilédone de 45 dias de *P. setacea*.

Os calos de 45 dias de nó foliar *P. setacea* apresentaram a maior porcentagem de inibição de DDPH (88,17%), valor que não diferiu significativamente do obtido para os calos de 50 dias de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila* (84,0%). Para *P. setacea* valores entre 75,11% e 77,66% de inibição de DPPH foram obtidos, respectivamente, para calos de nó foliar de 65 dias e calos de nó cotiledonar de 45 dias. Em calos de hipocótilo de 45 e de 65 dias as porcentagens de inibição decresceram, respectivamente, para 63,84% e 68,33%, não ultrapassando, nos demais tratamentos, 55,51%, obtido para os calos de raiz de 45 dias. Em calos de 80 dias de *P. tenuifila* de sementes de em desenvolvimento e em calos de segmentos de caule de 90 dias, as porcentagens de inibição de DPPH variaram entre 21,72% e 31,83%.

Tabela 9. Conteúdos de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 μ M de ANA.

Espécie	Tipo de explante	Idade dos calos (dias)	Fenólicos totais (μ g EAG/g MS) ^z	Flavonóides (μ g quercetina/g MS) ^z	DPPH (% de inibição) ^z	
<i>P. setacea</i>	Hipocótilo	45	10,11 \pm 0,01 gh	0,19 \pm 0,00 bc	63,84 \pm 1,74 c	
		65	8,53 \pm 0,02 hi	0,12 \pm 0,01 ef	68,33 \pm 1,89 c	
	Nó foliar	45	11,10 \pm 0,03 fg	0,17 \pm 0,02 cd	88,17\pm 0,50 a	
		65	14,51 \pm 0,03 c	0,22\pm 0,00 b	75,11 \pm 2,34 b	
	Raiz	45	8,47 \pm 0,02 i	0,05 \pm 0,03 g	55,51 \pm 2,00 d	
		65	7,56 \pm 0,03 i	0,03 \pm 0,06 g	23,61 \pm 1,35 f	
	Nó Cotiledonar	45	12,34 \pm 0,02 ef	0,11 \pm 0,00 f	77,66 \pm 0,90 b	
		65	12,80 \pm 0,03 de	0,05 \pm 0,01 g	22,55 \pm 2,08 f	
	Cotilédone	45	17,26\pm0,04 b	0,21 \pm 0,02 b	52,50 \pm 1,17 d	
		60	12,95 \pm 0,02 cde	0,17 \pm 0,05 cd	31,66 \pm 0,33 e	
	<i>P. tenuifila</i>	Sementes (sacarose)	50	20,41\pm 0,06 a	0,33\pm 0,00 a	84,00\pm 0,60 a
		Sementes (sacarose)	80	14,07 \pm 0,03 cd	0,17 \pm 0,05 cd	21,72 \pm 0,38 f
Sementes (frutose)		80	13,92 \pm 0,03 cde	0,15 \pm 0,04 de	31,83 \pm 0,88 e	
Caule		90	17,28 \pm 0,03 b	0,11 \pm 0,01 f	22,27 \pm 0,25 f	

^zMédias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). EAG=equivalente em ácido gálico. MS=massa seca

Os resultados apresentados na Tabela 10, sobre as análises de carotenóides dos calos por CLAE, indicam que os maiores conteúdos de luteína foram detectados em calos de nó foliar de *P. setacea* (2,73 $\mu\text{g/g}$ MS) de 65 dias, mais do que o dobro do nível máximo de luteína detectado em calos de sementes em desenvolvimento de 50 dias de idade (1,18 $\mu\text{g/g}$ MS). Verifica-se que as concentrações de luteína diminuíram com a idade dos calos, tanto para *P. setacea* como para *P. tenuifila*, exceto, para *P. setacea*, em calos de nó foliar, em que a concentração aumentou, em calos de cotilédone, em que permaneceu constante.

Calos de *P. setacea* de hipocótilo de 45 dias, de nó foliar de 45 dias e calos de *P. tenuifila* de sementes em desenvolvimento de 50 dias apresentaram níveis de luteína que variaram entre 1,18 $\mu\text{g/g}$ MS e 1,77 $\mu\text{g/g}$ MS. Os menores níveis de luteína (variando entre 0,12 e 0,28 $\mu\text{g/g}$ MS) foram observados em calos de 65 dias de raiz e de nó cotiledonar de *P. setacea* e em calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*, de 80 dias em sacarose.

A maior concentração de zeaxantina (1,08 $\mu\text{g/g}$ MS) foi detectada em calos de nó foliar de 65 dias de *P. setacea*, estando ausente, em *P. setacea*, em calos de raiz de 65 dias e em calos de 45 dias de nó cotiledonar e em calos de 45 dias de cotilédone e em *P. tenuifila* em todos os tipos de calos, exceto nos calos de sementes em desenvolvimento produzidos em meio de cultura contendo frutose. Não foram detectados β -criptoxantina, α -caroteno, trans- β -caroteno e cis- β -caroteno em nenhum dos tipos de calos analisados exceto traços de trans- β -caroteno e pequena concentração de cis- β -caroteno, em calos de hipocótilo de *P. setacea* de 45 dias de idade. Foram detectados carotenóides que não foram identificados em calos de *P. setacea* (calos de hipocótilo de 45 e de 65 dias de idade e em calos de nó foliar de 65 dias de idade) e em calos de *P. tenuifila* (calos de sementes em desenvolvimento de 50 dias de idade em sacarose).

Tabela 10. Conteúdos de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ MS) determinados por CLAE, em extratos em organossolvente (hexano: acetona: BHT), de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μM de 2,4-D.

Espécie	Tipo de explante	Idade dos calos (dias)	Luteína ^z Rt (min)=3,8	Zeaxantina ^z Rt (min)=4,2	β -criptoxantina ^z Rt (min)=8,9	α -caroteno ^z Rt (min)=10,4	<i>trans</i> - β – caroteno ^z Rt (min)=11,9	Cis- β -caroteno ^z Rt (min)= 12,8	Não identificado
<i>P. setacea</i>	Hipocótilo	45	1,77 \pm 0,09 b	0,77 \pm 0,02 c	Ausente	Ausente	Tr	0,12 \pm 0,00 a	5,5;5,8;
		65	0,94 \pm 0,00 e	0,25 \pm 0,07 d	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5,5;5,8
	Nó foliar	45	1,54 \pm 0,04 c	0,94 \pm 0,03 b	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
		65	2,23\pm0,17 a	1,08 \pm 0,05 a	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5,6; 5,9;
	Raiz	45	0,50 \pm 0,02 ghi	0,17 \pm 0,03 de	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
		65	0,12 \pm 0,00 m	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
	Nó cotiledonar	45	0,35 \pm 0,03 ijl	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
		65	0,28 \pm 0,02 jlm	0,06 \pm 0,07 f	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
	Cotilédone	45	0,69 \pm 0,03 f	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
		60	0,66 \pm 0,01 fg	0,25 \pm 0,01 de	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
<i>P. tenuifila</i>	Sementes sac	50	1,18\pm0,08 d	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5,1; 5,4; 5,8; 6,3
	Sementes sac	80	0,22 \pm 0,02 lm	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
	Sementes fru	80	0,53 \pm 0,01 fgh	0,15 \pm 0,16 ef	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	
	Caule	90	0,44 \pm 0,05 hij	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	

^zMédias de três injeções (10 μL) \pm desvio padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS=massa seca. Rt= tempo de retenção.

Os conteúdos de clorofilas *a* e *b* foram maiores nos calos de 50 dias de idade de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila* (0,26 µg/g MS, e 0,29 µg/g MS, respectivamente) (Tabela 11). As maiores concentrações de clorofilas *a* e *b* observadas em *P. setacea* ocorreram em calos de hipocótilo de 65 dias (0,16 µg/g MS e 0,24µg/g MS, respectivamente) e em calos de raiz de 45 dias (0,16µg/g MS e 0,21µg/g MS, respectivamente). Verifica-se também que em ambas as espécies houve diminuição significativa das concentrações de clorofila *a* de acordo com a maior idade dos calos, exceto em *P. setacea*, em calos de hipocótilo e nó cotiledonar, em que os níveis aumentaram e em calos de cotilédone, em que as concentrações não variaram. Quanto à clorofila *b* observa-se que as concentrações aumentaram, em *P. setacea*, em calos de hipocótilo, nó foliar e nó cotiledonar, e diminuíram em calos de raiz e cotilédone e em calos de sementes em desenvolvimento de 80 dias de *P. tenuifila*, em sacarose.

Tabela 11. Conteúdos de clorofilas *a* e *b* de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* iniciados a partir de diferentes tipos de explantes cultivados na luz, em meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D. Em um dos tratamentos com sementes o meio de cultura MS semi-sólido foi suplementado com 88,5 mM de frutose e 2,5 μ M de ANA.

Espécie	Tipo de explante	Idade dos calos (dias)	Clorofila <i>a</i> (μ g/g MS) ^z	Clorofila <i>b</i> (μ g/g MS) ^z
<i>P. setacea</i>	Hipocótilo	45	0,06±0,01 ef	0,11±0,00 d
		65	0,16±0,18 b	0,24±0,08 b
	Nó foliar	45	0,10±0,01 c	0,05±0,00 f
		65	0,07±0,04 def	0,10 ±0,01 d
	Raiz	45	0,16±0,03 b	0,21 ±0,01 c
		65	0,01 ±0,01 h	0,01±0,02 h
	Nó Cotiledonar	45	0,06±0,01 ef	0,03±0,01 g
		65	0,08±0,02 d	0,10±0,03 d
	Cotilédone	45	0,03 ±0,08 g	0,08 ±0,02 e
		60	0,03 ±0,01 g	0,03 ±0,01 gh
<i>P. tenuifila</i>	Sementes (sacarose)	50	0,26±0,01 a	0,29±0,05 a
	Sementes (sacarose)	80	0,05 ±0,04 f	0,07±0,03 e
	Sementes (frutose)	80	0,01±0,06 h	0,02±0,02 gh
	Caule	90	0,07±0,02 de	0,10±0,03 d

^zMédias de cinco repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). MS=massa seca.

Comparando-se os resultados de DPPH apresentados na Tabela 9 com os resultados das demais análises verifica-se que, para *P. tenuifila* a maior porcentagem de inibição de DPPH (84%), observada para calos de 50 dias de sementes em desenvolvimento, coincidiu com as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonóides, luteína e de clorofilas a e b, enquanto que para *P. setacea* a maior porcentagem de inibição do DPPH (88,17%), obtida para calos de nó foliar de 45 dias não coincidiu com as maiores concentrações de fenólicos totais, flavonóides, carotenóides e clorofilas, mas estes calos apresentaram níveis altos de fenólicos totais, flavonóides e luteína em relação aos demais tipos de calos de *P. setacea*. Calos de cotilédone de *P. setacea* apresentaram níveis altos de fenólicos totais e flavonóides, mas baixo nível de luteína, sendo a porcentagem de inibição do DPPH de 52,50%.

5. DISCUSSÃO

5.1. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES, VITAMINA C (FRUTOS) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM FRUTOS DE *P. setacea* E *P. tenuifila*

As variações observadas nos níveis de fenólicos totais e flavonóides de frutos e sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila*, em diferentes estádios de desenvolvimento e o fato de ter havido maior acúmulo de fenólicos totais, em frutos e sementes de *P. tenuifila* e de flavonóides, em sementes de *P. setacea*, alcançando valores superiores aos dos frutos, indicaram que a regulação da via de biossíntese de fenólicos e de flavonóides variou com os estádios de desenvolvimento e com as espécies estudadas. Apenas estudos adicionais, sobre as análises de expressão gênica e das atividades das enzimas envolvidas na via de biossíntese de fenólicos/flavonóides em frutos e sementes, nos diferentes estádios de desenvolvimento e nos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, originados a partir de diferentes tipos de explantes, permitirão explicar as bases moleculares das variações observadas, e discutidas a seguir, nos níveis desses compostos e dos mecanismos de regulação envolvidos na biossíntese dos mesmos.

5.1.1. Fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante em frutos

Os níveis máximos de fenólicos totais e flavonóides encontrados em polpas de *P. tenuifila* (146,06 µg EAG/g MS; 0,29 µg quercetina/g MS) em *P. setacea* (133,47 µg EAG/g MS; 0,30 µg quercetina/g MS) (Tabela 4) foram inferiores aos encontrados por Silva *et al.* (2014). Esses autores, estudando as polpas de frutos maduros de *P. edulis*, determinaram os fenólicos totais, através do método de Folin-Ciocalteu, encontrando valores de 765,09 mg de EAG/100g e teor de flavonóides de 60,32 mg/100g, porém, para flavonóides a metodologia utilizada foi diferente da utilizada no presente trabalho, para *P. setacea* e *P. tenuifila*. Contreras-Calderón *et al.* (2011), na investigação sobre as espécies Colombianas de Passiflora determinou os fenólicos de polpas com sementes de *P. tarminiana*, encontrando valores também superiores de 1018 mg de EAG/100g e em *P. mollissima* 635,00 mg de EAG/100g. Madoglio (2011) analisou o extrato bruto hidroalcoólico de *P. alata* pelo método de Folin-Ciocalteu para fenólicos totais em folhas, polpa, semente e pericarpo, encontrando maiores teores nas sementes, seguido por folha, pericarpo e polpa. A fração n-BuOH das sementes de *P. alata*

apresentou 3,93 g EAG/ 100 g de extrato, enquanto nas folhas o teor foi de 1,20 g EAG/100 g de extrato. Em frutos de outras espécies os teores variaram bastante, em açaí maduro foram encontrados valores de 343,7 mg EAG/100g (CRUZ, 2008), em amora preta 1938,70 mg EAG/100g (JAQUES, 2009).

Vários são os estudos que demonstram a relação entre os conteúdos de fenólicos totais, flavonóides, clorofilas e atividade antioxidante durante o amadurecimento dos frutos, mas em todos eles os níveis de fenólicos totais decresceram durante o amadurecimento, resultado contrário aos padrões de variação observados em *P. setacea* e *P. tenuifila*. A ausência de marcadores moleculares do desenvolvimento e maturação dos frutos, para cada espécie de planta, dificulta a comparação, com mais precisão, dos eventos fisiológicos que ocorrem desde a fertilização até a maturação dos frutos, entre as espécies de plantas. Por exemplo, em frutos de *Momordica cochinchinensis*, Kubola & Siriamonpun (2011) observaram que os conteúdos de fenólicos totais e flavonóides na casca e polpa decresceram durante o desenvolvimento dos frutos, de imaturo para maduro, que apresentaram a mais baixa capacidade antioxidante, padrão contrário ao apresentado pelos frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* para os fenólicos totais que aumentaram nos estádios mais avançados do desenvolvimento dos frutos e para os flavonóides, cujos níveis permaneceram iguais entre o estágio 1 e estágio 4 de desenvolvimento dos frutos, para ambas as espécies. Observaram, entretanto, que nas sementes a atividade antioxidante aumentou do estágio imaturo para o maduro, padrão semelhante ao apresentado por sementes de *P. tenuifila*, mas contrário ao apresentado por sementes de *P. setacea*, em que tal atividade decresceu com os estádios mais avançados de desenvolvimento das sementes.

Fernandez-Orozco *et al.* (2011) observaram que, durante o desenvolvimento e fases de amadurecimento dos frutos de *Olea europaea*, as mais altas atividades antioxidantes ocorreram durante as primeiras semanas de crescimento dos frutos, coincidindo com as altas concentrações de pigmentos nos cloroplastos e fenólicos totais. Esses resultados foram diferentes dos obtidos nesse trabalho para as espécies de Passifloras estudadas uma vez que em frutos de *P. setacea* houve correlação positiva entre os estádios de desenvolvimento dos frutos, a maior atividade antioxidante e os maiores níveis de fenólicos totais e vitamina C e correlação negativa com os níveis de clorofila, que diminuíram com o amadurecimento, enquanto que em frutos de *P. tenuifila* também houve correlação positiva da atividade antioxidante

apenas com os fenólicos totais, que aumentaram com o maior desenvolvimento dos frutos e negativa com vitamina C e clorofilas.

Em vários outros estudos foi constatada a diminuição de fenólicos totais e atividade antioxidante dos frutos, com o amadurecimento, sendo sempre comprovada a correlação positiva entre níveis de fenólicos e atividade antioxidante, como demonstrado por Jan *et al.* (2013) em frutos de *Monothecha buxifolia* e por Gruz *et al.* (2011) analisando frutos de *Mespilus germanica* L. em diferentes estádios de amadurecimento. O mesmo foi observado em frutos de *Capsicum annuum* em que Ghasemnezhad *et al.* (2011) também demonstraram que além dos fenólicos totais, a concentração de outros compostos antioxidantes como o ácido ascórbico também decresceu com o amadurecimento dos frutos, assim como a atividade antioxidante dos mesmos. Em maçã, que é um fruto rico em fenólicos os estudos conduzidos por Awad *et al.* (2001) durante o processo de amadurecimento, indicaram que a concentração de glicosídeos de quercetina, floridizina e ácido clorogênico foram altas nos frutos no início do desenvolvimento, assim como observado nos frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, mas decresceram durante o desenvolvimento e maturação e permanecendo em níveis estáveis, assim como as catequinas.

Com relação ao padrão de variação nos níveis de flavonóides (que incluem os flavonóis, flavonas e antocianinas) de acordo com os estádios de desenvolvimento dos frutos, o acúmulo de flavonóides observado nos frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, no início e no estágio mais avançado de desenvolvimento também foi observado em outras espécies. Vvedenskaia & Vorsa (2004) quantificaram as proantocianidinas, flavonóis e antocianinas durante o crescimento e amadurecimento de frutos de *Vaccinium macrocarpon* e os resultados indicaram que as concentrações de proantocianidinas e flavonóis totais foram altos nos ovários das flores e nos frutos, nos primeiros estádios de desenvolvimento. As proantocianidinas diminuíram rapidamente durante o desenvolvimento e crescimento do ovário e depois aumentaram levemente durante o amadurecimento e os níveis de flavonóis exibiram uma queda, menos pronunciada nas flores e primeiros estádios do estabelecimento dos frutos e também aumentaram levemente com o amadurecimento dos frutos, perfil parecido com o apresentado pelos frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Estudos mais aprofundados sobre a chalcona sintase (CHS) e chalcona isomerase (CHI), que são as duas enzimas chaves envolvidas na biossíntese de flavonóides e cujos genes foram clonados em *Citrus unshiu* Marcow, foram realizados por Wang *et al.* (2010). Esses autores analisaram a expressão relativa dos genes e o correspondente acúmulo de

flavonóides, durante a maturação do fruto, através PCR em tempo real e HPLC. Os resultados indicaram que, durante maturação, as expressões dos genes CHS e CHI diminuíram gradualmente na casca, assim como as concentrações de flavonóides totais; nas polpas, entretanto, as concentrações de flavonóides totais foram mais baixas, mas sem alterações significativas, durante os estádios de desenvolvimento dos frutos de *Citrus*. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos para frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, em que, apesar de não terem sido detectadas diferenças nas concentrações desses compostos entre os estádios iniciais e mais avançados do desenvolvimento dos frutos (maiores níveis encontrados), os valores dos níveis de flavonóides estiveram muito próximos, variando muito pouco entre os diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos. Wang *et al.* (2010), além de confirmarem a correlação positiva entre a expressão dos genes CHS e CHI e o acúmulo de flavonóides em frutos de *Citrus* sugeriram que a super expressão desses genes poderia ser uma abordagem potencial para induzir a produção de flavonóides em larga escala, abordagem essa que poderia também ser aplicada em *P. tenuifila* e *P. setacea*, para otimizar a biossíntese de flavonóides em frutos, uma vez identificados e clonados os genes relacionados com à biossíntese de flavonóides em frutos dessas espécies.

5.1.2. Ácido ascórbico e atividade antioxidante em frutos

A relação entre os níveis de ácido ascórbico, atividade antioxidante e amadurecimento de frutos tem sido estudada e varia entre as espécies de plantas. Pruthi (1963) analisando três estádios de maturação de *Passiflora edulis*, constatou que houve, com o amadurecimento, uma redução no teor de ácido ascórbico da casca (111,6- 88,6 mg/100 g), enquanto que na polpa houve uma variação de 15,3 mg/100g, no estádio verde, para 33,5 mg/100g no estádio maduro. Para a espécie *P. tenuifila* o fruto foi processado inteiro, enquanto que em *P. setacea*, somente a polpa, o que pode explicar a diferença nos perfis de teores de ácido ascórbico (máximos níveis em frutos imaturos de *P. tenuifila* e em frutos mais desenvolvidos de *P. setacea*). Entretanto, Butt (1980) mostra que o decréscimo de vitamina C nas amostras pode ter sido devido à atividade da enzima ascorbato oxidase, que foi maior em frutos maduros.

De acordo com Franco (1999) os frutos são classificados quanto aos teores de vitamina C em: fontes elevadas (100 a 300 mg/100g), fontes médias (50- 100mg /100g), fontes baixas (25 a 50 mg/100g) e fontes muito baixas (menores que 25 mg/100g). Segundo essa classificação, os

frutos de *P. setacea* são considerados fontes muito baixas de vitamina C e *P. tenuifila* fontes baixas.

A biossíntese de vitamina C pode variar em frutos de diferentes espécies. Assis *et al.* (2008) e Ferreira *et al.* (2009) analisando ácido ascórbico em acerola, em diferentes estádios de maturação, observaram uma maior concentração em frutos verdes e uma diminuição com o amadurecimento dos frutos. Yahia *et al.* (2001) também demonstraram, em frutos de *Lycopersicum esculentum* Mill e *Capsicum annuum*, cv. New o decréscimo no nível de ácido ascórbico nos frutos, coincidindo com o início do amadurecimento e com o aumento de atividade da ascorbato oxidase. Mais recentemente, os estudos envolvendo as análises proteômicas e transcriptômicas dos genes envolvidos no metabolismo do ácido ascórbico (biossíntese, reciclagem e degradação) têm aprofundado o conhecimento sobre o controle e regulação dos níveis de vitamina C nos frutos. Em frutos de *Vaccinium myrtilus* L., que apresentaram alta capacidade antioxidante devido à presença de antocianinas e ácido ascórbico Cocetta *et al.* (2012) estudaram o acúmulo de ácido ascórbico, a expressão dos genes que codificam para as enzimas da via de biossíntese e as atividades das enzimas envolvidas na oxidação e reciclagem do ácido ascórbico, durante o desenvolvimento e amadurecimento dos frutos. Concluíram que os níveis de expressão dos genes, que codificam as enzimas chaves da rota de biossíntese foram consistentes com os níveis de ácido ascórbico produzido, especialmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos, sendo que as atividades das enzimas envolvidas na oxidação e reciclagem do ácido ascórbico dependeram do estágio de desenvolvimento dos frutos. Nesse caso, os resultados indicaram que o nível de ácido ascórbico permaneceu relativamente estável durante a maturação do fruto.

Os estudos realizados por Araguez *et al.* (2013) em morangos, através das análises dos aquênios em desenvolvimento, de imaturo para maduro também demonstraram que o maior nível das enzimas encontradas nos aquênios imaturos coincidiu com o maior conteúdo de L-ascorbato e com os maiores níveis de expressão dos genes que codificam para as enzimas da via biossintética do ácido L-ascórbico. Esses resultados foram coerentes com o acúmulo de vitamina C observado em frutos imaturos de *P. tenuifila*, mas contrários aos resultados obtidos para frutos de *P. setacea*, que apresentaram maior acúmulo de vitamina C nos frutos mais desenvolvidos. Em frutos de *Capsicum annuum* L estudos complementares sobre a regulação da biossíntese de ácido ascórbico desenvolvidos por Alós *et al.* (2013), através da análise transcricional dos genes envolvidos na biossíntese, reciclagem e degradação do ácido

ascórbico indicaram uma correlação inversa entre a expressão dos genes de biossíntese e as concentrações de ácido ascórbico indicando a existência de mecanismos reguladores por retroalimentação e as análises dos níveis de mRNA da ascorbato oxidase, envolvida na degradação do ácido ascórbico. Esses autores sugeriram que esta enzima desempenha papel crítico na regulação do “pool” de ácido ascórbico durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto.

Alguns exemplos da literatura, por outro lado, apontam para o aumento dos níveis de ácido ascórbico durante o desenvolvimento e amadurecimento do fruto como observado em *P. setacea*. Os estudos conduzidos por Cruz-Rus *et al.* (2010) indicaram que em frutos de uva o ácido ascórbico é importante precursor do ácido tartárico e confirmaram que concentração de ácido ascórbico aumentou, durante o desenvolvimento do fruto alcançando o máximo no estágio completamente maduro. Os estudos realizados por Fawole *et al.* (2013) com frutos de *Punica granatum* L. indicaram aumento nos níveis de açúcar, ácido ascórbico e antocianinas totais durante a maturação e decréscimo significativo em ácidos orgânicos, fenólicos totais e atividade antioxidante durante a maturação do fruto, sugerindo um decréscimo na atividade antioxidante do suco, o contrário do resultado observado para frutos de *P. setacea*. Segundo esses autores a informação gerada poderia ajudar os produtores de sucos no monitoramento e otimização da qualidade dos sucos e o valor antioxidante, através das fases de maturação.

As diferenças observadas nos padrões de acúmulo de vitamina C em frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* indicaram a existência de possíveis mecanismos de regulação diferentes, que poderiam ser confirmados a partir de análises subsequentes da atividade enzimática e da expressão dos genes que codificam para as enzimas de síntese e degradação do ácido L-ascórbico. Em *P. tenuifila* pareceu haver drástica degradação da vitamina C a partir do estágio 2 de desenvolvimento do fruto enquanto que em *P. setacea* a biossíntese de vitamina C foi ativada progressivamente, paralelamente ao maior desenvolvimento do fruto (Tabela 4).

5.2. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE *P. setacea* E *P. tenuifila*

Os níveis de fenólicos totais e flavonóides detectados em sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* (Tabela 7) aumentaram de acordo com os estádios mais avançados do desenvolvimento sendo que sementes de

P. tenuifila apresentaram os maiores níveis de fenólicos (4403,00 µg EAG/g MS) e sementes de *P. setacea* os maiores níveis de flavonóides (3,72 µg quercetina/g MS). As quantidades desses compostos são consideradas altas, ao compararmos com outras partes da planta. Silva *et al.* (2014) em uma metodologia baseada em Francis (1982) estudando *Passiflora edulis* encontraram valores de flavonóides totais em sementes de 43,08 mg/100g e nas análises de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, determinaram 461,06 mg de EAG/100g. Jorge *et al.* (2009) determinaram os fenólicos em extrato etanólico de sementes através do reagente de Folin-Ciocalteu com teor de 42,93 mg/g em equivalentes de ácido gálico.

O processo de biossíntese dos fenólicos e flavonóides foi maior nas sementes comparativamente com as polpas. Há controvérsias sobre como os fenólicos agem nas sementes, no tocante à germinação, Lodhi (1982), testou uma mistura equimolar de ácidos fenólicos e observou a supressão de germinação em *Kochia scoparia*, assim como Tokuhisa *et al.* (2006) com sementes de mamão, já Einhellig (1982) demonstrou que os compostos fenólicos tem efeito sobre a germinação de sementes, alongamento de radícula e crescimento de plântulas. Alguns tegumentos de sementes são impermeáveis ao oxigênio, e de acordo com Edwards (1973), a entrada desse gás é controlada pela presença de compostos fenólicos na casca.

A partir da polinização, as transformações das paredes do ovário em fruto e dos óvulos fecundados em sementes fazem com que esses órgãos passem a funcionar como importantes fontes de consumo dos fotossintatos produzidos pelas plantas. Dessa forma o aumento dos níveis nos fenólicos totais e flavonóides nos frutos e sementes poderiam ser explicados como resultado da maior canalização de carboidratos, que são os precursores (glucose) da via do ácido chiquímico. Ecologicamente, a maior concentração desses compostos nos frutos e sementes mais desenvolvidos poderia ser explicada pela necessidade de defesa em relação aos vários tipos de microrganismos, principalmente, que se acumulam em grande quantidade nos frutos quando entram na fase de amadurecimento e entram em contato com o solo, a partir do momento da abscisão. As sementes, por sua vez, deverão garantir a sobrevivência das futuras gerações de plantas, devendo acumular, durante o desenvolvimento, quantidades consideráveis de compostos de reserva e de defesa, contra o ataque por microrganismos e animais, com a finalidade de o estabelecimento e sobrevivências das plântulas. Assim, o maior acúmulo de compostos fenólicos na semente estaria sendo favorecido pelo maior aporte de carboidratos, que são os precursores da

biossíntese de compostos fenólicos e flavonóides. Pajak *et al.* (2014) estudaram os níveis de ácidos fenólicos e flavonóides e atividade antioxidante em sementes de feijão, rabanete, brócoli e girassol e constataram que a germinação promoveu o aumento dos níveis de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante das sementes, sendo que as plântulas jovens de girassol e rabanetes foram as mais ricas em compostos fenólicos, mas as quantidades de flavonóides livres e ligados foram baixas, confirmando a intensificação da produção de compostos fenólicos e dos flavonóides durante a germinação das sementes, certamente visando a defesa eficiente das plântulas.

As análises dos tipos de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante das sementes são muito importantes, pois podem gerar conhecimentos mais precisos para viabilizar o aproveitamento durante o processamento dos frutos, no enriquecimento funcional dos alimentos. A correlação positiva entre os níveis de fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante das sementes observadas em *P. tenuifila* e em *P. setacea* (exceção para atividade antioxidante) tem sido descrita para várias espécies. Cho *et al.* (2013) investigaram a composição de fenólicos solúveis (isoflavonas e antocianinas), proteína, óleo, ácidos graxos e atividade antioxidante em sementes de soja com diferentes colorações (amarelo, preto, marrom e verde) e que a atividade antioxidante dependeu dos conteúdos de isoflavonas e antocianinas. A relação entre a coloração das sementes, mas, relacionada com o estágio de desenvolvimento e acúmulo de fenólicos totais e flavonóides também foi observada nas sementes de *P. tenuifila*, em que houve alteração na coloração durante o processo de desenvolvimento, com as sementes passando da coloração esverdeada clara para bege claro, marrom mais escuro, preta, mas, o maior acúmulo de flavonóides e fenólicos totais ocorreram nas sementes de coloração mais escura, assim como a maior atividade antioxidante. Esse também foi o perfil observado para sementes de *P. setacea*, embora a maior atividade antioxidante tenha sido observada nas sementes no primeiro estágio de desenvolvimento.

Resultados semelhantes, que confirmaram a correlação positiva entre níveis de fenólicos e atividade antioxidante também foram obtidos por Chougui *et al.* (2013), em sementes de *Opuntia ficus – indica* ; por Lee *et al.* (2013), em diferentes cultivares de *Perilla frutescens* ; por Fazio *et al.* (2013) em sementes de *Rubus*.

As análises dos tipos de fenólicos presentes nas sementes têm demonstrado que variam de acordo com a espécie estudada. Amakura *et al.* (2013) identificaram oito tipos de compostos fenólicos em sementes de *Helianthus annuus* , entre eles o ácido caféico e observaram que as

frações que continha esse ácido apresentaram a maior capacidade antioxidante. Em resíduos de sementes de *Punica granatum* L, He *et al.* (2011) concluíram que os principais fenólicos identificados e com maior atividade antioxidante foram os flavonóis, ácidos fenólicos, flavonóides glicosídeos e hidrolizados de tanino. Montealegre *et al.* (2006) estudando os compostos fenólicos em sementes de dez variedades de *Vitis vinifera* concluíram que os flavan-3-ols foram os maiores constituintes das sementes. Em sementes de uva Rockenbach *et al.* (2011) também demonstraram a presença de grandes quantidades de compostos fenólicos e atividade antioxidante, maiores do que na casca e em sementes imaturas de dez variedades de *Vicia faba*. Baginsky *et al.* (2013) afirmam que os conteúdos variaram de 817 a 1337 mg EAG/Kg e os níveis de flavonóis e flavonas foi de 252 mg quercetina/kg. Em sementes de *P. tenuifila* o nível de fenólicos totais foi de 4400 mg EAG/kg e em sementes de *P. setacea*, de 875 mg EAG/kg e os níveis de flavonóides, apesar de muito menores do que os detectados em sementes imaturas de *Vicia faba* foram de 1,84 mg quercetina/kg, para *P. tenuifila* e para *P. setacea* de 3,72 mg quercetina/kg não interferiram nos altos valores de atividade antioxidante das sementes (entre 85,44% e 72,77%).

Moulehi *et al.* (2012) analisaram os tipos de compostos fenólicos e atividade antioxidante existentes nas sementes de duas espécies de *Citrus* em três estádios de desenvolvimento: imaturo (verde), semi-maturo (amarelo) e maduro para a comercialização (laranja). Observaram variações significativas nos polifenóis totais, flavonóides, taninos e atividade antioxidante entre as sementes das diferentes espécies, durante o amadurecimento, indicando que o potencial antioxidante variou consideravelmente com a espécie e com o estágio de maturação. Os resultados indicaram que também as sementes de *Citrus* podem ser utilizadas nas indústrias e nas aplicações em estudos farmacológicos como antioxidantes. As mudanças significativas na composição de fenólicos durante o amadurecimento sugeriram que as sementes no estágio maduro de *Citrus reticulata* Blanco seriam fontes promissoras de ácido gálico, enquanto que as sementes de *Citrus aurantium* poderiam ser usadas como potencial fonte de neohesperidina, no estágio imaturo e naringina, no estágio maduro. A maior atividade antioxidante das sementes de *Citrus aurantium* ocorreu com o amadurecimento dos frutos, estando correlacionada com os maiores níveis de polifenóis e flavonóides, mas em sementes de *Citrus reticulata* Blanco ocorreu no estágio semi-maturo e pareceu estar relacionada com o nível de hesperidina. Os autores ressaltaram o fato que, de um modo geral é relatada na literatura a correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos e atividade

antioxidante, mas em estudos mais recentes têm sido demonstrado que a atividade antioxidante dos extratos está muito mais relacionada com a composição de fenólicos e depende fortemente da estrutura desses compostos. Essa constatação poderia explicar a razão da maior atividade antioxidante das sementes de *P. setacea* no estágio de desenvolvimento em que apresentou os menores níveis de compostos fenólicos e de flavonóides.

Nas sementes, a maior inibição do radical DPPH ocorreu em *P. tenuifila* no estágio 4 e no estágio 1 de desenvolvimento de *P. setacea*. Jorge *et al.* (2009) avaliou a capacidade antioxidante em sementes de *P. edulis* veiculadas em óleo de soja em duas concentrações (500 mg.kg⁻¹, e 1000 mg.kg⁻¹) as quais inibiram 41,1% e 37,7%, respectivamente o DPPH. Nesse trabalho, as sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* apresentaram maior percentual de inibição desse radical, representando o dobro do encontrado em *P. edulis*. Em *P. tenuifila* os estágios de desenvolvimento da semente com maiores percentuais de inibição de DPPH coincidiram com os teores mais altos de fenólicos e flavonóides. Esses resultados sugerem que os compostos com atividade antioxidante presentes nessa espécie apresentam mecanismos de ação diferenciados. A quantidade de fenólicos necessária para exercer atividade biológica ainda precisa ser mais bem estabelecida, através de estudos sobre o mecanismo de ação antioxidante desses compostos no organismo, porém autores estimam que o efeito antioxidante é alcançado com de cerca de 1 g/dia (MANACH *et al.*, 2004).

5.3. PERFIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CALOS DE *P. setacea* E *P. tenuifila*

Os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* também armazenaram compostos fenólicos e flavonóides, demonstrando que os fatores necessários para garantir as atividades das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e tirosina amônio liase (TAL) estiveram presentes nos diferentes tipos de explantes em interação com as condições de cultura utilizadas.

Os níveis de compostos fenólicos totais obtidos para os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram bem menores do que os de frutos e sementes (Tabela 9), mas, em compensação os níveis de flavonóides foram, em alguns tipos de calos (calos de nó foliar de 65 dias e calos de cotilédone de 45 dias de *P. setacea*; calos de 50 dias de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*), aproximadamente iguais ou até maiores

do que os níveis de flavonóides observados nos frutos, com as vantagens de que a produção de biomassa de calos *in vitro* foi muito eficiente e mais rápida do que os processos de floração e frutificação das plantas no campo. Além disso, em condições controladas é possível otimizar ainda mais a produção da biomassa dos calos através das manipulações das fontes de carbono e de outros componentes do meio de cultura, como será discutido abaixo.

É importante observar que o mesmo perfil eficiente de acúmulo de flavonóides nas sementes de ambas as espécies, mais do que nos frutos, foi também observado nos calos de 50 dias de idade originados a partir das sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*, com concentração maior do que as observadas em frutos da mesma espécie, sendo a melhor fonte de compostos fenólicos e flavonóides, entre os todos os tipos de calos estudados. Esses resultados apontam para a importância da fonte dos explantes utilizados para iniciar os sistemas de cultura de calos, na determinação do potencial para a produção de bioativos. Em *P. setacea*, o maior acúmulo de flavonóides nos calos originados de cotilédones e de nó foliar poderia ser explicado pelo fato de que, nas plantas, as folhas são um dos principais locais de biossíntese de flavonóides e os cotilédones de *P. setacea*, na verdade se transformam em folhas cotiledonares, nas plântulas, se diferenciando das folhas normais apenas pela morfologia, mas apresentando clorofilas e atividade fotossintética. Essa consideração poderia, também, ser utilizada para explicar os níveis altos de fenólicos totais e flavonóides também nos calos originados a partir de nó foliar de 65 dias de idade (o nó foliar abriga as gemas axilares que darão origem às futuras folhas da planta).

Outro aspecto importante observado em *P. tenuifila* foi que a razão entre as concentrações máximas de flavonóides/concentrações máximas de fenólicos totais (reflete a quantidade de flavonóides produzidos para cada micrograma de fenólicos totais produzidos) foi de 0,0018, em frutos mais desenvolvidos (mas, 0,0030 nos frutos no estágio 1), decrescendo para 0,00045, nas sementes, mas aumentou para 0,016 nos calos, indicando que, apesar dos calos apresentarem valores inferiores de concentrações de fenólicos, pareceu haver maior eficiência da via de biossíntese de flavonóides em relação aos fenólicos totais do que em frutos e sementes. Em *P. setacea* esses valores foram de 0,0022, para frutos mais desenvolvidos (mas, 0,0033 nos frutos no estágio 1, valor similar ao observado em *P. tenuifila*), de 0,0043 em sementes (valor aproximadamente 10 vezes maior que o observado em *P. tenuifila*), mas de 0,015, em calos de nó foliar com 65 dias de idade e 0,012 em calos de cotilédone de 45 dias de idade, indicando aumento progressivo da razão

dos frutos para as sementes de *P. setacea* e também culminando com o maior valor nos calos, similar ao valor de razão obtido para os calos de *P. tenuifila*. Tais resultados indicam variações na regulação da biossíntese de flavonóides durante o desenvolvimento das sementes e nos calos de ambas as espécies, além de ter sido influenciada pelo fator idade dos calos, que, na maioria dos casos provocou redução da atividade de biossíntese e diminuição da atividade antioxidante.

5.3.1. Elicitação como estratégia para otimizar a produção de fenólicos totais e flavonóides por culturas celulares.

O único trabalho encontrado com *Passifloras*, sobre a eficiência da utilização da radiação UV-B e a elicitação, pelo metil jasmonato, na produção de glicosil flavonóides (orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina) por culturas de calos foi realizado para *P. incarnata*, *P. quadrangularis* e *P. edulis* (ANTOIGNONI *et al.*, 2007). Em culturas de calos, apenas pequenas quantidades de iso-orientina foram detectadas enquanto que a concentração dos outros flavonóides esteve abaixo do limite de detecção. A irradiação dos calos com UV-B aumentou a produção dos quatro tipos de glicosil flavonóides, sendo que as culturas de calos de *P. quadrangularis* foram expostas por 7-dias à exposição de UV-B (3 doses de UV-B foram testadas, UV1, UV2 e UV3) e passaram a produzir o flavonóide orientina em concentrações altas, similares às encontradas em folhas das plantas crescidas em casa de vegetação. Após dois dias de exposição ao UV-B os calos acumularam de 559 a 1163 $\mu\text{g/g}$ de massa seca. A elicitação das culturas com metil jasmonato, também aumentou as concentrações de orientina, vitexina e isovitexina nos calos, apesar de que a estimulação foi cerca de 6 vezes menor para a orientina e vitexina e cerca de 40 vezes para a isovitexina, do que a exercida pelo tratamento com UV-B. A elicitação com metil jasmonato por 7 dias também induziu a produção de orientina (300 $\mu\text{g/g}$ de massa seca). Os autores observaram também que os calos tratados com UV-B, que estimulou a produção de flavonóide, estimulou também a atividade antioxidante (de 28% para 76%) quando comparado com os calos não tratados. Esses resultados indicam que essa abordagem poderia também ser utilizada nos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, para otimizar a produção de flavonóides.

A eficiência da utilização de culturas celulares para a produção de compostos fenólicos tem sido comprovada para outras espécies, mais recentemente, por vários autores, entre eles Costa *et al.* (2013) que verificaram que as culturas celulares de *Lavandula viridis* acumularam

conteúdos muito maiores de ácido rosmarínico do que as plantas selvagens, sendo uma valiosa fonte de metabólitos com atividade antioxidante e anti-colinesterase. As culturas celulares *in vitro* dessa espécie produziram quantidades consideráveis de vários tipos de fenólicos como ácido rosmarínico, luteolina, pinocembrina e de diferentes tipos de ácido cafeoilquinico, maiores do que as detectadas em plantas crescidas no campo. Vários, também, são os exemplos que demonstram o potencial da elicitação em promover o acúmulo de compostos fenólicos por culturas celulares de outras espécies e que podem ser aplicados às culturas de calos desenvolvidas para *P. setacea* e *P. tenuifila*. Dong *et al.* (2010) relatam que em culturas celulares de *Salvia miltiorriza* elicidadas com ácido salicílico foram observados aumentos nos compostos fenólicos e que várias enzimas da biossíntese de fenólicos, incluindo a PAL tornaram-se mais ativas. O acúmulo em compostos fenólicos e atividade da PAL foram estimulados 8 h após o tratamento, sugerindo que as culturas de células são sistemas ideais para a produção biotecnológica de metabolitos secundários como ácido cafeíco e ácido salvianólico. Além de aumentar o metabolismo secundário da PAL verificaram que o ácido salicílico aumentou as atividades antioxidativas de várias enzimas. Em culturas de células de *Orthosiphon stamineus* Benth (Lamiaceae), tratadas com elicitores como a quitosana, Lim *et al.* (2013) também observaram o aumento na produção de fenólicos e na atividade antioxidante das culturas e concluíram que as culturas celulares poderiam ser usadas como uma alternativa para a produção de compostos bioativos com atividade antioxidante, sendo ferramentas importantes para a produção consistente e sustentável de matérias primas para a produção de compostos fitoterápicos. Vários outros tipos de elicitores foram utilizados nessas culturas como NaCl, sacarose, hidrolisado de caseína e extrato de levedura, mas a maior atividade antioxidante foi correlacionada positivamente com o conteúdo de fenólicos totais das culturas elicidadas com quitosana.

Em outros casos, o fornecimento de precursores da biossíntese de compostos fenólicos e flavonóides foi uma forma de promover o aumento da produção de flavonóides por culturas celulares e são importantes abordagens a serem utilizadas em *P. setacea* e *P. tenuifila*. Palacio *et al.* (2011), trabalhando com culturas celulares de *Larrea divaricata* Cav., realizaram a suplementação das culturas com L-fenilalanina, ácido cinâmico, ácido ferúlico e ácido sinápico com o objetivo de aumentar a formação de biomassa e de compostos fenólicos para a produção da lignana citotóxica ácido nordihydroguaiaretico (NDGA), dos ácidos p-cumárico e do álcool sinapil. A suplementação com L-fenilalanina

aumentou o NDGA resultando no mais alto nível de bioconversão. Também, o conteúdo de ácido p-cumárico no meio suplementado com L-fenilalanina aumentou de 47,43 para 1157,28 µg/g massa seca, indicando o efeito promotor do fornecimento de precursores.

5.3.2. Diferenciação celular e idade das culturas celulares como estratégia para otimizar a biossíntese de fenólicos totais e flavonóides.

No presente trabalho, as culturas que visualmente apresentaram maior diferenciação celular foram as culturas de calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*, com a diferenciação de ramos, fato que pode explicar os maiores níveis de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante, quando comparados com os demais tipos de calos de *P. tenuifila* e de *P. setacea*. Palacio *et al.* (2012) também desenvolveram estudos com calos com diferentes níveis de diferenciação, suspensões celulares, microplantas e plantas crescidas no campo de *Larrea divaricata*, para avaliar o potencial de biossíntese de compostos fenólicos. Observaram que calos, com e sem organogênese produziram a lignana ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) e quercetina, assim como as microplantas e as plantas crescidas no campo. O NDGA também foi produzido pelas suspensões celulares, junto com ácido p-cumarico, ácido ferulico e álcool sinapil. Verificaram que capacidade de tecidos indiferenciados de formar compostos fenólicos foi limitada, mas quando os calos sofreram organogênese, desenvolvendo principalmente ramos adventícios, a produção de compostos fenólicos aumentou significativamente. Mas, as microplantas regeneradas a partir dos ramos adventícios dos calos não mostraram o mesmo padrão de compostos fenólicos das plantas crescidas no campo, com níveis de NDGA e quercetina sendo 3,6 a 5,9 vezes menor, respectivamente. Assim, a manipulação mais precisa da diferenciação celular nos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* pode assegurar a maior biossíntese de compostos fenólicos e flavonóides.

Os resultados obtidos para os calos de *P. setacea* indicaram aumento de fenólicos totais e flavonóides com a idade, apenas para nó foliar e, de um modo geral, a atividade antioxidante dos calos diminuiu com a diminuição dos níveis de fenólicos totais e flavonóides, em calos de ambas as espécies. Em calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila* a idade dos calos crescidos em sacarose (50 e 80 dias) foi determinante para a redução drástica de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante. Os resultados obtidos apontam para a necessidade

urgente de realização de experimentos mais completos sobre a cinética de crescimento e acúmulo de fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante dos diferentes tipos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, para otimização da biossíntese. Ali *et al.* (2013) estudando calos, suspensões celulares e plântulas derivadas de sementes germinadas de *Artemisia absinthium* observaram que os máximos níveis de fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante foram detectados em suspensões celulares, assim como o nível máximo de ácido gálico, ácido cafeico e catequinas, indicando os resultados que as suspensões celulares apresentaram maior potencial para aumentar a produção de fenólicos e a maior capacidade antioxidante do que as culturas de calos e as plântulas derivadas de sementes. Verificaram, também, que os maiores níveis de fenólicos e flavonóides nem sempre coincidiram com o máximo crescimento dos calos/suspensões, pois em cultura de calos o aumento inicial na produção desses compostos foi observado no dia 21 da fase logarítmica de crescimento dos calos e os picos de fenólicos e flavonóides no dia 35 antes do dia 42 (pico da maior biomassa seca). Em suspensões celulares aumento considerável dos compostos foi observado em suspensões no sexto dia de cultura. Contrariamente aos picos dos calos, os picos de fenólicos totais ocorreram no dia 30 e de flavonóides, no dia 33, no início da fase estacionária (quando começa a decrescer a biomassa seca das suspensões cujo pico máximo foi no dia 27), mas as atividades antioxidantes máximas coincidiram com os picos de fenólicos totais e flavonóides, tanto em calos como nas suspensões celulares. O desenvolvimento de suspensões celulares, a partir dos calos produzidos em meio semi-sólido, para *P. setacea* e *P. tenuifila* poderá ser também uma forma de otimizar a biossíntese dos referidos compostos.

Esses autores também demonstraram que a manipulação de diferentes concentrações da citocinina TDZ, isoladamente ou em combinação com as auxinas ANA ou AIA foram determinantes na produção de calos com maior biomassa seca, indicando que a manipulação dos reguladores de crescimento é importante na otimização da produção de biomassa e que, em sistemas de suspensões celulares o máximo de biomassa produzida ocorreu após 27 dias de cultura enquanto que em culturas de calos ocorreu aos 42 dias de cultura. Em calos de *Artemisia absinthium* a máxima atividade antioxidante (63,3%) e máximo acúmulo de fenólicos totais (1,48 mg EAG/g de massa seca) e de flavonóides (0,48 mg EQ/g de massa seca) ocorreram no dia 35, sendo observada a queda na atividade antioxidantes após esse período. Apesar dos valores encontrados serem muito maiores do que em calos de

P. setacea e *P. tenuifila*, as atividades antioxidantes desses calos foram maiores (84% para *P. tenuifila* e 88,17% em calos de *P. setacea*).

Um resultado importante obtido no presente trabalho foi que, mesmo com os níveis de fenólicos e flavonóides baixos, as atividades antioxidantes dos calos foram mais altas (88,17% em calos de nó foliar de 45 dias de *P. setacea*; 84% em calos de 50 dias de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*) do que as observadas para calos de *P. quadrangularis*, mesmo após a elicitação das culturas, o que indica que em *P. setacea* e *P. tenuifila* talvez as atividades antioxidantes dos calos estejam relacionadas mais com os tipos de fenólicos e flavonóides produzidos do que com as quantidades.

Nos únicos casos em que não houve correlação positiva entre a máxima atividade antioxidante com os níveis de fenólicos totais e flavonóides (frutos no estágio 3 de *P. tenuifila*; sementes no estágio 1 de desenvolvimento de *P. setacea*; calos de nó foliar de 45 dias de *P. setacea*) é possível sugerir que talvez tipos de compostos antioxidantes diferentes e eficientes estejam sendo produzidos, não sendo importante o aspecto quantitativo mas sim qualitativo da biossíntese dos compostos. Outro aspecto importante a ser notado, com relação à atividade antioxidante, foi que os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, mesmo produzindo quantidades de fenólicos muito menores do que as máximas verificadas em frutos e sementes de ambas as espécies, apresentaram níveis equivalentes ou até maiores (88,17%, calos de nó foliar de *P. setacea* de 45 dias de idade; 84%, calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*) de atividade antioxidante, ressaltando o potencial de utilização de biomassa de calos dessas duas espécies como fontes alternativas desses bioativos. Assim, apenas as análises quantitativas dos compostos fenólicos e flavonóides não foram suficientes para definir o potencial dos sistemas estudados para a biossíntese de bioativos.

5.4. PERFIS DE CLOROFILAS, CAROTENÓIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FRUTOS, SEMENTES E CALOS DE *P. setacea* E *P. tenuifila*.

Os carotenóides detectados em frutos, sementes e calos *P. setacea* e *P. tenuifila* são fotoprotetores e dissipam a energia térmica em excesso, além de serem antioxidantes (β -caroteno, zeaxantina e luteína), possuir atividade pró-vitáminica A (β -caroteno e β -criptoxantina) ou prevenir degeneração macular associada à idade (luteína e zeaxantina). A biossíntese desses compostos nos frutos e sementes pode estar

relacionada com o período de coleta dos frutos e pela influência dos fatores ambientais. Além disso, a presença de radicais livres de oxigênio aumenta a síntese de carotenóides, através da capacidade de proteção das células ao dano oxidativo (NUR *et al.*, 1982).

A diminuição dos carotenóides durante a maturação (Tabela 5) demonstra que nem sempre há uma correlação direta entre cor e quantidade de carotenóides, e sim com fatores internos e com a posição dos plastídeos no tecido (GROSS, 1977). É interessante notar que nas polpas de *P. tenuifila* houve diminuição dos teores de carotenóides ao longo do amadurecimento, mas nas sementes (Tabela 8) ocorreu o contrário, os carotenóides aumentaram nos estádios de desenvolvimento. A CLAE associada à espectrofotometria UV-visível mostrou-se adequada para a detecção e quantificação dos carotenóides em frutos. Os resultados obtidos mostraram um alto teor de xantofilas nas polpas e sementes de ambas as espécies, principalmente de luteína, o consumo desses frutos deve ser incentivado como fonte destes carotenóides e também para a produção de suplementos dietéticos.

Há uma ligação específica de β -caroteno às proteínas no fotossistema I e fotossistema II e de luteína e neoxantina com as clorofilas a e b, no fotossistema II. Assim, os níveis de luteína e neoxantina, estão relacionados ao de clorofila b, e os níveis de β -caroteno ao de clorofila a (JUHLER *et al.*, 1993). O complexo grana é rico em clorofila b e xantofilas enquanto as lamelas do estroma são ricas em clorofila a e β -caroteno. Frutos de *P. setacea* apresentaram níveis semelhantes de clorofila a e b (Tabela 6), apresentaram luteína em todos os estádios e *trans*- β -carotenos nos primeiros estádios de amadurecimento, estando ausente apenas no último.

O fruto de *P. tenuifila* no estágio 1 de desenvolvimento foi o mais rico em clorofila a e nesse estágio apareceram α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno, a diminuição de clorofila b foi acompanhada pela diminuição de luteína. Esses resultados sugerem que a distribuição dos pigmentos no sistema tilacoidal variou de espécie para espécie. Tanto, pelo nível de clorofilas quanto de luteína, podemos dizer que, em frutos de *P. tenuifila* nos primeiros estádios a via biossintética dos carotenóides individuais esteve mais ativa, assim como a atividade fotossintética, pois existe uma queda acentuada de fotossíntese quando a luteína está ausente (DELLAPENNA, 1999).

A redução drástica dos níveis de clorofilas a e b dos calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*, de 50 dias de idade para os calos de 80 dias pode ser explicada pela acidificação do meio de cultura, pois o íon hidrogênio pode substituir o íon magnésio central da molécula

de clorofila (Tabela 11). Ainda, pode ter havido acúmulo de enzimas que são responsáveis pela degradação da clorofila, sendo a mais conhecida a clorofilase, ou de outras enzimas como a clorofila oxidase, lipooxygenase e peroxidase, cujas atividades podem ter sido intensificadas, também, em alguns tipos de calos de *P. setacea*, em que houve decréscimo nos níveis de clorofila a e/ou b com o tempo de cultivo.

Estudos complementares, mais detalhados, da relação entre níveis de clorofilas *a* e *b* nos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, as cinéticas de crescimento das culturas e da produção de carotenóides poderão indicar a possível função desses pigmentos como marcadores moleculares do metabolismo, com base na observação de que nos frutos de ambas as espécies houve decréscimo concomitante das concentrações de clorofilas *a* e *b* e das concentrações de luteína e zeaxantina (*P. setacea* e *P. tenuifila*) e também dos outros tipos de carotenóides detectados em frutos de *P. tenuifila*.

Supondo-se que a mesma via de biossíntese de carotenóides, sugeridas para as plantas superiores de modo geral, esteja operando nos frutos, sementes e calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* é possível sugerir, através dos resultados obtidos no presente trabalho sobre os perfis (quantitativos e qualitativos) de carotenóides de frutos, sementes e calos dessas espécies, que diferentes mecanismos de controle regulador da biossíntese de carotenóides funcionaram em cada um dos sistemas. No caso dos frutos, pareceram estar ativas as ϵ e β ciclases e ϵ e β -hidroxilases; nas sementes as ϵ - ciclases, exceto no estágio 5 em *P. tenuifila* em que apareceu, também, um produto de ação das β -ciclases, a β -criptoxantina; nos calos em que as ϵ - ciclases e ϵ - e β -hidroxilases estiveram ativas em todos os tipos de calos estudados, o que é evidenciado pela presença da luteína, e as β -ciclases e β -hidroxilases estiveram atuando em alguns tipos de calos, evidenciado pela produção de zeaxantina, dependendo da idade dos mesmos. Outro exemplo da influência do tempo de cultivo dos calos sobre o metabolismo dos carotenóides foi comprovado em *P. tenuifila*, em que calos de 50 dias de idade originados a partir das sementes em desenvolvimento ocorreu a produção de uma maior diversidade de compostos dessa classe não identificados.

A competição entre as duas vias catalizadas pelas licopeno ciclases (as que catalizam a conversão de licopeno em α - caroteno e luteína e aquelas que catalizam a conversão do licopeno em β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina e ácido abscísico), determina a proporção de licopeno que é canalizada para a via do α -caroteno ou do β -caroteno (HANNOUFA & HOSSAIN, 2012). Segundo

esses autores, em plantas de tomate o silenciamento dos genes que codificam as ϵ - ciclases resultaram em aumento dos níveis de β -caroteno e em folhas de plantas de *Arabidopsis* mutante deficiente em ciclases do tipo ϵ não apresentaram luteína mas eram ricas em beta-caroteno, demonstrando a importância do tipo de ciclização do licopeno na modulação dos perfis de carotenóides em plantas. Assim, as variações nas expressões das ciclases nos frutos, sementes e calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* podem ter direcionado o fluxo do licopeno para a produção da luteína (ciclases do tipo ϵ) ou dos compostos da via do β - caroteno (ciclases do tipo β).

Nos casos em que os tipos de carotenóides estiveram ausentes é possível sugerir a restrição das respectivas vias de biossíntese ou um catabolismo mais intenso e rápido naquele tipo de órgão ou nos calos. Em *P. setacea*, em calos de raiz, por exemplo, é possível afirmar que o catabolismo mais intenso certamente associado à idade do calo causou o desaparecimento da zeaxantina em calos de 65 dias de idade, mas nos calos de nó cotiledonar e cotilédone é possível observar que a atividade das β - ciclases e das β -hidroxilases deve ter sido intensificada com a idade dos calos. Já em calos de *P. tenuifila* a condição da presença de frutose e ANA no meio de cultura esteve associada à atividade das β - ciclases e das β -hidroxilases, pois apenas nesse tratamento apareceu a zeaxantina.

Em frutos e sementes em diferentes estádios de desenvolvimento ficou evidente que o catabolismo dos carotenóides foi intensificado nos estádios mais avançados da maturação em frutos de *P. tenuifila* e em frutos e sementes de *P. setacea*, enquanto que a biossíntese foi intensificada em sementes de *P. tenuifila*, em que se observou que quando o nível de luteína foi o máximo começou a funcionar também a rota de biossíntese ativada pelas β -ciclases e β -hidroxilases, evidenciado pelo acúmulo de β -criptoxantina, o que denota que talvez devido ao maior acúmulo do precursor licopeno houve alteração na regulação da atividade das enzimas, sendo ativadas as β -ciclases e β -hidroxilases, que controlam as rotas de canalização para a produção do β -caroteno e subsequente conversão em zeaxantina.

Em calos de sementes em desenvolvimento de *P. tenuifila*, os perfis do metabolismo de carotenóides foram similares aos perfis obtidos para as sementes, predominando a rota de síntese da luteína, exceto quando foi utilizada frutose e ANA no meio de cultura, indicando a ação promotora desses dois fatores na ativação, também, da rota de síntese da zeaxantina, apesar do predomínio ainda da rota de síntese da luteína nesses calos. O perfil do metabolismo dos calos de segmentos de caules

de *P. tenuifila*, também foi similar ao observado nas sementes, indicando estar ativa apenas a rota de síntese da luteína.

Já em calos de *P. setacea* os perfis do metabolismo de carotenóides assemelharam-se mais aos perfis dos frutos do que das sementes, quando se analisa os tipos de carotenóides (luteína e zeaxantina) produzidos em ambos os sistemas, com a diferença de que no metabolismo dos calos houve intensificação da via de síntese da luteína e zeaxantina nos calos de nó foliar de 65 dias, o que pode ser observado pela elevação das quantidades luteína e zeaxantina, com maior ativação simultânea dos níveis de expressão dos genes/atividade enzimática envolvidos nas rotas de síntese desses compostos, mas com predomínio ainda da via de síntese da luteína. Assim, em certos tipos de calos de *P. setacea* o metabolismo da zeaxantina foi intensificado em relação ao dos frutos, indicando que a interação entre os tipos de explantes e as condições do meio de cultura ativaram, também, essa via de biossíntese, fazendo com que os sistemas de cultura de calos de 65 dias de idade, de nó foliar de *P. setacea* fossem fontes mais ricas de luteína e zeaxantina do que os frutos e as sementes. Nos calos de *P. tenuifila* os níveis de luteína não suplantaram os maiores níveis detectados nos frutos e sementes, mas aproximaram-se dos níveis observados em frutos no estágio 4 e em sementes nos estádios 1 e 2.

Nos frutos e calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram detectados apenas zeaxantina, talvez pela não expressão dos genes que codificam para síntese das enzimas epoxidases, envolvidas nas reações subseqüentes de conversão da zeaxantina em anteraxantina e desta em violaxantina. Pode ser também que, em condições de luz excessiva, a atividade da enzima VDE (violaxantina de-epoxidase) tenha sido favorecida, ocorrendo o aumento da concentração de prótons no lúmen dos tilacóides, aumentando o pH do estroma, levando ao acúmulo de zeaxantina. No caso em que houve aumento tanto da luteína quanto da zeaxantina (frutos nos estádios 1 e 2 de *P. tenuifila* e no estágio 1 de *P. setacea*) é possível inferir que, nessa condição específica, possa ter havido maior ativação da síntese de licopeno, talvez pelo metabolismo otimizado dos precursores desse composto, seja pela maior disponibilidade ou pela maior expressão das atividades das enzimas envolvidas na biossíntese do mesmo. Durante a maturação dos frutos, a conversão à luteína e zeaxantina provoca uma diminuição nos níveis de α -caroteno e β -caroteno (SANTOCONO *et al.*, 2007), comprovado para frutos de *P. tenuifila* devido ausência de α -caroteno e trans- β -caroteno e de *P. setacea* pela diminuição de α -caroteno e o trans- β -caroteno nos estádios mais desenvolvidos.

De acordo com Hannoufa & Hossain (2012), é possível utilizar a engenharia genética para aumentar os níveis de carotenóides, através da

indução da super expressão dos genes, que codificam a enzima fitoeno sintase (PSY), provocando o aumento dos níveis de fitoeno, precursor do licopeno. A indução da super expressão dos genes *crtB* (fitoeno sintase) de bactérias e *crtI* (fitoeno desaturase) em milho resultou em aumento em 34 vezes o teor de carotenóides no endosperma, enfatizando o potencial de aplicação da engenharia genética para induzir o acúmulo de carotenóides em plantas. Outro exemplo de aplicação desta abordagem biotecnológica para promover o enriquecimento de carotenóides em sementes foi relatado por Fujisawa *et al.* (2008). Em sementes de linho (*Linum usitatissimum* L) foi realizada a engenharia metabólica das plantas para aumentar o conteúdo de carotenóides nas sementes, através de transformação genética mediada por *Agrobacterium* para expressar o gene fitoeno sintase (*crtB*) derivado da bactéria do solo *Pantoea ananatis* sob controle do promotor do vírus mosaico da couve flor (CaMV 35S). Como resultado foram produzidas 8 plantas transgênicas que produziram sementes que acumularam fitoeno, α - caroteno, β - caroteno e luteína enquanto que as plantas não transformadas formaram sementes que acumularam apenas luteína. A quantidade total de carotenóides nessas sementes foi de 65,4-156,3 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca e correspondeu a aumentos de 7,8-18,6 vezes ao observado nos controles de plantas não transformadas. Esses resultados sugeriram que o fluxo da síntese de fitoeno, a partir do geranyl geranyl difosfato, foi primeiramente promovido pelo produto de expressão do gene *crtB* e depois o fitoeno foi consecutivamente transformado nos metabólitos α - caroteno, β - caroteno e luteína, através das enzimas da biossíntese de carotenóides ativa nas sementes. As sementes de linho transgênicas enriquecidas com carotenóides são valiosas fontes de nutrientes para a saúde humana. Essa abordagem poderá ser utilizada para otimizar a produção de carotenóides por calos, frutos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Além disso, as enzimas fitoeno e caroteno desaturases e isomerases são as enzimas subseqüentes envolvidas na formação do licopeno e esse é outro ponto regulador da biossíntese de carotenóides, que poderia estar sendo alterado no metabolismo de carotenóides pelos calos de *P. setacea*. Em plantas a conversão do fitoeno em licopeno envolve pelo menos 4 enzimas, sendo um processo de várias etapas.

O maior acúmulo de luteína e zeaxantina em calos de nó foliar de 65 dias de idade de *P. setacea*, em relação aos frutos e sementes dessa espécie, poderia também ser explicado pela possível maior eficiência das células dos calos em seqüestrar e armazenar os carotenóides, processo que ocorre nos plastídios. Segundo Hannoufa & Hossain (2012) todas as enzimas de biossíntese dos carotenóides estão localizadas nos plastídios,

mas todos os seus genes são codificados pelo genoma nuclear, sendo que a biossíntese dos carotenóides ocorre na membrana que reveste o cloroplasto e na membrana dos tilacóides. Afirmam que os resultados de diferentes laboratórios de pesquisa revelam que o acúmulo dos carotenóides é fortemente modulado pelo tamanho e estrutura anatômica dos plastídios. Assim, o mutante de tomate com alto nível de pigmentação apresenta grandes plastídios e produz frutos maduros com 30% a mais de carotenóides em relação ao tipo selvagem, e que uma mutação em *Brassica oleracea* Orange resultou em diferenciação de plastídios em cromoplastos, causando um aumento no acúmulo de carotenóides. Apenas um estudo aprofundado de microscopia eletrônica das células de calos, frutos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* poderia permitir a caracterização dos plastídios e uma afirmação consistente sobre esta hipótese.

Quando se considera as variações dos carotenóides em frutos, os resultados do presente trabalho sugerem, tanto para *P. tenuifila* como para *P. setacea*, um padrão no metabolismo dos pigmentos clorofilas e carotenóides, que também foi constatado em frutos de *Prunus pérsica* (LESSERTOIS & MONÉGER, 1978), em que durante o crescimento e maturação os pigmentos do mesocarpo foram aqueles que ocorreram também nas folhas, ou seja, clorofilas *a* e *b*, β -caroteno, luteína, epoxiluteína, violaxantina e neoxantina. A transformação do ovário no fruto adulto foi acompanhada pelo declínio no conteúdo de clorofilas, confirmado para os frutos de *P. tenuifila* a partir do estágio 2 e para frutos de *P. setacea* para clorofila *a*, a partir do estágio 2 e de clorofila *b*, a partir do estágio 3; declínio nos níveis de carotenóides para valores abaixo de 55% do conteúdo inicial, também constatado em frutos de *P. tenuifila* para luteína e zeaxantina, e em frutos de *P. setacea*, para luteína e zeaxantina, a partir do estágio 1. Nos frutos maduros de *Prunus pérsica* 42% dos carotenóides foram oxidados e todos os carotenóides detectados foram de configuração β como o β -caroteno, β -criptoxantinas e seus epóxidos, zeaxantina, anteraxantina e auroxantina. Em *Prunus pérsica* no estágio de maturação os carotenóides dos frutos desapareceram totalmente, mas traços de clorofilas permaneceram. Nos frutos de *P. tenuifila* no estágio mais avançado de desenvolvimento a diminuição drástica nos carotenóides também ocorreu, sendo que o nível de luteína caiu para 11,5% do nível máximo observado no estágio 2 e o nível de zeaxantina caiu para 11,7%; nos frutos de *P. setacea* a concentração de luteína diminuiu para 21,7% do máximo detectado nos frutos no estágio 1 e a zeaxantina foi totalmente oxidada em frutos no estágio 4, desaparecendo totalmente.

Em relação aos demais carotenóides de configuração β , a criptoxantina, em *P. tenuifila* ocorreu em quantidade máxima nos frutos do estágio 2, decrescendo nos estádios avançados do desenvolvimento e o trans- β -caroteno e cis- β -caroteno foram detectados apenas no estágio 1, sendo que nos frutos de *P. setacea* a β -criptoxantina e o cis- β -caroteno não foram detectados e apenas o trans- β -caroteno ocorreu em quantidades similares nos frutos de estádios 1, 2 e 3, desaparecendo no estágio 4. Assim, o padrão de aparecimento e de acúmulo desses tipos de β -carotenóides em frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* foram contrários aos observados para *Prunus pérsica* e para frutos de *Citrus sinensis* e *Citrus unshiu* Marcow (WANG *et al.*, 2011), em que estudos de expressão dos genes licopeno ciclase e sua regulação cascata a baixo da biossíntese de carotenóides durante a maturação dos frutos sugeriram, a partir dos resultados do acúmulo de carotenóides, que o processo biossintético dessa classe de compostos mudou de luteína e β -caroteno para os outros tipos de β -carotenóides durante o desenvolvimento dos frutos. Portanto, os resultados obtidos para *P. tenuifila* e *P. setacea* indicam que o metabolismo de transformação da luteína em outros carotenóides de configuração β - ocorreu logo nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos e que esse metabolismo diferiu entre as duas espécies estudadas, de tal forma que no estágio 4 os frutos de *P. tenuifila* apresentaram ainda luteína (nível maior do que *P. setacea*), zeaxantina e β -criptoxantina, enquanto que os frutos de *P. setacea* no estágio 4 apresentaram apenas luteína.

Vários estudos têm sido conduzidos sobre a influência de fatores como luz e temperatura sobre o metabolismo dos pigmentos dos frutos. De acordo com Rodrigo *et al.* (2013), em frutos de *Citrus* a coloração da casca é devida à presença de dois pigmentos principais que são as clorofilas, que conferem a coloração verde e carotenóides, que são responsáveis pela coloração característica dos frutos maduros da maioria das espécies e cultivares e as mudanças nesses compostos durante o amadurecimento natural dos frutos acompanhada pela transformação dos cloroplastos em cromoplastos. Esses autores afirmam que a maioria dos genes envolvidos no metabolismo dos carotenóides e clorofilas foram caracterizados em *Citrus*, concluindo que o conteúdo e composição desses pigmentos são, na maioria das vezes, geneticamente determinados e altamente regulados no nível transcrição gênica. Relatam, também, que a luz, temperatura e fatores nutricionais, como nitrogênio e açúcares tem influência crítica sobre o desenvolvimento da coloração, sendo que a hipótese de consenso estabelece que a coloração da casca dos frutos é governada por fatores nutricionais e ambientais, atuando através da ação

de diferentes sinais hormonais, fatores esses que também poderão ser manipulados para promover as vias de biossíntese dos carotenóides em frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Em camu-camu (*Myrciaria dubia*) nativa da Amazônia, rica em ácido ascórbico, Zanatta & Mercadante (2007) analisaram a composição de carotenóides dos frutos, demonstrando a ocorrência de uma diversidade maior de carotenóides da via do β -caroteno do que a observada, no presente trabalho, em frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila*. Observaram que o carotenóide predominante nos frutos de camu-camu (de 45% a 55% do conteúdo total de carotenóides) foi a trans-luteína, seguida pelo β -caroteno, violaxantina e luteoxantina, sendo que os níveis de luteína, β -caroteno, violaxantina, luteoxantina e de outros carotenóides, que apareceram em menor quantidade, foram maiores nos frutos de camu-camu produzidos nas regiões com altas temperaturas e maior exposição à luz em comparação com outras regiões, indicando a influência desses fatores no metabolismo dos pigmentos. O total de luteína encontrado nos frutos de camu-camu foi de 1,61 $\mu\text{g/g}$, valor aproximado ao encontrado nos frutos de *P. tenuifila* no estágio 4 de desenvolvimento e cinco vezes maior que o encontrado em frutos de *P. setacea* no estágio 4 de desenvolvimento.

Padrões de variação dos perfis metabólicos dos pigmentos dos frutos semelhantes aos observados para *P. tenuifila* e *P. setacea* foram observados também em outras espécies. Solovchenko *et al.* (2006) observaram, em frutos de maçã, que o padrão de carotenóides apresentou mudanças consideráveis com o progresso do amadurecimento, com o declínio em luteína e β -caroteno e acúmulo de violaxantina e ésteres de ácidos graxos de xantofila, que predominaram nos estádios mais avançados do amadurecimento. Observaram também, através do monitoramento, de forma não destrutiva, dos conteúdos e composição de clorofilas e carotenóides de frutos amadurecendo na própria árvore que, em frutos de árvores expostas à luz do sol houve um declínio na clorofila e retenção ou um aumento conteúdo de carotenóides, indicando a influência da exposição à luz sobre o metabolismo dos pigmentos.

Em fruta pão (*Artocarpus atilis*) Maxwell *et al.* (2013) analisaram o conteúdo total e os perfis de carotenóides de 95 cultivares, indicando que a luteína foi o carotenóide predominante nos frutos 0,45 $\mu\text{g/g}$ de massa fresca, sendo que o mais abundante carotenóide pró-vitamina A foi o β -caroteno, cuja concentração encontrada em frutos frescos foi de 0,153 $\mu\text{g EQ/g}$ de massa fresca. O cultivar superior apresentou 0,62 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, 0,23 $\mu\text{g/g}$ de α -caroteno e apenas 0,03 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina. Considerando que a massa seca dos frutos represente 10% da massa fresca

os valores poderiam ser recalculados para 4,5 µg/g de massa seca de luteína, valor menor do que o encontrado nos frutos nos estádios 1 e 2 de *P. tenuifila* e maior do que o máximo valor encontrado para luteína no estádio 1 em frutos de *P. setacea*. Com base nos mesmos cálculos os valores de criptoxantina seriam de 0,3 µg/g de massa seca, valor aproximadamente 4 vezes menor do que o máximo detectado em frutos no estádio 2 de *P. tenuifila*. Motilva & Romero (2010) também demonstraram em frutos de *Olea europaea*, que a atividade fotossintética dos frutos diminuiu, assim como as concentrações de pigmentos presentes nos cloroplastos, clorofilas e carotenóides durante o processo de amadurecimento sendo que no final do processo, além dos níveis menores de clorofilas *a* e *b*, os carotenóides luteína, β-caroteno, violaxantina, neoxantina e anteraxantina predominaram nesses frutos no final do processo de amadurecimento, demonstrando a ocorrência de maior diversidade de carotenóides derivados do β-caroteno nos frutos.

A relação entre os carotenóides presentes nos frutos e as atividades antioxidantes foi estudada por Kubola & Siriamornpun (2011), que realizaram a análise fitoquímica de extratos de casca, polpa e arilo de frutos de *Momordica cochinchinensis* Spreng quanto ao licopeno, β-caroteno, luteína e suas atividades antioxidantes. Os resultados mostraram que os arilos tinham os maiores níveis de licopeno e β-caroteno enquanto que a casca apresentou o maior conteúdo de luteína. A maior atividade antioxidante detectada em casca e polpa de frutos ocorreu no estádio imaturo, resultado contrário ao obtido no presente trabalho para frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, que apresentaram maior atividade antioxidante os frutos nos estádios 3 e 4 de desenvolvimento, não coincidindo com os maiores níveis de carotenóides detectados nos estádios iniciais. Nas sementes a atividade antioxidante aumentou do estádio imaturo para o maduro, padrão semelhante ao apresentado por sementes de *P. tenuifila* (coincidindo com o aumento de luteína), mas foi contrário ao apresentado por sementes de *P. setacea*, em que tal atividade decresceu com os estádios mais avançados de desenvolvimento das sementes, acompanhando o declínio dos níveis de luteína.

Os poucos tipos de carotenóides acumulados pelas sementes de *P. setacea* (luteína) e *P. tenuifila* (luteína e β-criptoxantina, apenas no estádio 5) diferiram da diversidade apresentada pelas sementes de outras espécies de plantas e não foram encontrados na literatura estudos abordando as características de acúmulo de carotenóides em sementes de outras espécies de Passifloras. Em cereais (aveia, trigo, cevada, milho), apesar de serem monocotiledôneas, Ndolo & Beta (2013) demonstraram que a composição de carotenóides em grãos de milho e dos demais cereais

foi semelhante, mas as concentrações variaram significativamente. Observaram que os conteúdos de carotenóides totais, luteína e zeaxantina foram maiores em sementes de trigo, aveia e cevada do que nas sementes de milho, que apresentaram concentrações menores de luteína e zeaxantina no endosperma. Sementes de trigo e aveia apresentaram, na camada de aleurona, níveis de zeaxantina de duas a cinco vezes maior do que de luteína, indicando que as variações dependeram das espécies. Também demonstraram haver correlação positiva entre os carotenóides totais analisados e a atividade antioxidante dos grãos, resultado similar ao obtido para as sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Em alpiste (*Phalaria cariensis*) Li & Beta (2012) demonstraram que o β - caroteno, luteína e zeaxantina também foram os carotenóides predominantes e que os altos níveis de β - caroteno diferenciou essas sementes de outros tipos de cereais como ingrediente potencial para enriquecimento funcional de alimentos. O nível de luteína nas diferentes variedades de sementes de alpiste variou entre 1532 e 3007 $\mu\text{g EQ/Kg}$. Em *P. tenuifila* a concentração máxima de luteína nas sementes no estágio 5 foi de 2900 $\mu\text{g/kg}$ de massa seca de sementes e de *P. setacea*, no estágio 1, de 1940 $\mu\text{g /kg}$ de massa seca. Tais resultados indicam que as sementes de *P. tenuifila*, no estágio mais avançado de desenvolvimento são melhores fontes de luteína do que as sementes de *P. setacea*, para o enriquecimento funcional de alimentos.

A diminuição dos níveis de luteína em sementes de *P. setacea* nos estádios mais avançados do desenvolvimento também foi observada em outras espécies. Simkin *et al.* (2010) demonstraram, em sementes de café em desenvolvimento, a presença de luteína nas sementes e que as sementes imaturas de café continham quantidades significativas de β -caroteno, α - caroteno, violaxantina e neoxantina, diversidade maior de carotenóides do que a observada em sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*. Esses autores demonstraram também, através da análise complementar quantitativa da expressão gênica, que todos os genes da biossíntese de carotenóides se expressaram nas sementes de café e que os níveis de transcritos foram dependentes dos níveis de expressão gênica e do estágio de desenvolvimento da semente. Verificaram, nos últimos estádios de desenvolvimento das sementes, a redução dos níveis de carotenóides e dos níveis da maioria dos transcritos.

A semente de maracujá é tida como subproduto da produção de sucos, e a quantidade deste “resíduo” é bastante expressiva, o descarte na natureza pode trazer danos ao meio ambiente. Nesse contexto, os incentivos da utilização desses resíduos industriais, além de representarem uma tendência econômica, também são uma necessidade

para a manutenção do equilíbrio ambiental. Essas sementes representam uma ótima fonte de matéria prima, principalmente pela presença de óleos de interesse na indústria alimentícia e cosmética e ainda permanecem pouco exploradas, mas os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* poderão ser utilizadas no enriquecimento funcional de alimentos, em luteína, dependendo do estágio de desenvolvimento. Atualmente, a fonte de luteína, que está emergindo no mercado como um importante composto para as indústrias alimentícias e farmacêuticas pela possível função em manter a boa visão e na prevenção das maculopatias ligadas à idade, são as pétalas de plantas do gênero *Tagetes* e há demanda por novas fontes alternativas de biossíntese desse composto. O tomate cultivar Red Setter foi transformado geneticamente com o gene que codifica a ϵ -ciclase, sob controle do promotor constitutivo e foi produzida linhagem High Delta, caracterizada pelos elevados níveis de luteína nos frutos maduros.

5.4.1. Transformação genética como estratégia para otimizar a biossíntese de carotenóides em calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Estudos recentes, desenvolvidos por Kim *et al.* (2012), indicam a eficiência de estratégias de transformação genética da regulação cascata abaixo da β -caroteno hidroxilase (CHY- β), que é uma enzima que cataliza a hidroxilação de β -caroteno para β -criptoxantina e da β -criptoxantina para zeaxantina. Para aumentar os níveis de β -caroteno e carotenóides totais em culturas de células transgênicas de batata doce os autores silenciaram os genes que codificam a enzima CHY- β , através da introdução em cultura de células de batata doce do cultivar White-fleshed do “construct” IbCHY- β , o que provocou um aumento no nível de expressão da fitoeno sintase e licopeno β -ciclase, enquanto que a expressão dos outros genes não mostraram alterações detectáveis. A regulação cascata abaixo da expressão do gene IbCHY- β mudou a composição dos níveis de carotenóides entre os calos transgênicos e não transgênicos, sendo o conteúdo total de carotenóides (117 $\mu\text{g/g MS}$) e β -caroteno (34,43 $\mu\text{g/g MS}$) aumentado nos calos transgênicos, assim como a atividade antioxidante. Quando o gene IbCHY- β dos calos foi silenciado, os níveis β -criptoxantina e zeaxantina aumentaram. Os resultados indicaram que a regulação cascata a baixo do gene IbCHY- β aumentou os níveis de β -caroteno e carotenóides totais em células transgênicas e aumentou a capacidade antioxidante dos calos.

Mais recentemente, Kim *et al.* (2013) isolaram o gene Or (o gene Orange (Or) é responsável pelo acúmulo de carotenóides em plantas) de

Ipomoea batatas L. (o gene IbOr) do cultivar Orange-fleshed e analisaram a sua função em calos transgênicos de bata doce do cultivar White-fleshed, usando a transferência via *Agrobacterium*. Os calos transgênicos foram facilmente selecionados, pois passaram a desenvolver coloração laranja e os níveis de β - caroteno, luteína e carotenóides totais nas linhagens de células transgênicas aumentaram de 6 a 14 vezes, assim como a atividade antioxidante. Os resultados indicaram que o gene IbOr poderia ser utilizado para o desenvolvimento biotecnológico de plantas transgênicas de batata doce, que acumulam níveis aumentados de carotenóides. Semelhantes abordagens poderão ser utilizadas nas culturas celulares de *P. setacea* e *P. tenuifila* a partir do isolamento do gene responsável pelo acúmulo de carotenóides nessas espécies ou da introdução de genes já isolados de outras espécies.

Os níveis elevados de luteína e zeaxantina nos calos de *P. setacea* em relação aos níveis de luteína (em sementes e frutos) e zeaxantina (em sementes) indicam o grande potencial de utilização dos sistemas de culturas de células para viabilizar a produção desses compostos. Alguns exemplos recentes indicam que a utilização das abordagens de transformação genética podem ser utilizadas, com sucesso, para otimizar a produção de carotenóides por culturas de células de outras espécies e poderão ser utilizadas, para otimizar a produção de carotenóides pelas culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

5.5. RELEVÂNCIA DA TÉCNICA DE VARREDURA EM UV-VIS NOS ESTUDOS DE METABÓLICOS SECUNDÁRIOS EM ESPÉCIES DE *Passifloras*.

A espectroscopia de varredura em UV-vis foi uma ferramenta extremamente útil na identificação das classes de metabólitos secundários majoritárias em frutos, sementes e culturas celulares de *P. tenuifila* e *P. setacea*, auxiliando no direcionamento das análises de quantificação dos metabólitos que foram realizadas posteriormente e permitindo, através da comparação dos perfis metabólicos, detectar diferenças entre as espécies, entre frutos e sementes de uma mesma espécie, entre estádios de desenvolvimento de frutos e de sementes e entre culturas celulares de diferentes origens. Assim, esta técnica de análise poderia ser utilizada em estudos mais aprofundados sobre a fisiologia da maturação e do desenvolvimento de frutos e sementes de *Passifloras*, no monitoramento dos perfis metabólicos das culturas celulares produzidas em diferentes condições, para otimização dos protocolos de produção dos metabólitos secundários e também para monitorar o controle de qualidade das

sementes e frutos visando identificar os estádios em que se acumulam os metabólitos de interesse.

5.6. PERSPECIVAS.

Os resultados obtidos para frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* sobre a dinâmica da variação dos pigmentos, fenólicos totais, flavonóides, vitamina C, luteína e zeaxantina (níveis maiores em *P. tenuifila*) e da atividade antioxidante durante o desenvolvimento dos frutos permitirão otimizar os processos de utilização dos frutos pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas, de forma a compatibilizar o estágio correto de desenvolvimento do fruto com a produção de bioativos e atividade antioxidante. Apesar de, no presente trabalho, não terem sido realizadas as análises qualitativas dos compostos fenólicos e flavonóides produzidos pelas sementes e a relação com a atividade antioxidante as sementes nos estádios 4 e 5 de desenvolvimento de *P. tenuifila* e no estágio 1 de *P. setacea* também apresentam potencial para serem utilizadas como fontes de antioxidantes, sendo melhores fontes do que os frutos.

Os resultados indicaram o relevante potencial das culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* para a produção de fenólicos totais, flavonóides, luteína, zeaxantina e atividade antioxidante, uma vez que são sistemas com características de produção rápida de biomassa e que podem ser manipulados quanto aos reguladores de crescimento, fontes de carbono, cinética de crescimento, níveis de diferenciação, fornecimento de precursores e elicitação, manipulações essas que têm sido utilizadas com sucesso na otimização da produção em outras espécies do gênero *Passiflora* (*P. quadrangularis*) e em outras espécies de plantas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

Os estádios de desenvolvimento de frutos e sementes, os tipos de explantes e idade das culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* influenciaram a biossíntese de compostos fenólicos totais, flavonóides, vitamina C (frutos), clorofilas, carotenóides (níveis e diversidade) e a atividade antioxidante.

Os máximos níveis de fenólicos totais em frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram detectados no estádio 4; de flavonóides nos estádios 1 e 2 (*P. tenuifila*) e 1 e 4 (*P. setacea*); de vitamina C nos estádios 1 (*P. tenuifila*) e 4 (*P. setacea*); de luteína e zeaxantina nos estádios 2 (*P. tenuifila*) e 1 (*P. setacea*); de β -criptoxantina, apenas em *P. tenuifila* estádio 2; de clorofilas *a* e *b* no estádio 1, para ambas as espécies e atividade antioxidante nos estádios 3 (*P. tenuifila*) e 4 (*P. setacea*).

Em sementes, os maiores níveis de fenólicos totais ocorreram no estádio 4, tanto em *P. tenuifila* como em *P. setacea*, de flavonóides nos estádios 5 (*P. tenuifila*) e 4 (*P. setacea*), de luteína nos estádios 5 (*P. tenuifila*) e 1 (*P. setacea*), de β -criptoxantina apenas no estádio 5 (*P. tenuifila*) e de atividade antioxidante nos estádios 4 e 5 (*P. tenuifila*) e 1 (*P. setacea*). Em *P. setacea* o maior nível de luteína nas sementes foi superior ao maior nível detectado nos frutos enquanto que em *P. tenuifila* o maior nível de luteína ocorreu nos frutos.

Para *P. setacea* foram definidas as melhores condições de cultivo de calos para otimizar a produção de fenólicos totais (cotilédone, 45 dias), flavonóides (nó foliar, 65 dias; cotilédone 45 dias), luteína e zeaxantina (nó foliar, 65 dias), clorofila *a* (hipocótilo, 65 dias; raiz, 45 dias), clorofila *b* (hipocótilo 65 dias) e maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH•(nó foliar, 45 dias). Os níveis de luteína nos calos de nó foliar de *P. setacea* com 65 dias de idade foi superior aos máximos valores detectados em frutos e sementes dessa espécie.

Para *P. tenuifila* os calos de 50 dias de idade originados do cultivo de sementes em desenvolvimento em 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D apresentaram os maiores níveis de fenólicos totais, flavonóides, luteína, clorofilas *a* e *b* e maior porcentagem de inibição do radical livre DPPH•. Os níveis de flavonóides nesses calos foi superior aos detectados em frutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* e a zeaxantina foi produzida, apenas, pelos calos de 80 dias de sementes em desenvolvimento cultivados em frutose e com ANA.

Em *P. setacea* calos de hipocótilo foram os únicos a produzir o trans- β - caroteno e cis- β -caroteno, que não foram produzidos pelos demais calos, sendo que o cis- β - caroteno não foi detectado em frutos ou sementes. Em *P. tenuifila* calos de sementes em desenvolvimento cultivados em frutose e 2,5 μ M de ANA foram os únicos a produzir zeaxantina.

Os resultados obtidos possibilitaram a definição, para cada espécie e classe de compostos, dos melhores estádios de desenvolvimento de frutos e sementes, para a utilização no enriquecimento funcional de alimentos e aplicação em estudos farmacológicos. Permitiram, também, definir os tipos de explantes e idade das culturas de calos ideais, para otimizar a produção de bioativos por cultura de células, através da aplicação de abordagens biotecnológicas.

7. REFERÊNCIAS

AKANBI, B. O.; BODUNRIN, O.D.; OLAYANJU, S. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Passiflora edulis*. **Researcher** v.3, n.5, p.9-12, 2011.

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, 2012.

ALÓS, E.; RODRIGO, M.; ZACARIAS, L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper frutis (*Capsicum annuum* L.). **Plant Science** v.207, p.2-11, 2013.

AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M.; YAMAKAMI, S.; YOSHIDA, T. Isolation of phenolic constituents and characterization of antioxidant markers from sun flower (*Helianthus annuus*) seed extract. **Phytochemistry Letters** v.6, n.2, p.302-305, 2013.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research** v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz** v.66, n.1, p.1-9, 2007.

ANTOGNONI, 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, n.5, p.345–352, 2007.

APPEZATO-DA-GLÓRIA B.; VIEIRA M.L.C.; DORNELAS M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.

ARAGUEZ, I.; CRUZ-RUS, E.; ÁNGEL BOTELLA, M. A.; MEDINA-ESCOBAR, N.; VALPUESTA, V. Proteomic analysis of strawberry achenes reveals active synthesis and recycling of L-ascorbic acid. **Journal of Proteomics** v.83, n.27, p.160-179, 2013.

ARANHA, F. Q.; BARROS, Z.; FARIAS, M. L.; ASCIUTTI, S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista Nutrição Campinas** v.13, n.2, p.89-97, 2000.

ARNON, D. I. Copper enzyme in isolated chloroplast. **Plant Physiology** v.24, n.1, p.1-15, 1949.

ASSIS, S. A.; FERNANDES, F. P.; MARTINS, A. B. G.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits** v.63, n.2, p. 93-101, 2008.

AWAD, M.A.; JAGER, A. D.; PLAS, L. H. V. D.; DER KROL, A.R.V.D. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of “Elstar” and “Jonagol” apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae** v.90, n.1-2, p.69-83, 2001.

BAGINSKY, C.; PENA-NEIRA, A.; CÁCERES, A.; HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I.; MORALES, H.; PERTUZÉ, R. Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. **Journal of Food Composition and Analysis** v.31, n.1, p.1-6, 2013.

BECERRA D. C.; FORERO A. P.; GÓNGORA G.A. Age and physiological conditions of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. flavicarpa. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.79, n.1, p.87-90, 2004.

BOMTEMPO, L. L. **Aminas bioativas em Maracujá: influência da espécie, das condições edafoclimáticas e do amadurecimento.** 79p. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) Belo Horizonte: UFMG/Departamento de Farmácia, 2011.

BRAGA, M. F.; BATISTA, A. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, E. C. S.; SANTOS F. C. **Características agrônômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip)** cultivado no Distrito Federal. IN.: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA M.F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. IV Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.230, 2005.

BREINHOLT, V.; SCHIMERLIK, M.; DASHWOOD, R.; BAILEY, G. Mechanism of chlorophyll in anticarcinogenesis against aflatoxin B₁, complex formation with the carcinogen. **Chemical Research in Toxicology** v.8, n.1, p.506-514, 1995.

BUTT, V. S. Direct oxidases and related enzymes. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise.** New York: Academic, v. 2, p. 81-123, 1980.

CAHYANA, A. H.; SHUTO, Y.; KINOSHITA, Y. Antioxidative activity of porphyrin derivatives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** v.57, n.4, p.680-681, 1993.

CARDOZO K. H. M.; GUARATINI T.; BARROS M. P.; FALCÃO V. R.; TONON A. P.; LOPES N. P.; CAMPOS S.; TORRES M. A.; SOUZA A. O.; COLEPICOLA P.; PINTO E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** v.146, n.1, p.60-78, 2007.

CARVALHO-OKANO, R.M. & VIEIRA, M. F. Morfologia externa e taxonomia. In: BRUKNER, C. H. & PIKANÇO, M. C. **Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.472, 2001.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **The Lancet** v.344, n.8926, p.862-863, 1994.

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora**. Madrid: FONTQUERIA, XLV, p.92, 1997.

CHERNORMORSKY, S.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R.D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis** v.19, n.1, p.313-322, 1999.

CHO, K.M.; HA, T.J.; LEE, Y. B.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; RYU, H. W.; JEONG, S. H.; KANG, Y.M.; LEE, J.H. Soluble phenolics and antioxidant proprieties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours. **Journal of Functional Foods** v.5, n.3, p.1065-1076, 2013.

CHOUGUI, N.; TAMENDJARI, A.; HAMIDJ, W.; HALLAL, S.; BARRAS, A.; RICHARD, T.; LARBAT, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. **Food Chemistry** v.139, n.91-4, p.796-803, 2013.

CIGANDA, V.; GITELSON, A.; SCHEPERS, J. Vertical profile and temporal variation of chlorophyll in maize canopy: quantitative "crop vigor" indicator by means of reflectance-based techniques. **Agronomy Journal** v.100, n.1, p.1409-1417, 2008.

COCETTA, G.; KARPPINEN, K.; SUOKAS, M.; HOHTOLA, A.; HAGGMAN, H.; SPINARDI, A.; MIGNANI, I.; JAAKOLA, L. Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) fruit development. **Journal of Plant Physiology** v.169, n.11, p. 059-1065, 2012.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; DE LIMA, T. C. M.; DA CUNHA, A. P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research** v.20, n.12, p.1067-1073, 2006.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International** v.44, n.1, p.2047–2053, 2011.

COSTA, A. M. **Efeito células neuronais: Estudos em andamento na UFRJ**. In: II Workshop da Rede Passitec – Avanço tecnológico para uso funcional de *Passifloras* comerciais e silvestres, p.8, 2011.

COSTA, A. M., TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 475-506, 2005.

COSTA, A. M.; BRANDÃO, L. S.; VICENTINI, G. C.; FARIA, D. A.; GUIMARÃES, T. G.; COHEN, K. O. **Efeito da adubação fosfatada nas características físico-químicas de frutos de *Passiflora tenuifila***. 8o Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2009.

COSTA, P.; GONÇALVES, S.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; ROMANO, A. Accumulation of phenolic compounds in *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. **Food and Chemical Toxicology** v.57, n.1, p.69-74, 2013.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

CRUZ-RUS, E.; BOTELLA, M.; VALPUESTA, V.; GOMEZ-JIMENEZ, M.C. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. **Journal of Plant Physiology** v.167, n.9, p.739-748, 2010.

CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.) **Maracujá Produção: Aspectos Técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 104p. (Frutas do Brasil; 15), 2002.

DASHWOOD, R.H.; NEGISHI, T.; HAYATSU, H.; BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. Chemopreventive properties of chlorophylls

toward aflatoxin B: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. **Mutation Research** v.399, n.1, p.245-253, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica** v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DELLAPENNA, D. Carotenoid synthesis and function in plants: Insights from mutant studies in Arabidopsis. **Pure and Applied Chemistry** v.71, n.12, p.2205-2212, 1999.

DESAI, H.V.; MEHTA A.R. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. **Journal of Plant Physiology** v.199, n.1, p.45-53, 1985.

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

DONG, J.; WAN, G.; LIAN, Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. **Journal of Biotechnology** v.148, p.99-104, 2010.

DORNELAS, M.C. & VIEIRA, M.L.C. Tissue culture on species of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.36, p.211-7, 1994.

EDWARDS, M. M. Seed dormancy and seed environment internal oxygen relationship. In: HEYDECKER, W. (ed.). **Seed Ecology**. University Park: The Pennsylvania State University Press, p.169-188, 1973.

EINHELLING, F.A.; SCHON, M.K.; RASMUSSEM, J.A. Sinergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. **The Plant Journal** v.4, p.251-258, 1982.

FAWOLE, O. A.; OPARA, U. L. Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. Bhagwa). **South African Journal of Botany** v.85, p.23-31, 2013.

FAZIO, A.; PLASTINA, P.; MEIJERINK, J.; WITKAMP, R.F.; GABRIELE, B. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from southern Italy: fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. **Food Chemistry** v.140, n.4, p.817-824, 2013.

FERNANDEZ-OROZCO, R.; ROCA, M.; GANDUL-ROAS, B.; GALLARDO-GUERRERO, L. DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and

phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening. **Journal of Food composition and analysis** v.24, n.6, p.858-864, 2011.

FERREIRA, R. M. D. A.; AROUCHA, E. D. M. M.; SOUZA, P. A. D. S.; DE QUEIROZ, R. F. D.; FILHO, F. S. T. P. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável grupo verde de agricultura alternativa** v.4, n.2, p.13- 16, 2009.

FERRERES F.; SOUSA C.; VALENTÃO P.; ANDRADE P. B.; SEABRA, R.M.; IZQUIERDO, A. G. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.55, p.10187-10193, 2007.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p.181- 207, 1982.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ed. São Paulo: Livraria Atheneu, p.307, 1999.

FUJISAWA, M.; WATANABE, M.; CHOI, S.; TERAMOTO, M.; OHYAMA, K.; MISAWA, N. Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene crtB. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v.105, n.6, p.636-641, 2008.

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

GENTILE, J. M., GENTILE, G. J. The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts, the relationship between mutagenicity and antimutagenicity. **Mutation Research** v.250, p.79-86, 1991.

GHASEMNEZHAD, M.; SHERAFATI, M.; PAYVAST, G. A. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of Five coloured Bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. **Journal of Functional Foods** v.3, n.1, p.44-49, 2011.

GROSS, J. Carotenoid pigments in *Citrus*. In: NAGG, S.; SHAW, P.; VELDHUIS, M., (eds.) **Citrus Science and Technology** p.302, 1977.

GRUZ, J.; AYAZ, F. A.; TORUN, H.; STRNAD, M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*mespilus germanica* L) fruit at different stages of ripening. **Food chemistry** v.124, n.1, p.271- 277, 2011.

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

HALLBERG, L.; HULTHEN, L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. **American Journal of Clinical Nutrition** v.71, p.1147–60, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, p.851, 2007.

HANNOUFA, A.; HOSSAIN, Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v.1, p.198-202, 2012.

HARBORNE J.B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992, **Phytochemistry** v.55, p.481–504, 2000.

HE, L.; XU, H.; HE, X. L. W.; YOUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC-ABTS+ assay. **Food Research International** v.44, n.5, p.1161-1167, 2011.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.13, n.1, p.572-584, 2002.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense** v.23, n.3, p.418-24, 2004.

HISCOX, J. D.& ISRAELSTAM, G. F.A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany** v.57, p.1332 – 1334. 1979.

HOEHNE, F. C. **Botânica e agricultura no Brasil (Século XVI)**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, Brasileira v.71, 5ª Série, p.410, 1937.

ISUTSA D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae** v.99, n.3-4, p. 395-400, 2004.

JACQUES, A. C. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv.TUPY**. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia Industrial). Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2009.

JAN, S.; KHAN, M. R.; RASHID, U.; BOKHARI, J. Assessment of antioxidant potencial, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothecha buxifolia* fruit. **Osong Public Health and Research Perspectives** v.4, n.5, p. 246-254, 2013.

JOHN, J. H.; ZIEBLAND, S.; YUDKIN, P.; ROE, L. S.; NEIL, H. A. W. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. **The Lancet** v.359, p.1969–1974, 2002.

JORGE, N.; MALACRIDA, C. R.; ANGELO, P. M.; ANDREO, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical** v.39, n.4, p.380-385, 2009.

JUHLER R. K.; ANDREASSON E.; YU, S. G.; ALBERTSSON P. K. Composition of photosynthetic pigments in thylakoid membrane vesicles from spinach. **Photosynthesis Research** v.35, n.2, p.171-8, 1993.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNATTI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência à doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 80-108, 2005.

KAWATA K.; USHIDA C.; KAWAI F.; KANAMORI M.; KURYAMA A. Micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology** v.147, n.2, p.281-284, 1995.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry** v.81, p.231-326, 2003.

KIM, S. H.; AHN, Y. O.; AHN, M.; HEONG, J. C.; LEE, H.; KWAK, S. Cloning and characterization of an Orange gene that increases carotenoid accumulation and salt stress tolerance in transgenic sweet potato cultures. **Plant Physiology and Biochemistry** v.70, p. 445-454, 2013.

KIM, S. H.; AHN, Y. O.; AHN, M.; LEE, H.; KWAK, S. Down-regulation of β -carotenohidroxilase increases β -caroteno e total carotenoids enhancing

salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweet potato. **Phytochemistry** v.74, 69-78, 2012.

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry** v.66, p.1003-1010, 1994.

KUBOLA, J.; SIRIAMORNUN, S. Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). **Food Chemistry** v.127, n.3, p.1138-1145, 2011.

KULL, O. Acclimation of photosynthesis in canopies: models and limitations. **Oecologia** v.133, p.267-279, 2002.

LARA, F. M.; JUNIOR, A. L. B.; BARBOSA, J. C. Preferência alimentar de *Dione Juno juno* (Cramer) por genótipos de maracujazeiro e avaliação do uso de extratos aquosos. **Scientia Agricola** v.56, n.3, p.665-671, 1999.

LE TUTOUR, B.; BRUNEL, C.; QUEMENEUR, F. Effect de synergie de La chlorophylle a sur les propriétés antioxydantes de la vitamine E. **New Journal of Chemistry** v.20, p.707-721, 1996.

LEE, J. H.; PARK, K. H.; LEE, M.; KIM, H.; SEO, W. D.; KIM, J. Y.; BAEK, I.; JAN, D.; HA, T. J. Identification, characterization, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. **Food Chemistry** v.136, n.2, p.843-852, 2013.

LESSERTOIS, D. MONEGER, R. Evolution des pigments pendant la croissance et la maturation du fruit *Prunus persica*. **Phytochemistry** v.17, p.411- 415, 1978.

LI, W.; BETA, T. An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canary seed. **Food Chemistry** v.133, n.3, p.782-786, 2012.

LIM, F. L.; YAM, M. F.; ASMAWI, M. Z.; CHAN, L. Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products** v.50, p.436-442, 2013.

LIMA, H. C.; CHAGAS, G. S.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, A. M.; CELESTINO, S. M. C.; COHEN, K. de O.; TERÁN-ORTIZ, G. P.; MALAQUIAS, J. V.; FARIA, D. A. **Indicadores de maturação para definição de ponto de colheita do maracujá selvagem (*Passiflora tenuifila*) cultivado na região de cerrado**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Frutas: saúde, inovação e responsabilidade. Natal: SBF: CD-ROM, 2010.

LODHI, M. A. K. Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its antoallelopathy. **Canadian Journal of Botany** v.57, p.1083-1088, 1982.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B. Phytochemical studies of drugs from *Passiflora edulis* Sims. Forma *flavicarpa*. **Herba Hungarica** v.15, n.2, p.7-11, 1976.

LUTOMSKI, J.; MALEK, B.; RYBACKA, L. Pharmacochemical investigation of the raw materials from *Passiflora* genus. II. The pharmacochemical estimation of juices from the fruits of *Passiflora edulis* and *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* (German). **Planta Medica** v.27, n.2, p.112-121, 1975.

MADOGGIO, F. A. **Investigação fitoquímica das partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition** v.79, p.727-47, 2004.

MAXWELL, A.; JONES, P.; BAKER, R.; RAGONE, D.; MURCH, S.J. Identification of pro-vitamin A carotenoi-rich cultivars of breadfruit (*Artocarpus*, Moraceae). **Journal of Food Composition and Analysis** v.31, n.1, p.51-61, 2013.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. da S. Melhoria genética do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, p. 55-78, 2005.

MELETTI, L. M. M.; BRÜCKNER, C. H. Melhoria Genética. In: BRÜCKNER, C.H.; PISCANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.

MERHY T. S. M.; VIANNA M. G.; GARCIA R. O.; PACHECO G.; MANSUR E. Cryopreservation of *Passiflora pohlii*- vitrification and encapsulation-vitrification. **Cryobiology** v.65, n.3, p.362-363, 2012.

MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J.L. C.; GASCUENA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of then grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis** v.19, n.6-7, p.687-693, 2006.

MONTEIRO, A. C. B.; NAKAZAWA, G. T.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. **Scientia Agricola** v.57, p.571-573, 2000.

MORETTI, C.L.; SARGENT, S. A.; HUBER, D. J.; CALBO, A. G.; PUSCHMANN, R. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v.123, n.4, p.656-660, 1998.

MOTILVA, M.; ROMERO, M. The effect of the ripening process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils. **Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention** v.1, p.59-68, 2010.

MOULEHI, I.; BOURGOU, S.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco and bitter organge *Citrus aurantium* L.) seed extracts. **Industrial Crops and Products** v.39, p.74-80, 2012.

MULLER, M. **Validação do efeito funcional**. In: II Workshop da Rede Passitec – Avanço tecnológico para uso funcional de *Passifloras* comerciais e silvestres, p.8, 2011.

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

NACZK M.; SHAHIDI F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.41, p.523-42, 2006.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.48, p.1150-1154, 2000.

NDOLO, V. U.; BETA, T. Distribution of carotenoids in endosperm, germ and aleurone fractions of cereal grain kernels. **Food Chemistry** v.139, n.1-4, p.663-671, 2013.

NIINEMETS, U. Photosynthesis and resource distribution through plant canopies. **Plant Cell & Environment** v.30, p.1052–1071, 2007.

NUNES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS A. M. M. B.; SARGENT, S. A. Physical and chemical quality characteristics of strawberries after storage are reduced by a short delay to cooling. **Postharvest Biology and Technology** v.6, p.17-28, 1995.

NUNES, E. C. *et al.* Micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). In: JAIN, S. M.; HÄGGMAN, H. (Ed) – **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer. v.27, p. 221 – 235, 2007.

NUR, I.; OKON, Y.; HENIS, Y. Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, poly-P-hydroxybutyrate, succinate oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasilense* Cd grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology** v.128, p.2937-2943, 1982.

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, n.4, p.303-306, 1984.

OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. (Eds). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 143-158, 2005.

OLSON J.A. Biological actions of carotenoids. **The Journal of Nutrition** v.119, n.1, p.94-95, 1989.

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.

PAJAK, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry** v.143, n.15, p.300-306, 2014.

PALACIO, L.; CANTERO, J. J.; CUSIDÓ, R.; GOLENIOWSKI, M. Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. Plant cell cultures and effect of precursor feeding. **Process Biochemistry** v.46, p.418-422, 2011.

PALACIO, L.; CANTERO, J. J.; CUSIDÓ, R.; GOLENIOWSKI, M. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science** v.193-194, p.1-7, 2012.

PAULA, M. S.; PEIXOTO, J. R.; FALEIRO F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA N. T. V. **Informações preliminares sobre enraizamento de estacas de espécies silvestres e comerciais de *Passiflora***. IN.: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. IV Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro. Planaltina- DF: Embrapa Cerrados, p.230, 2006.

PAULING, L. **Como viver mais e melhor: o que os médicos não dizem sobre sua saúde**. 4.ed. São Paulo : Best Seller, p.400, 1988.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L.A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnate* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis** v.15, n.4, p.241-248, 2004.

PEREIRA, T.A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: Avaliação de propriedades cosméticas da formulação**.p.119. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos) Ribeirão Preto, 2011.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos hidroalcoolicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.79, p.7-10, 1998.

PETRY, R. D. ; REGINATTO, F. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**. v.15, n.2, p.162-164, 2001.

PIETTA G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products** v.63, p.1035-42, 2000.

PINTO A. P. C.; MONTEIRO-HARA A. C. B. A.; STIPP L. C. L.; MENDES B. M. J. *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** v.46, p.28-33, 2010.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, v.5, p.90-94, 1978.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research** v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PRUTHI, J.S. Physiology, chemistry and technology of passion fruit. **Advances in Food Research** v.12, p.203-282, 1963.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology** v.545, n.1, p.51–64, 2006.

RANDHIR, R., PREETHI, S., KALIDAS, S. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry** v.37, p.1247-1256, 2002.

REGOLI, F. D.; PELLEGRINI, G.W.; WINSTON, S.; GORBI, S.; GIULIANI, C.; VIRNO-LAMBERTI, S. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Pollution Bulletin** v.44, p.912-922, 2002.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E.S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International** v.44, p.897-901, 2011.

RODRIGO, M. J.; ALQUÉZAR, B.; ALÓS, E.; LADO, J.; ZACARIAS, L. Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of *Citrus* Fruit. **Scientia Horticulturae** v.163, p.46-62, 2013.

RODRIGUEZ M.V.; SEVERIN C. R.; GIUBILETO G.; GATTUSO M.A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, A.O.; GATTUSO, S.J. Cultivo *in vitro* de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. **Acta Horticulturae** v.48, p.69-72, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Process, and Stored Foods**. Arlington: OMNI, p.88, 1997.

RUDNICKI, M.; DE OLIVEIRA, M. R.; VEIGA PEREIRA, T. D.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; FONSECA MOREIRA, J. C.

Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry** v.100, n.2, p.719-724, 2007.

SAKATA, K.; YAMAMOTO, K.; ISHIKAWA, H.; YAGI, A.; ETOH, H.; INA, K. Chlorophyllone-A, a new pheophorbide-A related compound isolated from *Ruditapes philippinarum* as an antioxidative compound. **Tetrahedron Letters** v.31, n.8, p.1165-1168, 1990.

SANTOCONO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; FEDELI, D.; FALCIONI, G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.88, n.1, p.1-10, 2007.

SANTOS K. C.; SANTOS, C. A. M.; OLIVEIRA, R. M. W. *Passiflora actinia* Hooker extracts and fractions induce catalepsy in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v.100, p.306–309, 2005.

SANTOS, F.C. Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC). p.55. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras, 2006.

SENGE, M. O.; WIEHE, A.; RYPPA, C. Synthesis, reactivity and structure of chlorophylls. In: GRUMM, B.; PORRA, R.J.; RÜDGER, W.; SCHEER, H. (Eds.) **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications**. Dordrecht: Springer Science, p. 27-37, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry** v.2015, n.2, p.213- 219, 1993.

SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P. V.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; CARMEN, L.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry** v.143, p.398–404, 2014.

SILVA, V. L.; COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de Micronutrientes - Vitamina C (ácido ascórbico). In: SILVIA MARIA FRANCISCATO COZZOLINO. (Org.). **Biodisponibilidade de Nutrientes 2o. ed. revisada e atualizada**. Barueri-SP: Editora Manole, v,1, p.305-324, 2007.

SIMKIN, A.J.; KUNTS, M.; MOREAU, H.; MCCARTHY, J. Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. **Plant Physiology and Biochemistry** v.48, n.6, p.434-442, 2010.

SIMÕES, C. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000.

SOLOVCHENKO, A. E.; AVERTCHEVA, O. V.; MERZLYAK, M.N. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in Apple fruit. **Postharvest Biology and Technology** v.40, n.2, p.183-189, 2006.

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

STREIT, M. N. *et al.* As clorofilas. **Ciência Rural** v.35, n.3, p.748-755, 2005.

TERADA, M.; WATANABE, Y.; KUNITOMA, M.; HAYASHI, E. Differential rapid analysis of ascorbic acid and ascorbic acid 2-sulfate by dinitrophenylhydrazine method. **Annals of Biochemistry** v.4, p.604-8, 1979

TOKUHISA, D. **Ocorrência e superação da dormência em sementes de mamão (*Caricapapaya* L.) em função da época de colheita dos frutos**. 64f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

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

VERMERRIS, W., NICHOLSON, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2008.

VVENDESKAYA, I.O.; VORSA, N. Flavonoid composition over fruit development and maturation in American canberry *Vaccinium macrocarpon* Ait. **Plant Science** v.167, n.5, p.1043- 1054, 2004.

WANG, Y.; LI, J.; XIA, R. Expression of chalcone synthase and chalconeisomerase genes and accumulation of corresponding flavonoids during fruit maturation of Guoqing no. 4 satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow). **Scientia Horticulturae** v.125, n.2, p.110-116, 2010.

WANG, Y.; LI, J., YANG, J.; XIA, R. Expression of lycopene cyclase genes and their regulation on downstream carotenoids during fruit maturation of Guoqing No. 1 Satsuma mandarin and Cara Cara navel orange. **Scientia Horticulturae** v.127, n.3, p.267-274, 2011.

WINTERGERST E.; MAGGINI S.; HORNIG D. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. **Annals of Nutrition & Metabolism** v.50, n.2, p.85-94, 2006.

WONDRACEK, D. C. **Caracterização e diversidade genética de acessos de maracujá do cerrado com base no perfil de carotenóides**. Dissertação (mestrado e Agronomia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2009.

YAHIA, E.Y.; CONTRERAS-PADILLA, M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and Bell pepper fruits during development, maturation and senescence. **LWT- Food Science and Technology** v.34, n.7, p.452-457, 2001.

YAMASHIRO, T.; LANDGRAFF, J. H. Maracujá-açu (*Passiflora alata*, Ait) porta-enxerto resistente à fusariose do maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*, Deg.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **Anais Congresso Brasileiro Fruticultura**. Pelotas: SBF, v.3, p. 918-921, 1979.

YOSHIKAWA, K.; KATSUTA, S.; MIZUMORI, J.; ARIHARA, S. New cycloartane triterpenoids from *Passiflora edulis*. **Journal of Natural Products** v.63, n.10, p.1377-1380, 2000.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research** v.379, n.2, 201-210, 1997.

ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I. M. C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007**.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A, Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dúbia*). **Food Chemistry** v.101, n.4, p.1526-1532, 2007.

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

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.; TEHRANI, P. 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.

ZUCARELLI, V.; FERREIRA, G.; AMARO, A. C. E.; FAZIO, J. L. GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina na germinação de sementes e emergência de plântulas de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.31, n.1, p. 216-223, 2009.