

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E**  
**BIOCIÊNCIAS**

**IGOR CHIARELLI PERDOMO**

**PRODUÇÃO DE FENÓLICOS, FLAVONOIDES E POTENCIAL**  
**ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE CALOS DE *Passiflora***  
***setacea* E *Passiflora tenuifila* (PASSIFLORACEAE) CULTIVADOS**  
***IN VITRO***

**FLORIANÓPOLIS**  
**2016**



Igor Chiarelli Perdomo

**PRODUÇÃO DE FENÓLICOS, FLAVONOIDES E POTENCIAL  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE CALOS DE *Passiflora*  
*setacea* E *Passiflora tenuifila* (PASSIFLORACEAE) CULTIVADOS  
*IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana.

Florianópolis  
2016

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

Chiarelli Perdomo, Igor  
Produção de fenólicos, flavonoides e potencial  
antioxidante de extratos de calos de *Passiflora setacea* e  
*Passiflora tenuifila* (Passifloraceae) cultivados in vitro  
/ Igor Chiarelli Perdomo ; orientadora, Ana Maria Viana -  
Florianópolis, SC, 2016.  
126 p.

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

Inclui referências

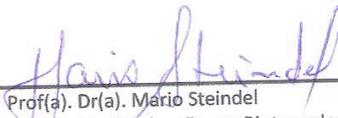
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Passiflora*. 3.  
Cultura de calos. 4. Compostos fenólicos. 5. Atividade  
antioxidante. I. Viana, Ana Maria. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**"Produção de fenólicos, flavonóides e potencial antioxidante de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae) cultivados *in vitro*"**

Por

**Igor Chiarelli Perdomo**

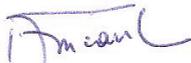
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (13/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



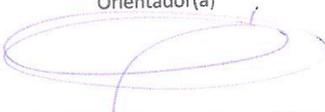
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Ana Maria Viana (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Eduardo da Costa Nunes (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina)



Dr(a) Ines Maria Costa Brighente (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carlos Henrique Lemos Soares (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 08 de Abril de 2016.



## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa da minha formação, tanto acadêmica quanto humana, lembro-me de muitas pessoas que passaram na minha vida neste período, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente.

Em primeiro lugar, meus agradecimentos são dedicados a Deus, fonte de vida, que com seu amor nos dá esperança em um mundo mais justo, mais humano e mais fraterno. Reconheço que sem Ele não estaria aqui e concluindo esta etapa.

Meus agradecimentos especiais àqueles familiares que me apoiaram, incentivaram e investiram no meu sonho, à minha mãe, meu pai, meu irmão e meus avós.

Agradeço enormemente à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Viana, do Laboratório de Fisiologia Vegetal (BOT, UFSC), que me apoiou e me acolheu no seu grupo de pesquisa, que dedicou o seu tempo e a mim confiou este trabalho; à Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente, do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPQN, QMC, UFSC), que me co-orientou nas análises químicas e de atividade antioxidante dos calos e a todos dos demais componentes dos grupos de pesquisa de ambos os laboratórios, que me auxiliaram na execução desse trabalho.

Agradeço a todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender e que me instigaram e fomentaram a formação do meu conhecimento. Àqueles que me deram oportunidades de aprender novas técnicas, espaço em seus projetos, e à atenção por eles dedicada.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pública e gratuita e de qualidade, que me ofereceu a oportunidade de me formar no curso de Biotecnologia, sendo da primeira turma da região Centro Oeste, com os melhores profissionais da área de Biotecnologia, aos quais eu devo toda a minha formação profissional.

À Universidade Federal de Santa Catarina e seus funcionários pela oportunidade, aprendizado e estrutura oferecidos.

Ao Governo Federal, que por meio do CNPq e da CAPES que me concederam 6 anos de bolsa, desde a graduação, incentivando o meu desenvolvimento profissional e pessoal, pelas pesquisas desenvolvidas neste período, principalmente a oportunidade concedida, graduação

sanduíche, em que tive chance de estudar em uma das instituições mais conceituadas no mundo, Politecnico di Milano, além de oportunizar a realização do estágio na Università degli Studi di Milano, assim como todas as experiências vividas neste período.

Agradeço também aos amigos que conquistei e estiveram presentes nesta jornada, aos colegas e à todos aqueles que fizeram parte dos grupos de pesquisa em que participei.

Agradeço à banca examinadora, pelas contribuições ao trabalho aqui apresentado.

**“Una volta che avrete imparato a Volare,  
camminerete sulla terra guardando  
il cielo perchè è là che siete stati  
ed è là che vorrete tornare”.**

Da Vinci, Leonardo



## RESUMO

*Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC. são espécies endêmicas dos biomas brasileiros Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (*P. setacea* DC.) e foram selecionadas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados, visando o desenvolvimento tecnológico para uso funcional das *Passifloras* silvestres. O objetivo desse trabalho foi determinar a atividade antioxidante e os conteúdos de fenólicos totais e flavonoides de extratos de calos de diferentes idades, originados de diferentes tipos de explantes. Os calos de *P. setacea* foram produzidos a partir de explantes de segmentos de raiz, hipocótilo, cotilédone, nó cotiledonar e nó foliar de plântulas de 8 semanas de idade, e de segmentos de caule de microplantas cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2% de Phytigel e 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Os calos de *P. tenuifila* foram produzidos a partir do cultivo de sementes em desenvolvimento, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 0,2% de Phytigel, e de segmentos de caules de microplantas cultivados em 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA, 0,2% de Phytigel. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e umidade relativa de 70%. Uma vez estabelecidos os calos foram submetidos às análises de crescimento, macerados e submetidos à extração por exaustão em etanol 96% por 21 dias. Os extratos foram evaporados, até a secagem e analisados quanto ao rendimento. Os extratos foram analisados colorimetricamente quanto à capacidade sequestradora de radicais livres, pelo método do DPPH e quanto ao poder redutor, com base na redução do íon férrico. Os melhores rendimentos dos extratos ocorreram aos 30 dias, em calos de nó foliar de *P. setacea* (39,1%) e aos 45 dias, em calos de sementes imaturas (16,5%) de *P. tenuifila*. As maiores atividades antioxidantes, detectadas pelo método do DPPH, ocorreram em calos de 30 dias de nó cotiledonar de *P. setacea* (70,58%) e em calos de caule em frutose de 45 e 60 dias de *P. tenuifila* (59,93% e 60,88%). Os maiores valores de poder redutor foram observados em calos de nó cotiledonar de 45 dias de *P. setacea* (361,39 mg Eq AA/g extrato seco) e em calos de caule em sacarose de 45 dias de *P. tenuifila* (287,45 mg Eq AA/g extrato seco). Os maiores conteúdos de fenólicos totais ocorreram em calos de 30 dias de nó cotiledonar (43,73 mg Eq AG/g extrato seco) e em calos de caule em frutose, de 45 e 60 dias e em calos de sementes imaturas de 60 dias

(25,80 mg Eq AG/g extrato seco). Os maiores níveis de flavonoides totais foram detectados em calos de 30 dias de nó foliar de *P. setacea* (5,49 mg Eq Q/g de extrato seco), apesar de não diferir dos demais tipos de calos, e em calos de sementes imaturas de 45 dias de *P. tenuifila* (4,77 mg Eq Q/g de extrato seco). Calos de nó cotiledonar de *P. setacea* e de caules em frutose de *P. tenuifila* apresentaram os máximos valores de atividade antioxidante e de teores de fenólicos totais. As análises indicaram que os níveis de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante variaram com a espécie, com o tipo de explante e com a idade dos calos. Esses resultados permitiram definir, para cada espécie e tipo de calo, a idade da cultura de calos ideal para otimizar a biossíntese de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, confirmando o potencial de utilização das culturas celulares em futuras aplicações de abordagens biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.

**Palavras-chave:** Passiflora, cultura de calos, fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

*Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC are endemic of the Brazilian biomas Cerrado, Atlantic Forest and Caatinga (*P. setacea* DC.) and 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 the determination of antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of extracts from *in vitro* calluses at different age, originated from different explant types. Calluses of *P. setacea* were produced from root, hypocotyl, cotyledon, cotyledonary and leaf nodal segments from 8-week-old seedlings and from stem segments of *in vitro* microplants cultured on Murashige & Skoog basal medium supplemented with 88.5 mM sucrose, 0.2% Phytigel and 2.5  $\mu$ M 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  $\mu$ M NAA. Cultures were kept at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , under a 16/8 light/dark photoperiod and 70% relative umidity. Once established calluses were submitted to growth analysis, macerated and extracted with 96% ethanol for 21 days. The extracts were evaporated to dryness and analyzed for yield. The extracts were analyzed collorimetrically for their free radical scavenging capacity, using the DPPH assay and the reducing power, based in the reduction of the ferric ion. The best extract yielding occurred in 30 day old leaf node calluses of *P. setacea* (39.1%) and in 45 day old calluses derived from immature seeds (16.5%) of *P. tenuifila*. The highest antioxidant activity detected by the DPPH assay occurred in 30 day old cotyledonary node calluses of *P. setacea* (70.58%) and in 45 and 60 day old stem derived callus of *P. tenuifila* grown in fructose (59.93% e 60.88%). The highest reducing power was observed in 45 day old cotyledonary node calluses of *P. setacea* (361.39 mg Eq AA/g dry extract) and in 45 day old stem derived calluses of *P. tenuifila* (287.45 mg Eq AA/g dry extract) grown in sucrose. Higher total phenolic content occurred in 30 day old cotyledonar node calluses of *P. setacea* (43.73 mg Eq AG/g dry extract) and in 45 e 60 day old stem derived calluses grown in fructose and in 60 day old calluses derived from immature seeds of *P. tenuifila* (25.80 mg Eq AG/g dry extract). The highest flavonoid levels were detected in 30 day old leaf node callus of *P. setacea* (5.49 mg Eq Q/g dry extract), although it did not differ from the other callus type, and in 45 day old callus derived

from immature seed of *P. tenuifila* (4.77 mg Eq Q/g dry extract). Cotyledonary node calluses of *P. setacea* and stem derived calluses of *P. tenuifila* grown in fructose showed the highest antioxidant activity and total phenolics at the same culture time. The analysis carried out have shown the levels of phenolics, flavonoids and antioxidant activity varied according to species, with the explant type and the calluses culture age. These results allowed the establishment, for each species and for each callus type, the ideal callus culture age to optimize the biosynthesis of phenolics, flavonoids and antioxidant activity, confirming the potential use of cell cultures as tools for further application of biotechnological approaches for secondary metabolite production.

**Key Words:** Passiflora, callus culture, total phenolics, flavonoids, antioxidant activity

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fluxograma das vias de biossíntese dos metabólitos secundários .....	10
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do composto fenólico simples .....	14
<b>Figura 3.</b> Esqueleto básico dos flavonoides .....	15
<b>Figura 4.</b> Relação entre massa seca e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo de calos de <i>P. setacea</i> ....	37
<b>Figura 5.</b> Relação entre massa seca e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo de calos de <i>P. setacea</i> .....	38
<b>Figura 6.</b> Relação entre massa seca e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo de calos de <i>P. tenuifila</i> ....	44
<b>Figura 7.</b> Relação entre rendimento e massa seca/massa fresca e entre rendimento e massa seca de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	48
<b>Figura 8.</b> Relação entre rendimento e massa seca/massa fresca e entre rendimento e massa seca de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	49
<b>Figura 9.</b> Correlação entre rendimento e massa seca/massa fresca e entre rendimento e massa seca de extratos de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	51
<b>Figura 10.</b> Reação de redução do radical DPPH por compostos fenólicos. ....	52
<b>Figura 11.</b> Relação entre poder redutor e tempo de cultivo e entre atividade sequestradora de DPPH e tempo de cultivo de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	64
<b>Figura 12.</b> Relação entre poder redutor e tempo de cultivo e entre atividade sequestradora de DPPH e tempo de cultivo de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	65
<b>Figura 13.</b> Relação entre poder redutor e tempo de cultivo e entre atividade sequestradora de DPPH e tempo de cultivo de extratos de calos <i>P. tenuifila</i> .....	66
<b>Figura 14.</b> Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio.....	71
<b>Figura 15.</b> Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo e entre flavonoides e tempo de cultivo de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	77
<b>Figura 16.</b> Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo e entre flavonoides e tempo de cultivo de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	78
<b>Figura 17.</b> Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo e entre flavonoides e tempo de cultivo de extratos de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	79



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa fresca, de calos de <i>Passiflora setacea</i> .....	32
<b>Tabela 2.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa seca, de calos de <i>Passiflora setacea</i> .....	33
<b>Tabela 3.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os teores de água de calos de <i>Passiflora setacea</i> .....	33
<b>Tabela 4.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os valores de razão entre massa seca/massa fresca de calos de <i>Passiflora setacea</i> .....	34
<b>Tabela 5.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa fresca, de calos de <i>Passiflora tenuifila</i> .....	40
<b>Tabela 6.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa seca, de calos de <i>Passiflora tenuifila</i> .....	40
<b>Tabela 7.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os teores de água de calos de <i>Passiflora tenuifila</i> .....	41
<b>Tabela 8.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a razão massa seca/massa fresca de calos de <i>Passiflora tenuifila</i> . .....	42
<b>Tabela 9.</b> Rendimento de extratos de <i>Passiflora setacea</i> oriundos de diferentes calos e tempos de cultivo.....	46
<b>Tabela 10.</b> Rendimento de extratos de <i>Passiflora tenuifila</i> oriundos de diferentes calos e tempos de cultivo.....	46
<b>Tabela 11.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a atividade antioxidante de calos de <i>P. setacea</i> .....	53
<b>Tabela 12.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a atividade antioxidante de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	54
<b>Tabela 13.</b> Concentração Efetiva 50 de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> .....	56
<b>Tabela 14.</b> Concentração Efetiva 50 de extratos de calos <i>Passiflora tenuifila</i> .....	56
<b>Tabela 15.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o poder redutor de extratos de calos de <i>P. setacea</i> .....	58
<b>Tabela 16.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o poder redutor de extratos de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	59
<b>Tabela 17.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de fenólicos totais de calos de <i>P. setacea</i> .....	68
<b>Tabela 18.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de fenólicos totais de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	69
<b>Tabela 19.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de flavonoides de calos de <i>P. setacea</i> .....	72

<b>Tabela 20.</b> Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de flavonoides de calos de <i>P. tenuifila</i> .....	73
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2,4-D** – Ácido diclorofenoxiacético  
**°C** – Graus Celsius  
**AA** – Ácido ascórbico  
**AG** – Ácido gálico  
**AIB** – Ácido indolbutírico  
**AlCl<sub>3</sub>** – Cloreto de alumínio  
**ANA** – Ácido  $\alpha$ -naftalenoacético  
**BHA** – Butilhidroxianisol  
**BHT** – Butilhidroxitolueno  
**CE 50** – Concentração Efetiva 50%  
**cm** – Centímetro  
**cot** – Cotilédone  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**DPPH** – 2,2 difenil-1, picrilhidrazil  
**Eq** – Equivalentes em  
**FeCl<sub>3</sub>** – Cloreto de ferro  
**Fru** – Frutose  
**g** – Grama  
**g/L** – Gramas por litro  
**H** – Hidrogênio  
**HCl** – Ácido clorídrico  
**hipoc** – Hipocótilo  
**L** – Litro  
 **$\mu$ g** – Micrograma  
 **$\mu$ L** – Microlitro  
 **$\mu$ M** – Micromolar  
**M** – Molar  
**Mf** – Massa Fresca  
**mM** – Milimolar  
**mm** – Milímetro  
**Ms** – Massa Seca  
**MS** – MeioMurashige&Skoog  
**m/v** – Massa por volume  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de sódio  
**nc** – Nó cotiledonar  
**nf** – Nó foliar  
**nm** – Nanômetro  
**PAL** – Fenilalanina Amônia Liase  
**PEP** – Ácido fosfoenolpiruvato

**PG** – Galato de propila  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**Phe** – Fenilalanina  
**Q** – Quercetina  
**sac** – Sacarose  
**sv** – Semente imatura  
**TBHQ** – *terc*-butilhidroquinona  
**Trp** – Triptofano  
**Tyr** – Tirosina  
**UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Passiflora (<i>Passifloraceae</i>).....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Importância econômica, farmacológica e uso medicinal de Passifloras.....	4
2.1.2 Importância das Passifloras silvestres .....	5
<b>2.2 Metabólitos secundários de plantas.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Radicais livres .....	10
2.2.2 Antioxidantes .....	11
2.2.3 Compostos Fenólicos .....	13
2.2.4 Flavonoides .....	14
<b>2.3 Biotecnologia, multidisciplinaridade e áreas.....</b>	<b>16</b>
2.3.1 Biotecnologia vegetal.....	17
2.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de calos .....	18
2.3.3 Biotecnologia de Passifloras para produção de metabólitos secundários .....	19
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Material vegetal.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Métodos.....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Preparação do meio de cultura .....	23
4.2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de plantas axênicas e de calogênese em <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i> .....	24
4.2.3 Determinação do teor de água dos calos .....	26
4.2.4 Preparação dos extratos vegetais.....	27
4.2.5 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH .....	27
4.2.6 Determinação do potencial redutor .....	28
4.2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	29
4.2.8 Determinação do teor de flavonoides.....	30
4.2.9 Análise estatística .....	30

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o crescimento <i>in vitro</i> de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>31</b>
5.1.1 <i>Passiflora setacea</i> .....	31
5.1.2 <i>Passiflora tenuifila</i> .....	39
<b>5.2 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o rendimento de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre a atividade antioxidante de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>5.4 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o poder redutor de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Comparação entre os padrões de variação da atividade antioxidante e pelo poder redutor, de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i> em função do tipo de explante e tempo de cultivo.....</b>	<b>61</b>
<b>5.6 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o teor de compostos fenólicos totais de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>5.7 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o teor de flavonoides de extratos de calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>5.8 Comparação entre os padrões de variação de fenólicos totais e flavonoides com o tempo de cultivo dos calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>5.9 Comparação entre os padrões de variação de poder redutor, atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides com o tempo de cultivo dos calos de <i>Passiflora setacea</i> e <i>Passiflora tenuifila</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* representa o maior e mais importante grupo da família Passifloraceae, com 142 espécies com ocorrência no Brasil, sendo que 83 destas são endêmicas, fazendo com que o país esteja em uma posição privilegiada em relação aos recursos genéticos deste gênero. Muitas espécies deste gênero se destacam pela qualidade de seus frutos, pelas propriedades nutricionais, farmacológicas e ornamentais e algumas delas por apresentar propriedades medicinais, como efeito calmante e indutor de sono, a partir das quais são formulados fitoterápicos e medicamentos para o tratamento de vários distúrbios, como ansiedade, enxaqueca, insônia e nervosismo. As espécies deste gênero apresentam ainda, a ação diurética, analgésica, antitumoral, antimicrobiana e também efeitos positivos na aplicação em tratamentos de toxicodependentes, de obesidade, de algumas infecções, sintomas da menopausa e diversos distúrbios nervosos. Estas atividades podem ser devido a seus metabólitos secundários.

São considerados fitoconstituintes majoritários de espécies de *Passiflora*: flavonoides, glicosídeos, alcaloides e compostos voláteis. Dentre os principais flavonoides descritos neste gênero estão: chaftósido, isochoaftósido, isovitexina, orientina e vitexina. Os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, são conhecidos pela capacidade antioxidante, pois podem estabilizar ou desativar a ação dos radicais livres, atuando contra processos oxidativos que ocorrem no organismo. Os antioxidantes possuem diversas aplicações, que variam desde retardar a deterioração de alimentos, cosméticos, biocombustíveis até a prevenção e tratamento de diversas doenças.

A bioprospecção é uma atividade exploratória, que visa identificar os componentes do patrimônio genético, que produzem moléculas com potencial aplicação industrial ou comercial, a partir dos atributos funcionais. Uma das mais ricas fontes para a bioprospecção de biomoléculas é a flora, principalmente a do Brasil, reconhecida como a mais rica, diversa e importante, no mundo e nesse sentido, a grande diversidade genética de espécies de passifloras silvestres nativas representa um potencial a ser explorado. *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuiflora* são exemplos de espécies silvestres, cujos potenciais de utilização na produção de frutos de maior qualidade, como fontes de genes de resistência à doenças e no uso funcional e medicinal, por possuírem características bioquímicas, toxicológicas e medicinais de

interesse, foram constatados pelos estudos realizados pela Embrapa Cerrados.

As técnicas de cultura de células vegetais *in vitro* têm sido empregadas, nas últimas décadas, para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários de várias espécies de plantas, pois possibilitam a otimização da produção de biomassa e da produção dos compostos de interesse, em condições controladas. Vários fatores biológicos (tipos e condição fisiológica dos explantes, características genéticas), fatores químicos (composição salina do meio de cultura, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, composição, reguladores de crescimento) e fatores físicos (temperatura, intensidade luminosa, irradiação UV, fotoperíodo) podem ser manipulados para otimizar a produção *in vitro* de metabólitos secundários, minimizando a exploração extrativista *in situ* e contribuindo, inclusive, para a conservação de germoplasma. Entretanto, são poucos os trabalhos disponíveis sobre o potencial de produção de metabólitos secundários por culturas de calos e suspensões celulares, desenvolvidos com Passifloras.

Nesse contexto, o presente estudo visou gerar conhecimentos sobre a influência dos tipos de explantes e do tempo de cultivo na produção de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante por sistemas de culturas de calos de *Passiflora setacea* e de *Passiflora tenuifila*, permitindo 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.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Passiflora* (*Passifloraceae*)

A família Passifloraceae possui aproximadamente 700 espécies (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007; MABBERLEY, 2008) e é conhecida devido à exuberância de suas flores e ao misticismo religioso em relação a sua morfologia. Compreende um total de 19 gêneros, dos quais 4 ocorrem no Brasil.

Esta família possui distribuição predominantemente pantropical e subtropical, concentrada na região neotropical, sendo que a maior parte das espécies são originárias do continente Americano, principalmente América Central e do Sul, enquanto apenas uma pequena parte destas são provenientes da Oceania, do Sudeste Asiático e da África tropical (MACDOUGAL & FEUILLET, 2004). O principal gênero de Passifloraceae é *Passiflora*, pois é o maior e o mais importante economicamente.

O gênero *Passiflora* compreende mais de 525 espécies (ULMER *et al.*, 2004), na sua maioria com porte de trepadeiras e lianas, mas também podem apresentar-se como arbustos, árvores e herbáceas perenes e anuais. Este gênero possui 142 espécies com ocorrência no Brasil (CERVI, 2006), sendo que 83 destas são endêmicas, fazendo com que o país esteja em uma posição privilegiada em relação aos recursos genéticos deste gênero (BERNACCI *et al.*, 2016).

O nome da família e do gênero é derivado do latim, o qual significa ‘flor da paixão’, sendo uma alusão às partes das folhas e flores da primeira espécie de *Passiflora*, a *P. incarnata*, descoberta por jesuítas espanhóis no México, a qual já era cultivada pelos Astecas (KILLIP, 1938). Em 1610, o padre italiano Giacomo Bosio descreveu em “*Della trionfante e Gloriosa Croce*” a planta, *P. incarnata* como imagem viva da paixão de Cristo, morfologicamente, os 3 estigmas representando os 3 pregos, as 5 anteras simbolizando as 5 feridas, os filamentos coronais da flor como a coroa de espinhos e a folha trilobada correspondendo a Santíssima Trindade. O fruto se tornou conhecido, no exterior, como “*passionfruit*”, fruto da paixão.

As espécies do gênero *Passiflora* são popularmente conhecidas no Brasil como maracujá, nome de origem indígena, de etnias de Tupis Guaranis, derivado da palavra “*marakuia*”, que significa ‘alimento em formato de cuia’ (SOUZA & MELETTI, 1997).

Estas espécies de maracujás possuem uma interação muito grande com espécies de mamangabas, abelhas do gênero *Bombus*, pois estas fazem a maior parte da polinização das flores de passifloras (SUÁREZ, 2016). Porém, devido a mudanças climáticas e ao desmatamento, estas espécies polinizadoras estão desaparecendo, e os agricultores vem recorrendo à polinização manual (CERQUEIRA-SILVA *et al.*, 2015).

### **2.1.1 Importância econômica, farmacológica e uso medicinal de Passifloras**

A cultura do maracujá no Brasil utilizou, em 2014, uma área superior a 57.183 hectares, na qual se produziu um total de 823.284 toneladas do fruto (IBGE, 2014). O país é o maior produtor de maracujá do mundo, seguido pelo Equador, Peru, Colômbia, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália e mais outros cinco países (SOUZA, 2002). A maior parte desta produção é destinada ao consumo *in natura* da fruta.

O Brasil, além de maior produtor de maracujá, também é o maior consumidor da fruta, uma parte da produção desta cultura é processada e comercializada em forma de sucos, néctares, refrescos, doces e licores. As exportações de suco desta fruta vem aumentando consideravelmente, principalmente para países da União Europeia, Estados Unidos, Canadá e Japão (JÚNIOR, 2000)

A fruta também é utilizada em preparados lácteos, como iogurtes, sendo bem aceito pelo mercado consumidor (PAIVA, 1998). Se destaca a incorporação do maracujá em outras preparações alimentícias, principalmente por incluir-se na gama de produtos que contém baixo teor de açúcar, de fenilalanina, livre de gordura e de glúten (EPAMIG, 2000; KANUFRE, 2010; ZERAIK, 2010).

O processamento do maracujá gera uma quantidade grande de resíduos agroindustriais, principalmente a casca e sementes, que representam cerca de 65%-70% do peso do fruto, dependendo da espécie (DURIGAN & YAMANAKA, 1987). Como alternativa de aproveitamento dos subprodutos da produção de suco de maracujá, pode ser obtida a pectina, que por sua vez pode ser empregada na produção de geleias, doces e indústria farmacêutica, devido às altas concentrações de pectina presente na casca da fruta (CANTERI *et al.*, 2010).

As sementes do maracujá são consideradas uma fonte de óleos essenciais, onde o teor de óleo na semente é de aproximadamente de

25% (FERRARI, 2004). O óleo possui coloração amarela, sabor agradável e odor suave, e pode ser aplicado na indústria de alimentos e de cosméticos, em perfumes e aromas (BEDOUKIAN, 1980; FERRARI, 2004).

Os subprodutos desta indústria de processamento do maracujá também podem ser empregados na alimentação animal, principalmente de suínos, bovinos e aves de corte (ARAKAKI, 1977; JÚNIOR *et al.*, 2008). Outra aplicação destes subprodutos é na alimentação humana, como a utilização da casca para a fabricação de compotas, mas principalmente na forma de farinha, sendo esta fonte de fibras solúveis dietéticas e pode ser utilizada para o controle de diabetes, na confecção de alimentos funcionais (LEONEL *et al.*, 2008; ZERAIK, 2010).

O maracujá é conhecido etnofarmacologicamente como calmante e como um suave indutor de sono, o qual é utilizado principalmente como infusão das folhas de diversas espécies de passifloras. Benigni e colaboradores (1964) confirmaram os benefícios do uso das folhas de *P. edulis* no tratamento de vários distúrbios, tais como alcoolismo, ansiedade, enxaqueca, insônia e nervosismo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu e regulamentou em 2011 o uso de fitoterápicos no país, por meio do Formulário de Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. Esta edição regulamenta a prescrição de infusão de folhas secas de *Passiflora alata*, *Passiflora edulis* e *Passiflora incarnata* e também a prescrição de tintura alcoólica de folhas de *Passiflora edulis*, ambos indicados como ansiolítico e sedativo suave (BRASIL, 2011). O uso do extrato de folhas de *Passiflora* também tem demonstrado efeitos inibitórios no crescimento de linhagens celulares leucêmicas. Mostrou-se que 100 µg/ml de extrato de folhas da espécie de *P. alata* inibiram 60% do crescimento celular, num período de 72 horas de tratamento (OZAROWSKI *et al.*, 2013).

### **2.1.2 Importância das Passifloras silvestres**

A utilização de espécies de Passifloras silvestres tem aumentado devido aos conhecimentos das potencialidades nutricionais e terapêuticas, bem como das propriedades sensoriais destas espécies silvestres (COSTA *et al.*, 2005). Além do potencial consumo de frutos *in natura*, as espécies silvestres de maracujás são fontes de genes de resistência a doenças e patógenos, sendo importante para os programas

de melhoramento genético (SOZO, 2014). Um dos problemas para o melhoramento genético é obter espécies compatíveis, para que haja sucesso na obtenção de híbridos.

Em algumas espécies silvestres pode-se observar o comportamento de plantas de dias curtos, ou seja florescem também no inverno, sendo diferente dos maracujás comerciais, que florescem em dias longos, no verão, que atualmente sofrem com a sazonalidade. Outra característica observada em algumas *Passifloras* silvestres é o androginóforo mais curto, sendo menor a altura dos estigmas em relação à coroa, facilitando a polinização por insetos. Essas características são importantes para aumentar a produtividade, reduzir os custos relativos ao uso de defensivos e de mão de obra para polinização, que podem ser introduzidas nos maracujazeiros comerciais.

Algumas espécies de *Passifloras* silvestres estão na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 2014), classificadas nas categorias ‘criticamente em perigo’ e ‘em perigo’, devido ao desmatamento indiscriminado, principalmente da Mata Atlântica e do Cerrado, onde estas espécies se encontram. Estudos com *passifloras* silvestres vem sendo desenvolvidos, principalmente, devido a pesquisas da Rede Passitec, da qual este trabalho faz parte, visando o desenvolvimento tecnológico para uso funcional de *passifloras* silvestres (COSTA *et al.*, 2010; SOZO, 2014).

### **2.1.2.1 *Passiflora setacea***

A *Passiflora setacea* é uma espécie nativa e endêmica do Brasil, se distribui geograficamente pelos estados de Alagoas e Bahia na região Nordeste; Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso na região Centro-Oeste; Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro na região Sudeste (MILWARD-DE-AZEVEDO, 2007). Se faz presente nos seguintes biomas brasileiros: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005). A *P. setacea* é uma espécie heliófita, e pode ser comumente encontrada em florestas primárias, em capoeiras e em capoeirões e na restinga litorânea (CERVI, 2006).

Possui esta denominação por apresentar as estípulas em forma de seta, setáceas. Popularmente esta espécie é chamada de maracujá do sono e maracujá de veado, mas nos estados da Bahia e Rio de Janeiro também é conhecida por sururuca e maracujá sururuca.

A espécie possui o florescimento e a frutificação de setembro a maio. No estado de São Paulo há estudos demonstrando o florescimento precoce em relação ao maracujazeiro-amarelo e praticamente durante todo o ano. A *P. setacea* possui frutos grandes e comestíveis, de forma ovoide e globosa e flores de coloração branca (OLIVEIRA & RUGGIERO, 2005). Apresenta, ainda, frutos com características físico-químicas que atendem à necessidade da indústria, um sabor exótico e agradável, de suco doce-acidulado, possuindo boa perspectiva para a indústria alimentícia, como consumo *in natura* e/ou na forma de sucos, ou então pode ser utilizada para a fabricação de doces. Também possui potencial, para ser utilizada pela indústria farmacêutica, para a produção de suplementos, fármacos e fitoterápicos, e ainda na produção de cosméticos (SANTOS *et al.*, 2005).

Esta espécie vem se destacando como porta-enxerto, para espécies de maracujás comerciais, e por apresentar resistência à morte prematura, à *Fusarium oxysporum*, à *Meloidogyne incognita* e à *Dione junojuno* (MENEZES, 1994; JUNQUEIRA *et al.*, 2005, PAULA, 2006). Outras características importantes são também tolerância a bacterioses, à antracnose e à verrugose (JUNQUIERA *et al.*, 2005; PAULA, 2006).

A propagação de *P. setacea* é indicada a ser realizada por estaquia, uma vez que esta espécie, assim como a maioria das passifloráceas, apresenta baixos valores de germinação (SANTOS, 2006). Possui diferentes níveis de compatibilidade com outras passifloras, possibilitando que as características desta espécie sejam utilizadas em programas de melhoramento vegetal.

Após vinte anos de vários estudos realizados com esta espécie, pela Embrapa Cerrados, foi desenvolvida uma variedade, Pérola do Cerrado, a partir de policruzamentos de plantas selecionadas, visando aumentar a produtividade e o tamanho dos frutos. A variedade Pérola do Cerrado é a primeira oriunda de uma *Passiflora* silvestre, a ser registrada e protegida no Ministério da Agricultura, Pecuária, e Abastecimento. A variedade já encontra-se disponível para cultivo (SOZO, 2014). Estudos com cultivos celulares e de tecidos desta espécie são raros, apenas Sozo (2014) e Wolfart (2015), que precedeu esta pesquisa, realizaram estudos sobre o estabelecimento do cultivo *in vitro*, indução da calogênese e análises preliminares e metabólicos secundários.

### 2.1.2.2 *Passiflora tenuifila*

A *Passiflora tenuifila* é uma espécie nativa do Brasil, distribuída geograficamente pelos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo na região Sudeste; Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina na região Sul. Se faz presente nos seguintes biomas brasileiros: Cerrado, Mata Atlântica (BERNACCI *et al.*, 2016). A *P. tenuifila* é uma espécie heliófita e seletiva higrófila, pode ser encontrada em orlas de florestas, capoeiras e em capões de floresta de Araucária (CERVI, 2006).

A espécie possui esta denominação, derivada do latim, onde ‘*tenius*’ e ‘*filum*’ correspondem a delgado e fio, respectivamente, em alusão aos filamentos capilares da corona de filamentos. Popularmente, esta espécie é chamada de maracujá alho, mas, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, também é conhecida por maracujá de cobra. Encontrada também na Bolívia, Paraguai e Argentina, nestes países é conhecida por ‘*yogo*’. À primeira vista assemelha-se muito à *P. eichleriana*, porém diferencia-se facilmente pela corona.

No Brasil, a *P. tenuifila* possui florescimento de agosto a outubro, e frutificação de setembro a dezembro, já na Argentina é relatado uma floração de dezembro a março e frutificando a partir de março até julho. Possui frutos com coloração amarelo-alaranjada e polpa amarela, apresentam a maioria das características químicas favoráveis a sua aceitação pela indústria alimentícia, possuindo uma baixa acidez e um alto teor de sólidos solúveis, quando comparados a outras espécies de passifloras (COSTA *et al.*, 2009). Porém, as características físicas e sensoriais do fruto são inferiores àquelas apresentadas pelo maracujá amarelo. Possui importância para o melhoramento vegetal, por ser autocompatível, precoce e por apresentar boa resistência à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis*) e à verrugose (*Cladosporium herbarum*) (BRAGA *et al.*, 2005). Alguns dos poucos estudos com cultura de células e tecidos desta espécie foram os conduzidos por Sozo (2014) e Wolfart (2015), que precederam este trabalho.

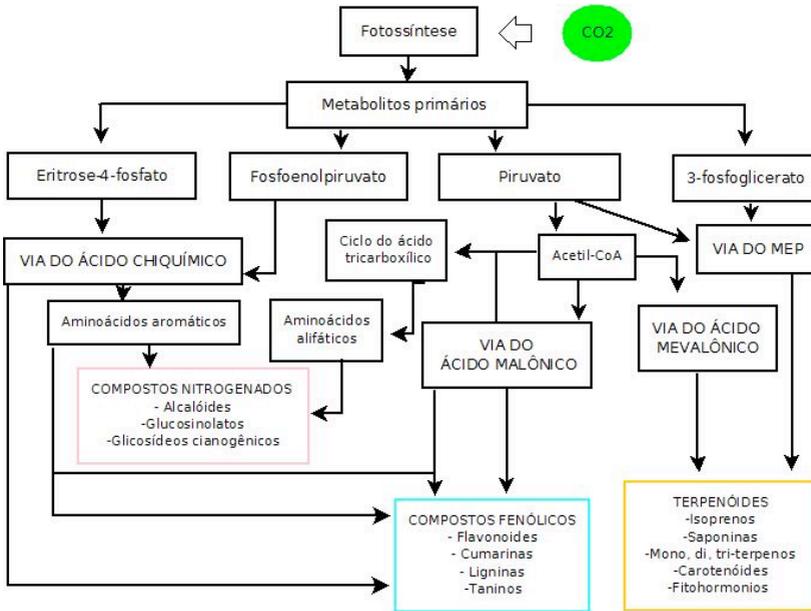
## 2.2 Metabólitos secundários de plantas

As plantas realizam uma série de processos metabólicos, sendo os metabólitos primários, os polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos

nucleicos os responsáveis pela manutenção do metabolismo celular. A partir dos processos de glicólise, ciclo de Krebs e via das pentoses fosfato, realizados a partir do metabolismo dos carboidratos, são produzidas as moléculas precursoras do metabolismo secundário dos vegetais (GOUVEA *et al.*, 2012; KATEROVA *et al.*, 2012). Embora os metabólitos secundários não contribuam diretamente para o crescimento e desenvolvimento da planta, são de extrema importância nas interações ecológicas com o ambiente, estando relacionados a processos de defesa da planta, contra ataques por herbívoros e patógenos e contra a radiação UV. Além disso, atraem agentes polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os compostos do metabolismo secundário das plantas são classificados em três grandes grupos: terpenóides, compostos nitrogenados (alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, aminoácidos não protéicos) e compostos fenólicos (BUCHANAN *et al.*, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2013; PAPASAVAS, 2014). A via de biossíntese dos metabólitos secundários se dá a partir do metabolismo da glicose, tendo compostos intermediários, como a eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato. A primeira é oriunda da via das pentoses fosfato e a segunda da via glicolítica. A condensação aldólica desses dois compostos forma o ácido chiquímico, precursor da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (Figura 1). O ácido chiquímico é combinado com a rota do ácido malônico, para sintetizar compostos fenólicos variados, tais como flavonoides, ligninas e taninos. Já o processo de biossíntese dos terpenos e dos esteroides ocorre por meio da condensação do piruvato com acetil-CoA, entrando na via do ácido mevalônico, e na via metileritritol fosfato (MEP). O 3-fosfoglicerato é catalisado somente pela via MEP, formando os terpenos (SIMÕES *et al.*, 2000; TAIZ & ZEIGER, 2013).

Durante séculos as civilizações vêm usando as plantas para fins medicinais, alimentícios, aromáticos e recreativos (SIDDIQUE *et al.*, 2013; CETIN, 2014). Essa vasta manipulação é atribuída às numerosas substâncias orgânicas naturalmente produzidas pelos vegetais. Cada composto, por sua vez, possui uma característica própria, podendo apresentar propriedades anti-inflamatórias, antiaterosclerose, antitumorais, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antibacterianas, antioxidantes e antivirais (GUEVEN & KNORR, 2011; TAKSHAK & AGRAWAL, 2014).



**Figura 1.** Fluxograma das vias de biossíntese dos metabólitos secundários (Adaptado de Verma & Shukla, 2015).

O potencial biológico atribuído aos metabólitos secundários tem sido amplamente explorado em espécies do gênero *Passiflora*, sobretudo devido a sua considerável diversidade de espécies e à presença de fitoconstituintes pertencentes aos grupos dos alcalóides, flavonoides C-glicosídeos, terpenoides e óleos essenciais (DHAWAN *et al.*, 2004). Pesquisas tem demonstrado que o extrato aquoso de folhas de *P. edulis* e *P. ligulares* possuem funções biológicas promissoras, atuando como agentes antioxidante e antibacteriano (AKANBI *et al.*, 2011; RAZIA *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Radicais livres

Os radicais livres são formados pelo metabolismo normal dos organismos, como na respiração celular e na fagocitose, e também por diversos fatores extrínsecos, como exposição a poluentes, a agentes químicos, à radiação, entre outros, associados à formação destes radicais livres conhecidos também por espécies reativas (SOARES, 2002;

LEITE & SARNI, 2003). Os radicais livres são definidos por possuírem um ou mais elétrons não pareados no átomo ou na molécula, aumentando sua reatividade química, conferindo uma grande instabilidade e a tendência em acoplar este elétron não pareado a outras estruturas próximas a sua formação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Estes radicais livres possuem o elétron desemparelhado, centrado principalmente no átomo de oxigênio (radicais livre de oxigênio, radical superóxido), mas também podem ter outras origens químicas, como derivado de nitrogênio, o radical peroxinitrito derivado do óxido nítrico (BARREIROS, 2006).

Os radicais livres lesam a célula diretamente ou indiretamente, danificando lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, tornando-a mais susceptível à degradação e a mutações (ARAÚJO, 2016). A ação destes radicais geram os estresses oxidativo e nitrosativo que estão intimamente ligados ao envelhecimento celular e à sinalização de processos inflamatórios (HARMAN, 2003), mas também está relacionada a diversas doenças, como tumores, hipertensão arterial, catarata, doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer, esclerose múltipla (SILVA & FERRARI, 2011). Estima-se que mais de 50 doenças estejam relacionadas à ação dos radicais livres (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

### 2.2.2 Antioxidantes

Substâncias que podem estabilizar ou desativar a ação dos radicais livres são conhecidas como antioxidantes. Os antioxidantes, mesmo presentes em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), são capazes de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos. São classificados em dois grupos, os primários e os secundários, segundo o mecanismo de ação (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; REISCHE, 2002).

Os antioxidantes primários (AH) são capazes de interromper a cadeia de radicais, doando átomos de hidrogênio ou elétrons a um radical livre ( $R\bullet$ ) ou a um radical peróxido ( $ROO\bullet$ ), assumindo a forma de radical estável ( $A\bullet$ ), como se pode ver no mecanismo de ação dos antioxidantes primários:



O radical é estabilizado por ressonância, não possuindo mais a capacidade de iniciar ou propagar reações oxidativas (REISCHE, 2002). Podem-se incluir neste grupo, os compostos fenólicos, que apresentam grupos doadores de elétrons nas posições orto e para, de sua cadeia cíclica (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; TIVERON, 2012).

Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação, podendo ser subdivididos ainda em:

- Sinérgicos, são compostos que possuem nenhuma ou pouca atividade antioxidante, mas quando combinados de forma adequada com antioxidantes primários podem aumentar a atividade. O ácido ascórbico e o ácido tartárico são como bons exemplos de antioxidantes sinérgicos. Alguns antioxidantes primários, quando combinados, também podem gerar um efeito sinérgico (REISCHE, 2002; SHAHIDI, 2005);

- Removedores de oxigênio, são substâncias que atuam sequestrando o oxigênio do meio, por meio de reações químicas estáveis, indisponibilizando a ação do átomo, como propagador da autoxidação. O ácido ascórbico, outros ascorbatos, sulfitos e eritorbatos são exemplos desses compostos (SHAHIDI, 2005; RAMALHO, 2006);

- Quelantes, são agentes capazes de complexar íons metálicos, principalmente de cobre e de ferro, que atuam como catalizadores na oxidação lipídica. A complexação ocorre por meio de um par de elétrons não compartilhado, em sua estrutura molecular. Os agentes quelantes mais utilizados são o ácido cítrico e citratos, fosfatos, ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) e seus sais (SHAHIDI, 2005; MAISUTHISAKUL, 2008);

- Biológicos, abrange diversas enzimas ou peptídeos, que podem destivar radicais reativos. Alguns destes antioxidantes biológicos podemos destacar a glutatona e as catalases, glucose oxidase e superóxido dismutase (SHAHIDI, 2005);

- Mistos, são alguns compostos produzidos por plantas, animais e microrganismos, que incluem várias proteínas hidrolisadas, alguns flavonoides e derivados de ácido cinâmico (SHAHIDI, 2005).

Os antioxidantes são comumente aplicados pela indústria para retardar a oxidação de seus produtos, principalmente a oxidação lipídica, como é o caso da indústria de alimentos, onde atuam retardando a deterioração, a rancificação e a descoloração, consequentemente aumentando o tempo de prateleira dos produtos; e também da indústria de biocombustíveis, utilizados como estabilizadores, mantendo a qualidade durante o período de

armazenamento do biodiesel (RAMALHO, 2006; BORSATO, 2012). Na indústria farmacêutica e cosmética, a aplicação de antioxidantes vai além de apenas aumentar o tempo de prateleira do produto, são utilizados em diversas formulações para a prevenção e tratamento de várias doenças, para a redução dos efeitos do envelhecimento cutâneo, como em protetores solares e cosméticos anti-idade (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SCOTTI *et al.*, 2007).

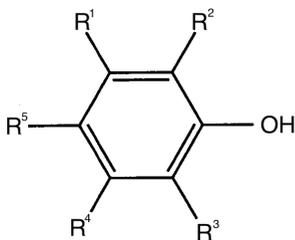
Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos um radical hidroxila. Podem ser de origem sintética e são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) (RAMALHO, 2006). Entretanto, a aplicação destes em alimentos é limitada e controlada, até mesmo proibida em alguns países, por demonstrarem alguns riscos. Por este motivo, e também com um maior interesse em produtos naturais, principalmente por parte das indústrias de alimentos e de fármacos, vem aumentando as pesquisas e aplicações de biomoléculas para a mesma finalidade, como é o caso dos antioxidantes naturais (SOARES, 2002). Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais, animais e microrganismos, dentre os mais utilizados podemos destacar os tocoferóis e os compostos fenólicos (MASTRO-DURÁN, 1993; TIVERON, 2012).

### 2.2.3 Compostos Fenólicos

A estrutura química dos compostos fenólicos é formada por um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (Figura 2). Esse grupo abrange uma ampla variedade de compostos químicos, cerca de 10.000, que são classificados conforme o número de carbonos existente em sua molécula, tais como: ácidos fenólicos, aldeídos, ácido fenilacético, ácido cinâmico, cumarina e flavonoides (PAPASAVAS, 2014).

Como já mencionado, a biossíntese dos compostos fenólicos envolve duas rotas, a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. O ácido fosfoenolpiruvato (PEP), produto da via glicolítica, e a eritrose-4-fosfato, proveniente da via das pentoses-fosfato, formam o ácido chiquímico (GOUVEA *et al.*, 2012). A partir desse processo forma-se a molécula de corismato, precursora dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). A desaminação da fenilalanina é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL),

resultando no ácido cinâmico, que é hidroxilado formando cumarinas e o ácido *p*-cumárico, em outras palavras, a formação dos compostos fenólicos simples e das ligninas (TAIZ & ZEIGER, 2013). Alguns compostos intermediários oriundos da rota do ácido chiquímico e do ácido malônico são responsáveis pela formação de flavonoides, taninos e outros compostos variados (DIAS *et al.*, 2016).



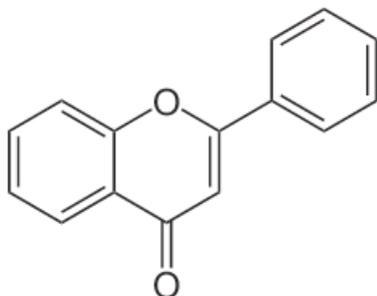
**Figura 2.** Estrutura química do composto fenólico simples (Vermerris & Nicholson, 2009).

Os polifenóis são compostos naturais existentes nas plantas superiores, e compreendem várias substâncias que fazem parte do grupo dos compostos fenólicos. Tais substâncias abrangem um amplo e numeroso grupo de moléculas com capacidade antioxidante, assim como possíveis efeitos na prevenção de várias doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (MICELI *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos, podem apresentar toxicidade mas também podem possuir ação benéfica na saúde humana, e vêm sendo relacionados também por possuírem atividade anti-inflamatória e impedirem a aglomeração de plaquetas sanguíneas.

#### 2.2.4 Flavonoides

Essa classe de compostos engloba o maior grupo de compostos naturais das plantas, com cerca de 8.000 flavonoides que ocorrem naturalmente (HARBORNE & BAXTER, 1999). São compostos de baixo peso molecular, formado por 15 átomos de carbono, arranjados em um esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (Figura 3). Essencialmente, a estrutura é composta por dois anéis aromáticos A e B, unidas por uma ponte de carbono 3 que apresenta-se geralmente sob a forma de um anel

heterocíclico C. O anel aromático A tem origem na condensação de três moléculas de malonil – CoA, que é derivado da rota do ácido malônico. O anel B origina-se a partir da via do ácido chiquímico proveniente da fenilalanina, precursora do ácido cinâmico (BOHM, 1998; MERKEN & BEECHER, 2000).



**Figura 3.** Esqueleto básico dos flavonoides (RAHMAN *et al.*, 2006)

Os flavonoides são glicosídeos amplamente utilizados como marcadores do controle de qualidade em diversas plantas medicinais e fármacos. Esta classe de fenólicos é dividida em seis subgrupos, sendo eles: flavona, flavonol, flavanona, flavanol, antocianidina, isoflavonas (PAPASAVAS, 2014). Estes podem ser pigmentos e são os mais abundantes depois das clorofilas e dos carotenoides. São os responsáveis por atrair polinizadores e dispersores de sementes, devido ao fato destes compostos possuírem inúmeras substâncias coloridas, como exemplo comum as antocianinas, responsáveis pela coloração intensa nas frutas e flores, como o vermelho, roxo, rosa e azul (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Um dos primeiros relatos de flavonoides em espécies de *Passiflora* foi na década de 60, em pesquisa realizada com *Passiflora incarnata* L., *P. quadrangularis* e *P. pulchella* (GLOTZBACH & RIMPLER, 1968). Pereira e colaboradores (2005) relatam que os flavonoides C-glicosídeos são os mais aparentes nas espécies de *Passiflora*, devido à presença de isoorientina, isovitexina, orientina e vitexina. Do mesmo modo, estas substâncias estão presentes em extratos aquosos de *P. alata* e *P. edulis* (DE PARIS *et al.*, 2002).

### 2.3 Biotecnologia, multidisciplinaridade e áreas

O termo biotecnologia deriva-se de uma junção de três palavras do grego antigo, no qual “βίος” (bios) significa vida, “τέχνη”(técne), exprime a noção da técnica, e “λόγος” (logos) pode ser melhor traduzida, neste caso, como estudo ou conhecimento. Em uma definição mais ampla, biotecnologia é o uso de organismos ou parte deles para a produção de bens ou serviços.

A ONU definiu, na conhecida Convenção da Biodiversidade, que biotecnologia é ‘qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica’ (ONU, 1992).

A biotecnologia divide-se em dois níveis tecnológicos diferentes, o primeiro é conhecido por biotecnologia clássica ou convencional, o qual envolve um conjunto de atividades que o homem vem desenvolvendo há milhares de anos. São aquelas baseadas em fermentação por microrganismos, no caso pão, vinho, cerveja, até mesmo a produção de antibióticos e álcool combustível, e também aquelas baseadas no melhoramento animal e vegetal, por meio de seleção dos mais produtivos e resistentes, incluindo a produção industrial de sementes e de híbridos de alto rendimento. A biotecnologia clássica abrange também a produção de soros e vacinas, por meio de imunização de grandes animais e o emprego de microrganismos inativos.

Bem mais recente do que a biotecnologia clássica, a biotecnologia moderna ou não convencional é comumente considerada como tendo início a partir da descoberta da estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico), em 1953 (FALEIRO, 2011). A biotecnologia moderna envolve técnicas celulares e moleculares, por meio de métodos de seleção não natural, aplicando a engenharia genética, otimização fisiológica, clonagem e cultura de tecidos. O desenvolvimento da biotecnologia, principalmente da biotecnologia moderna, por meio de técnicas sofisticadas e pela capacidade de inovação deste setor, é visto atualmente como uma área estratégica para o desenvolvimento de diversos países, como o Brasil (CARVALHO, 1993; ARBIX, 2007).

A área de biotecnologia é conhecida por ser multidisciplinar e interdisciplinar, pois opera e interage com diversas áreas: da biologia, como por exemplo genética, fisiologia e bioquímica, microbiologia, biologia molecular entre outras; da química, como química orgânica,

química de produtos naturais, química industrial, engenharia molecular; da engenharia, como engenharia química, engenharia de produção. O biotecnologista, o profissional de biotecnologia, possui ainda bases de gestão tecnológica, com interface entre direito, economia, administração empresarial e pública.

Por ser uma área que permeia outras, é comumente desmembrada e as técnicas são agrupadas em quatro grandes vertentes, a biotecnologia vegetal, biotecnologia animal, biotecnologia industrial e biotecnologia ambiental.

### **2.3.1 Biotecnologia vegetal**

Há aproximadamente 15.000 anos, o homem começou a domesticação das plantas, onde selecionava sementes de plantas mais produtivas, resistentes e com uma maior qualidade a partir de cruzamentos espontâneos (OLIVEIRA, 2000). Mais recentemente, os cruzamentos passaram a ser dirigidos, posteriormente com intervenção química e finalmente manipulação genética.

A biotecnologia vegetal moderna surgiu a partir da teoria da totipotencialidade de Schleiden & Schwann, em 1838, a qual, no que diz respeito à autonomia da célula, afirma que toda célula possui o potencial necessário para originar um organismo completo (VASIL, 2008). Em seguida, Darwin contribuiu com a teoria de evolução, e outra descoberta na área vegetal foi o estabelecimento das leis da hereditariedade por Mendel, em 1865 (CANHOTO, 2010). Outro marco importante na biotecnologia vegetal ocorreu 1983, quando foi descrito, por três grupos independentes, a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* (VASIL, 2008).

A biotecnologia vegetal engloba duas vertentes: biotecnologia agrícola, que visa a multiplicação de plantas em larga escala, eliminação de vírus, inserção de características via engenharia genética; e a biotecnologia vegetal industrial, que objetiva a produção de compostos para a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. Em geral, na biotecnologia vegetal o domínio do cultivo *in vitro* se faz importante, uma vez que ele é a base das técnicas desenvolvidas na área vegetal, e em algum momento, na manipulação ele será aplicado, seja na micropropagação de mudas até no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (TORRES *et al.*, 1998).

### 2.3.2 Cultivo *in vitro* de calos

A partir da teoria da totipotencialidade, foram desenvolvidos, em 1902, os primeiros trabalhos com cultivo de tecidos de várias espécies vegetais (KERBAUY, 1997). Com os avanços da biotecnologia vegetal, Skoog & Miller, em 1957, demonstraram que o balanço de auxinas e citocininas regulava a diferenciação de parte aérea, raiz e calo, em tecidos cultivados *in vitro*. Este resultado serviu de base para o desenvolvimento de técnicas de regeneração e propagação *in vitro* de plantas de alta qualidade fitossanitária, em larga escala.

As técnicas de cultura de células vegetais *in vitro* são usualmente aplicadas na propagação vegetativa *in vitro*, micropropagação, permitindo a formação de plantas geneticamente idênticas, a partir de células, órgãos de uma planta matriz (PAULS, 1995). Esta tecnologia tem importância prática na agricultura e no meio ambiente, possibilitando a produção em larga escala de plantas isentas de patógenos, e também a conservação de recursos genéticos, contribuindo nos programas de conservação de espécies nativas ameaçadas de extinção e permitindo o intercâmbio seguro de germoplasma, importante para programas de melhoramento de plantas (PAULS, 1995; PINHAL *et al.*, 2011).

Outra aplicação desta técnica é na produção de metabólitos secundários *in vitro* (FUMAGALI *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2016). Desde 1940, os primeiros compostos, alcaloides, foram produzidos em cultura de meristemas e raízes e também foram estabelecidas as primeiras suspensões celulares (TRIPATHI & TRIPATHI, 2003). Um passo importante, para estabelecer estes cultivos em suspensão, é a indução da calogênese, pois permite o cultivo de forma mais eficiente.

O calo é um sistema não organizado de células, originado a partir de segmentos de tecidos das plantas (raiz, caule, folha) cultivados em meio de cultura contendo fitorreguladores exógenos. Nesse processo, há a desdiferenciação das células, já diferenciadas, do tecido que está sendo cultivado, que são revertidas em células meristemáticas, não especializadas, através da ação dos reguladores de crescimento de plantas. Os tecidos jovens meristemáticos das plantas são os mais indicados para a indução de calogênese, mas também é possível induzir calos a partir de fragmentos já diferenciados (MACHADO *et al.*, 2009). Os calos podem ser friáveis ou compactos, podendo apresentar coloração variada, dependendo do tipo de pigmentos que acumulam ou

até mesmo não apresentar coloração. A calogênese envolve alterações estruturais e metabólicas nas células (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2015).

A indução da calogênese pode ser realizada visando, também, a regeneração de plantas através de organogênese ou embriogênese somática, e pode ser aplicada com a finalidade de se obter plantas, embriões somáticos e sementes artificiais e até mesmo, com a intenção de aumentar a variabilidade genética, uma vez que a regeneração de plantas, via cultura *in vitro* de calos, aumenta a probabilidade de variação somaclonal (CANHOTO, 2010).

Atualmente, são produzidos comercialmente alguns compostos oriundos do metabolismo secundário em cultivos celulares, como o isoquinolínico berberina obtido de *Coptis japonica*, um alcaloide, e a naftoquinona shikonina proveniente de *Lithospermum erythrorhizon* (PLETSCH, 1998). Vários estudos estão em curso, mas a biossíntese de metabólicos secundários de interesse econômico por cultura de calos e suspensões celulares, enfrenta alguns problemas, como a dificuldade de estabelecer cultivos estáveis, em que se produzam os compostos de forma contínua e quantidade significativa, para ser economicamente viável e competir com as técnicas convencionais de produção destes compostos (VERPOORTE & MARASCHIN, 2001; TAPIA & MONROY, 2007).

As vantagens da produção de metabólitos secundários de importância, através de sistemas de culturas *in vitro* de células e órgãos são: as condições controladas de cultivo, as possibilidades de manipulação de fatores promotores da biossíntese, incluindo a engenharia genética e a transformação genética das células, e a viabilidade do cultivo em larga escala, em biorreatores. Essas vantagens viabilizam sistemas de produção mais eficientes e menos vulneráveis, do que o cultivo das plantas no campo.

### **2.3.3 Biotecnologia de Passifloras para produção de metabólitos secundários**

Poucos são os trabalhos disponíveis sobre a produção de metabólitos secundários por culturas de calos e suspensões celulares, desenvolvidos com Passifloras. Estudos conduzidos por Antognoni e colaboradores (2007), com culturas de calos de *P. incarnata*, *P. quadrangularis* e *P. edulis*, indicaram a pequena produção de isoorientina, enquanto a concentração de outros flavonoides ficaram

abaixo do limite de detecção. Porém, a irradiação dos calos com UV-B aumentou a produção de orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina e a indução com metil jasmonato, também aumentou as concentrações de orientina, vitexina e isovitexina, demonstrando que a capacidade biossintética de metabólitos secundários, por culturas de células de *Passiflora*, pode ser aumentada, através de formas adequadas de elicitação. Fraccaroli e colaboradores (2008) relataram o efeito promotor de extrato de levedura, aumentando a produção de compostos aromáticos em suspensões celulares de *P. garkei*. A produção *in vitro* de compostos bioativos em *P. alata* foi estudada por Machado *et al.* (2010), para detectar alcaloides em calos e culturas de células em suspensão. Mais recentemente, estudos foram conduzidos por Lugato e colaboradores (2014), com *P. alata*, indicaram atividade antioxidante e presença de compostos fenólicos em extratos plantas e calos produzidos *in vitro*. Esses estudos indicam o potencial dos sistemas de cultura *in vitro* de Passifloras para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito de tipos de explante e do tempo de cultivo na biossíntese de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em culturas de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, para definir o potencial de utilização das culturas de calos e otimizar a produção *in vitro* de compostos bioativos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar o crescimento, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante (poder redutor, baseado na redução do íon férrico e atividade sequestradora do DPPH) em calos de *Passiflora setacea*, com 30, 45 e 60 dias de cultivo, originados a partir de explantes de plântulas (raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédone, nó foliar) e de caules de plantas cultivadas *in vitro*.
- b) Quantificar o crescimento, compostos fenólicos totais, flavonoides, e atividade antioxidante (poder redutor, baseado na redução do íon férrico e atividade sequestradora do DPPH) em calos de *Passiflora tenuifila*, com 45, 60 e 75 dias de idade, originados a partir de explantes de sementes imaturas e de caules (de plantas cultivadas *in vitro*) cultivados em sacarose e frutose.
- c) Comparar os padrões de variação dos fenólicos totais, flavonoides e da atividade antioxidante dos diferentes tipos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, em função do tempo de cultivo, para detectar as relações entre eles e o melhor tipo de calo e tempo de cultivo para otimizar a produção de compostos antioxidantes *in vitro*.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Para a produção de calos de *P. setacea* foram utilizadas sementes do banco de germoplasma de Passifloras, cedidas pela Embrapa Cerrados, e para a indução da calogênese de *P. tenuifila* foram utilizadas sementes obtidas a partir de frutos produzidos em casa de vegetação, por mudas do banco de germoplasma de Passifloras, cedidas pela Embrapa Cerrados. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica no Centro de Ciências Biológicas e no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química no Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, ambos na Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis – SC.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o estabelecimento de plântulas e indução dos calos foi o meio Murashige & Skoog (MS; Sigma-Aldrich) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), na concentração de 4,4 g/L, suplementado com sacarose, glucose ou frutose nas concentrações de 59 mM ou 88,5 mM, dependendo do experimento, 0,2% (m/V) de Phytigel (Sigma-Aldrich). Os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA), a 2,5  $\mu$ M, foram adicionados, para a indução de calos e o ácido indolbutírico (AIB), a 1,25  $\mu$ M, para a manutenção *in vitro* das plantas de *P. tenuifila*. 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 20 minutos a 1,1 Kg/cm<sup>3</sup> e 121°C. Estes procedimentos foram utilizados em todos os experimentos abaixo descritos.

## **4.2.2 Estabelecimento *in vitro* de plantas axênicas e de calogênese em *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila***

### **4.2.2.1 *Passiflora setacea***

#### **4.2.2.1.1 Cultura de calos a partir de diferentes tipos de explantes de plântulas axênicas**

Para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de *P. setacea*, as sementes foram lavadas com água de 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 MS suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel, conforme descrito anteriormente. Após a inoculação das sementes, os tubos foram cobertos e vedados com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm). 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.

Após 8 semanas, as plântulas axênicas produzidas a partir da germinação *in vitro* das sementes foram removidas dos tubos de ensaio e segmentos (1 cm de comprimento) de raiz, hipocótilo, cotilédone, nó cotiledonar e nó foliar 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  $2,5 \mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os calos obtidos foram multiplicados em ciclos de 30 dias, transferindo-se segmentos de 80 mg de massa fresca para o mesmo meio de cultura citado acima, para prover a biomassa necessária para as análises fitoquímicas e de atividade biológica. Após 30, 45 e 60 dias, as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos, que foram coletados para as análises.

#### 4.2.2.1.2 Cultura de calos a partir de segmentos de caules

As plantas de *P. setacea*, utilizadas como fontes de explantes de caules, foram obtidas através da cultura de segmentos apicais de ramos (3-4 cm de comprimento), contendo a gema apical e duas gemas axilares removidos de plantas axênicas de 12 semanas de idade, produzidas a partir da germinação de sementes *in vitro*. Os segmentos apicais foram transferidos para o meio de cultura MS semi-sólido suplementado com 59 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel.

Após 8 semanas, as plantas produzidas *in vitro* foram removidas dos tubos de ensaio e segmentos de caules (5 mm de comprimento) foram removidos e inoculados, na posição horizontal, em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose, 0,2% de Phytigel e 2,5  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Os calos obtidos foram multiplicados em ciclos de 30 dias, transferindo-se segmentos de 80 mg de massa fresca para o mesmo meio de cultura citado acima, para prover a biomassa necessária para as análises fitoquímicas e de atividade biológica. Após 30, 45 e 60 dias, as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos, que foram coletados para as análises.

#### 4.2.2.2 *Passiflora tenuifila*

##### 4.2.2.2.1 Cultura de calos a partir de sementes imaturas

Os calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* foram obtidos a partir dos seguintes procedimentos: 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  $\mu\text{M}$  de ácido 2-4-diclorofenóxiacético (2,4-D). Após a inoculação, os tubos foram cobertos e vedados com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm). 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 ( $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e umidade relativa de 70%. Estas condições foram utilizadas em todos os experimentos, exceto quando especificado.

Os calos obtidos foram multiplicados em ciclos de 30 dias, transferindo-se segmentos de 80 mg de massa fresca para o mesmo meio de cultura citado acima, para prover a biomassa necessária para as análises fitoquímicas e de atividade biológica. Após 45, 60 e 75 dias, as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos, que foram coletados para as análises.

#### **4.2.2.2.2 Cultura de calos a partir de segmentos de caules**

As plantas de *P. tenuifila* foram estabelecidas *in vitro* através da cultura de segmentos apicais de ramos (3-4 cm de comprimento), contendo a gema apical e duas gemas axilares, que foram removidos de plantas de 12 semanas de idade, crescidas em casa de vegetação, a partir da germinação de sementes em solo. Os segmentos apicais foram lavados com 100 ml de água de torneira e 1 ml de detergente neutro e enxaguados cinco vezes, também com água de torneira. No fluxo laminar, foram imersos em solução de álcool 70%, por 1 minuto e 30 segundos, lavados com água destilada esterilizada, imersos em solução de hipoclorito comercial, contendo 2,5% de cloro ativo, por 2 minutos e 30 segundos e lavados cinco vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, os segmentos apicais tiveram 5 mm da região basal do caule removida e foram inoculados em meio de cultura MSsemi-sólido suplementado com 88,5 mM de glicose, 1,25  $\mu$ M de ácido indolbutírico (AIB) e 0,2% (m/V) de Phytigel.

Após 8 semanas, as plantas produzidas *in vitro* foram removidas dos tubos de ensaio e segmentos de caules (5 mm de comprimento) foram removidos e inoculados, na posição horizontal, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 0,2% de Phytigel e 2,5  $\mu$ M de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA). Após 45, 60 e 75 dias, as culturas foram avaliadas quanto às massas fresca e seca dos calos, que foram coletados para as análises fitoquímicas.

#### **4.2.3 Determinação do teor de água dos calos**

Os calos foram removidos dos tubos de ensaio, pesados em balança analítica e colocados para secar por 24h em estufa a 60°C,

período após o qual foi determinada a massa seca. O teor de água, em porcentagem, foi calculado através da fórmula:

$$X\% = \left( \frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100$$

Onde:

X% = Teor de água de base úmida

P<sub>i</sub> = Peso inicial da amostra (g)

P<sub>f</sub> = Peso final da amostra (g)

#### 4.2.4 Preparação dos extratos vegetais

Após a secagem, os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram triturados manualmente em almofariz e pistilo e submetidos ao procedimento de maceração em etanol hidratado 96%, durante sete dias. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório a vácuo (Fisatom) a 55°C, de forma que o solvente evaporado fosse recuperado e posteriormente reutilizado para nova maceração. Este mesmo procedimento foi realizado por três vezes a fim de se obter o maior rendimento possível dos extratos brutos, totalizando 21 dias. O rendimento dos extratos obtidos, em porcentagem, foi calculado através da seguinte expressão:

$$R\% = \frac{E_s}{M_s} \times 100$$

Onde:

R% = Rendimento do extrato

E<sub>s</sub> = Peso do extrato seco (g)

M<sub>s</sub> = Peso do material vegetal seco (g)

#### 4.2.5 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito por Bouchet *et al.* (1998) e Cavin *et al.* (1998) modificado por Moresco (2010). O ensaio consiste em preparar uma

solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,004% momentos antes do uso, e uma solução de 1000 µg/mL de cada extrato bruto. Foram misturados 100 µL de solução de DPPH com 60 µL da amostra vegetal e 140 µL de etanol. A concentração final da amostra foi de 200 µg/mL. Agitou-se e após 30 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro de microplacas (Biosystems modelo Synergy 2) a 517 nm, corrigindo cada absorbância ( $Abs_{amostra}$ ) com o seu respectivo controle ( $Abs_{branco}$ ), que consiste na solução do extrato vegetal juntamente com etanol. Uma solução contendo 100 µL de DPPH e 200 µL de etanol foi utilizada como controle, com 100% de absorbância ( $Abs_{controle}$ ). Todas as amostras, assim como o controle, foram avaliadas em triplicata. A absorbância de cada amostra foi convertida em porcentagem da atividade antioxidante (AA%) a partir da fórmula:

$$AA\% = 100 - \left( \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle}} \right) \times 100$$

Apenas as amostras que atingiram porcentagem antioxidante superior a 50% foram analisadas quanto à concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante (CE50). Para a análise de CE50, as amostras possuíam concentrações de 25 a 200 µg/mL e foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima. Foram feitos 3 experimentos independentes de cada amostra selecionada e em triplicata, obtendo 3 equações da reta para o cálculo do CE50, que se deu através da seguinte expressão:

$$CE50 = (50 - b) \div a$$

A partir das 3 equações, calculou-se a concentração média e o desvio (µg/mL) do extrato que inibe 50% do DPPH.

#### 4.2.6 Determinação do potencial redutor

A análise da atividade antioxidante pela determinação do potencial redutor foi realizada seguindo a metodologia usada por Moresco (2010), com adaptações, que se baseia no método de Price & Butler, proposto por Waterman & Mole (1994). Misturas contendo 5 µL de amostras (extrato bruto diluído em etanol na concentração de 1000 µg/mL), 195 µL de água deionizada e 50 µL de solução de FeCl<sub>3</sub> 0,1 M

em HCl 0,1 M foram preparadas. Após 3 minutos, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de ferricianeto de potássio 0,008 M, e misturou-se. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro de microplacas (Biosystems modelo Synergy 2) a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme descrito anteriormente, sem a adição da amostra. Foi realizada uma curva de calibração para comparação e cálculo do potencial redutor, utilizando-se soluções padrões de ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 100 a 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em que se obteve a equação da reta  $y = 92,6x + 9,8$ ;  $r^2 = 0,999$ . O resultado foi expresso em mg de ácido ascórbico/g de extrato.

#### **4.2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou e colaboradores (2006) e Moresco (2010). A cada 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto diluído em etanol na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Após 3 minutos, foi adicionado 1,0 mL de uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , as misturas foram agitadas e permaneceram em repouso por 1 hora. A intensidade da reação foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro (Perkin Elmer modelo Lambda 2S) a 725 nm. Como branco foi utilizada uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a presença da solução da amostra. O aparecimento da cor azul-escuro é indicativo da presença de fenólicos no extrato testado. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foi construída uma curva de calibração para o cálculo do conteúdo de compostos fenólicos, com soluções padrão de ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 25 a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , onde se obteve a equação da reta  $y = 90x + 6,3$ ;  $r^2 = 0,996$ . O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico, em mg de ácido gálico /g de extrato.

#### 4.2.8 Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado pelo método adaptado do utilizado por Moresco (2010). Em 50  $\mu\text{L}$  de uma solução da amostra (extrato bruto diluído em etanol na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol e 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  2% e a mistura agitada. Após 1 hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro de microplaca (Biosystems modelo Synergy 2) a 415 nm. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme descrito acima, sem a adição de  $\text{AlCl}_3$ . Um aparecimento de coloração verde-fluorescente é indicativo da presença de flavonoides. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foi construída uma curva de calibração para comparação e cálculo do teor de flavonoides, com soluções padrão de quercetina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 5 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , onde se obteve a equação da reta  $y = 41,63 + 25,78x$ ;  $r^2 = 0,990$ . O resultado foi expresso em mg de quercetina /g de extrato.

#### 4.2.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) simples ou fatorial, com separação de médias pelo teste de Tukey, com nível de probabilidade de 95%. Foram também realizadas as análises de correlação linear simples (para o cálculo do coeficiente de correlação linear simples  $r$ ), ao nível de 5% de probabilidade, e as análises de regressão linear e não linear simples (para a determinação das equações das linhas de tendência e dos valores de coeficiente de determinação  $R^2$ ). As análises estatísticas foram realizadas com os programas de estatística do EXCEL (Microsoft) e STATISTICA 7.0 (StatSoft. Inc).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o crescimento *in vitro* de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*

No cultivo *in vitro* de plantas, uma das formas mais eficientes de avaliar o crescimento, em termos quantitativos, é realizando-se primeiramente a determinação da massa fresca (Mf), massa seca (Ms) e a partir destes resultados se calcula os valores do teor de água e da razão Ms/Mf que, nas tabelas abaixo representam a quantidade de massa seca, em mg, presente em um grama de massa fresca (CLEMENT & BOVI, 2000; KURITA, 2011).

As análises fatoriais dos dados obtidos para os parâmetros massa fresca, massa seca, teor de água e razão massa seca/massa fresca dos calos, indicaram interação significativa entre os fatores tipo de explante e tempo de cultivo, nas duas espécies estudadas.

#### 5.1.1 *Passiflora setacea*

Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 são apresentados os valores de massa fresca, massa seca, teor de água e razão massa seca/massa fresca de calos de *P. setacea* respectivamente, originados a partir de diferentes tipos de explantes e cultivados por diferentes períodos de tempo.

Os valores máximos de massa fresca dos calos de *P. setacea* ocorreram aos 45 dias de cultivo, em calos derivados de hipocótilo, nó foliar e caule e aos 60 dias de cultivo, em calos de raiz, nó cotiledonar e cotilédone (Tabela 1). Em todos os períodos de cultivo os calos de nó cotiledonar apresentaram massas frescas superiores (entre 1494,83 mg e 2754,52 mg) em relação aos demais tratamentos. Os menores valores de massas frescas foram observados em calos de hipocótilo, aos 30 dias (783,47 mg), e de nó foliar aos 45 dias (1418,34 mg) e aos 60 dias (1347,19 mg).

**Tabela 1.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa fresca (mg), de calos de *Passiflora setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	935,6 $\pm$ 153,26 Bc	1741,09 $\pm$ 258,23 Cb	2073,83 $\pm$ 185,12 Ca
Hipocótilo	783,47 $\pm$ 59,24 Cc	1781,36 $\pm$ 78,49 Ca	1630,26 $\pm$ 112,23 Eb
Nó cotiledonar	1494,83 $\pm$ 231,64 Ac	2527,80 $\pm$ 89,16 Ab	2754,52 $\pm$ 248,33 Aa
Nó foliar	1003,88 $\pm$ 110,72 Bc	1418,34 $\pm$ 76,74 Da	1347,19 $\pm$ 101,19 Fb
Cotilédone	1514,67 $\pm$ 62,05 Ac	1998,54 $\pm$ 119,92 Bb	2150,45 $\pm$ 168,89 Ba
Caule	1123,12 $\pm$ 107,98 Bc	1849,19 $\pm$ 57,26 Ba	1726,95 $\pm$ 16,24 Db

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 7 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Entretanto, os máximos valores de massa seca dos calos foram alcançados aos 45 dias de cultivo, em todos os tipos de explante, declinando aos 60 dias, exceto nos calos de raiz e hipocótilo, cujas massas secas permaneceram iguais estatisticamente às observadas no período de 45 dias (Tabela 2). Calos de cotilédone apresentaram as maiores massas secas (entre 95 mg e 107,42 mg), em todos os períodos de cultivo, e aos 45 dias não diferiram significativamente dos calos de hipocótilo e nó cotiledonar. Os menores valores de massa seca foram observados, aos 30 dias, em calos de raiz (53,83 mg) e hipocótilo (58,46 mg); aos 45 e 60 dias em calos raiz (70,43 mg; 75,71 mg) e nó foliar (77,78 mg; 67,07 mg).

Os máximos teores de água dos calos foram observados, em todos os tipos de explantes, aos 60 dias e aumentaram significativamente durante o decorrer do tempo de cultivo (Tabela 3). Os calos de raiz e nó cotiledonar apresentaram teores de água (entre 94,19% e 96,54%) superiores aos demais calos, em todos os períodos de cultivo.

**Tabela 2.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa seca (mg), de calos de *Passiflora setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	53,83 $\pm$ 5,57 Db	70,43 $\pm$ 11,58 Ba	75,71 $\pm$ 2,60 Ba
Hipocótilo	58,46 $\pm$ 4,63 Db	95,71 $\pm$ 4,84 Aa	87,21 $\pm$ 7,94 Aa
Nó cotiledonar	85,31 $\pm$ 6,62 Bc	107,30 $\pm$ 1,94 Aa	94,99 $\pm$ 9,07 Ab
Nó foliar	71,22 $\pm$ 5,94 Cb	77,78 $\pm$ 3,47 Ba	67,07 $\pm$ 2,13 Bb
Cotilédone	95 $\pm$ 6,43 Ab	107,42 $\pm$ 6,58 Aa	95,18 $\pm$ 5,34 Ab
Caule	75,98 $\pm$ 7,36 Cb	100,78 $\pm$ 4,17 Aa	82,29 $\pm$ 6,92 Bb

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 7 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

**Tabela 3.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os teores de água (% da massa fresca) de calos de *Passiflora setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	94,19 $\pm$ 0,46 Ac	95,94 $\pm$ 0,43 Ab	96,33 $\pm$ 0,27 Aa
Hipocótilo	92,52 $\pm$ 0,44 Cc	94,61 $\pm$ 0,39 Bb	94,64 $\pm$ 0,38 Ca
Nó cotiledonar	94,23 $\pm$ 0,47Ac	95,75 $\pm$ 0,14 Ab	96,54 $\pm$ 0,18 Aa
Nó foliar	92,85 $\pm$ 0,54 Bc	94,51 $\pm$ 0,09 Cb	95,00 $\pm$ 0,31 Ba
Cotilédone	93,70 $\pm$ 0,29 ABc	94,60 $\pm$ 0,54 Cb	95,56 $\pm$ 0,23Ba
Caules	93,23 $\pm$ 0,11 Bc	94,59 $\pm$ 0,16 Cb	95,23 $\pm$ 0,36 Ba

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 7 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Dentre os calos de *P. setacea*, aquele que mais se desenvolveu no quesito massa fresca foi o calo oriundo de nó cotiledonar, com 2,754 g, porém quando determinada a massa seca, observou-se que não apresentou a maior massa seca, sendo o calo com maior teor de água, com 96,5%. Dentre os calos que apresentaram menor teor de água estão aqueles oriundos de hipocótilo e de cotilédone, sendo estes os que apresentaram maior massa seca.

Os valores de razão massa seca/massa fresca de calos de *P. setacea* diferiram significativamente entre os diferentes tipos de explantes e para cada explante, entre os diferentes períodos de cultivo (Tabela 4). Aos 30 dias de cultivo, em todos os explantes, os valores foram máximos (entre 58 e 75 mg de massa seca/g de massa fresca), indicando, maior acúmulo de massa seca em relação aos períodos de 45 e 60 dias. Em todos os tempos de cultivo os calos de hipocótilo e nó foliar apresentaram os maiores valores de acúmulo de massa seca por grama de massa fresca. Entretanto, aos 45 e 60 dias, calos de cotilédone e caule apresentaram valores similares aos de hipocótilo e nó foliar. Calos de raiz e nó cotiledonar apresentaram os menores valores de razão massa seca/massa fresca (entre 58 e 35 mg massa seca/g de massa fresca), em todos os tempos de cultivo.

**Tabela 4.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os valores de razão entre massa seca/massa fresca (mg/g) de calos de *Passiflora setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	58 $\pm$ 4 Ca	41 $\pm$ 4 Bb	37 $\pm$ 3 Cb
Hipocótilo	75 $\pm$ 4 Aa	54 $\pm$ 4 Ab	54 $\pm$ 4 Ab
Nó cotiledonar	58 $\pm$ 5 Ca	42 $\pm$ 1 Bb	35 $\pm$ 2 Cc
Nó foliar	71 $\pm$ 3 Aa	55 $\pm$ 1 Ab	50 $\pm$ 3 Ac
Cotilédone	63 $\pm$ 3 Ba	54 $\pm$ 5 Ab	44 $\pm$ 3 Bc
Caule	68 $\pm$ 1 Ba	55 $\pm$ 2 Ab	48 $\pm$ 4 Ac

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 7 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam tipos de explante.

O teor de água dos calos de *P. setacea* aumentou significativamente com o tempo de cultivo, sendo que, o maior acúmulo de massa seca por unidade de massa fresca ocorreu, em todos os tipos de calos, aos 30 dias, como mostram os valores de razão massa seca/massa fresca. A massa fresca aumentou com o decorrer do tempo de cultivo, mas para metade dos calos sofreu uma redução entre 45 e 60 dias. A razão massa seca/massa fresca mostrou-se inversamente proporcional ao tempo de cultivo.

Através das análises de correlação linear simples (ao nível de 5%), realizadas entre massa seca e tempo de cultivo dos calos, e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo, foram determinados os coeficientes de correlação linear simples ( $r$ ), que são uma medida do grau de associação linear entre essas duas variáveis.

Os valores de coeficientes de relação linear obtidos, apesar de indicarem alta associação linear positiva entre massa seca e tempo de cultivo ( $0,847 < r < 0,972$ ), não foram significativos para nenhum dos tipos de calos de *P. setacea*. Para razão massa seca/massa fresca, os coeficientes de correlação indicaram alta associação linear negativa ( $-0,815 < r < -0,9995$ ), sendo porém significativo apenas para cotilédone ( $r = -0,9995$ ). Assim, nos casos em que os valores de  $r$  não foram significativos, foram então realizadas as análises de regressão não linear simples, a determinação das linhas de tendência e dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), que indicam o quanto o modelo de linha de tendência selecionada foi capaz de se ajustar aos dados coletados nos experimentos. O máximo valor de  $R^2=1$  indica que 100% das variações na massa seca pode ser explicada pelos diferentes tempos de cultivo.

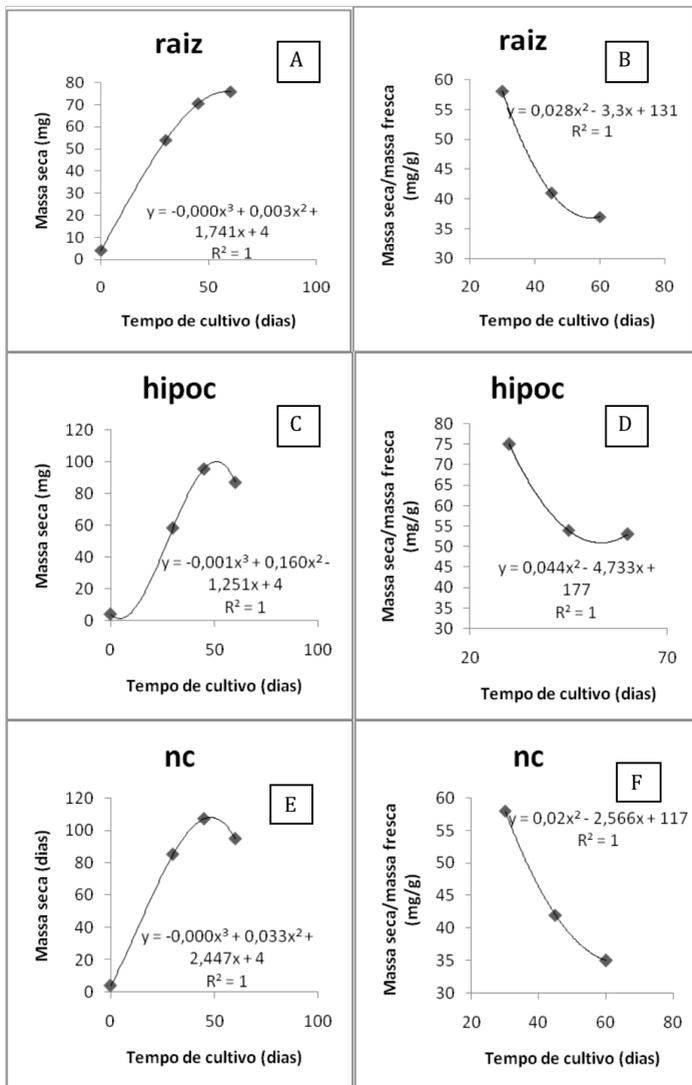
As curvas de crescimento em massa seca dos calos de *P. setacea*, em função do tempo de cultivo (Fig. 4 A, C, E e Fig. 5 A, C, E) foram melhor descritas, para todos os tipos de calos, por funções quadráticas (polinômios de segundo grau- calos de nó foliar e de terceiro grau- demais tipos de calos) comuns em modelos biológicos. Observa-se que a fase exponencial de crescimento dos calos pareceu ocorrer até os 45 dias de cultivo, nos calos de hipocótilo e até os 30 dias de cultivo, nos demais tipos de calos, havendo a desaceleração do crescimento, após esses períodos e entrada na fase estacionária e início da senescência. A desaceleração do crescimento em massa seca, porém, pareceu ser mais atenuada em calos de raiz.

Esses resultados indicam diferenças entre os padrões de variação em massa seca nos diferentes tipos de calos, sugerindo, com mais precisão, em que momentos do período de cultivo os calos estão com a maior atividade de crescimento e norteando os melhores

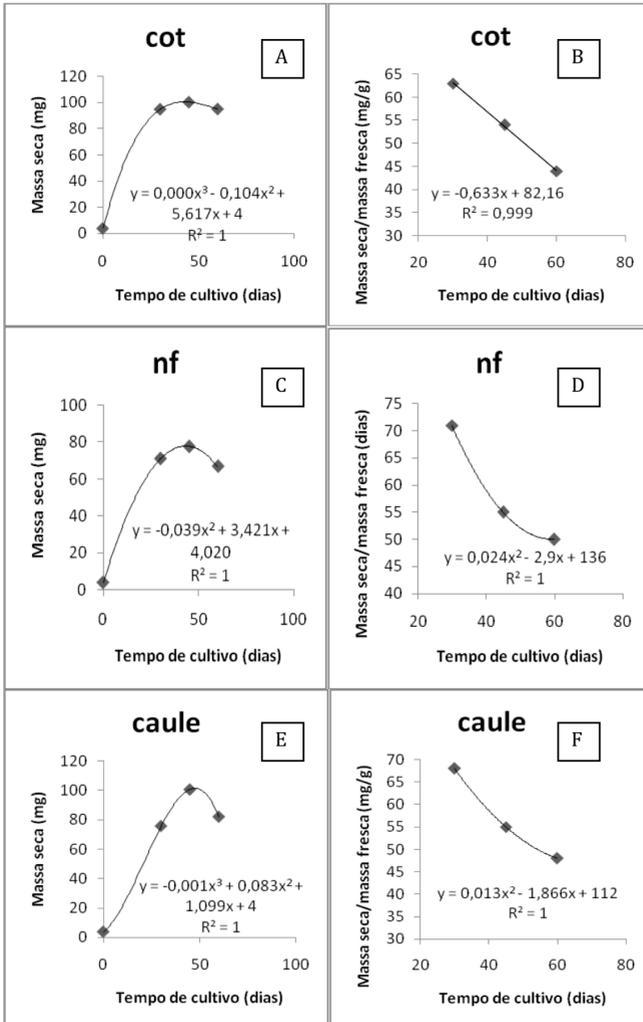
momentos para a multiplicação dos mesmos. Semelhanças nos padrões das curvas de crescimento dos calos foram observadas entre calos de hipocótilo, nó cotiledonar e caule e entre os calos de cotilédone e nó foliar.

As curvas que relacionam a variação da razão massa seca/massa fresca dos calos de *P. setacea* em função do tempo de cultivo (Fig. 4 B, D, F e Fig. 5 B, D, F) foram melhor descritas por funções polinomiais de segundo grau para todos os tipos de calos, exceto para cotilédone, em que foi descrita por uma função linear com coeficiente de correlação  $r = -0,9995^*$  (significativo a 5% de probabilidade).

Em todos os casos, exceto cotilédone, observa-se a queda drástica no acúmulo em massa seca por unidade de massa fresca dos calos durante o decorrer do tempo de cultivo, principalmente entre 30 e 45 dias, parecendo haver uma desaceleração da queda entre 45 e 60 dias de cultivo, em todos os calos. Essa desaceleração pareceu ser mais lenta, em calos de raiz, hipocótilo e nó foliar e, mais rápida, em calos de nó cotiledonar, nó foliar e caule, possivelmente devido à menor absorção de água por esses calos, no período final do ciclo de cultivo. Em calos de cotilédone, entretanto, a taxa de queda na razão massa seca e massa fresca foi constante e igual em todas as fases do cultivo e é expressa pelo valor de inclinação da equação da reta (-0,633).



**Figura 4.** Relação entre massa seca (A, C, E) e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo (B, D, F) de calos de *P. setacea* originados a partir de raiz, hipocótilo (hipoc) e nó cotiledonar (nc) cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 5.** Relação entre massa seca (A, C, E) e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo (B, D, F) de calos de *P. setacea* originados a partir de cotilédone (cot), nó foliar (nf) e caule cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.

Os resultados obtidos sugerem que dois fatores podem ser responsáveis pela diminuição da razão massa seca/massa fresca nos calos de *P. setacea*: a diminuição da massa seca do calo, devido ao

início do processo de senescência e possível degradação da massa seca acumulada e/ou a entrada de água nos calos. Em todos os tipos de calos, exceto calos de raiz e de hipocótilo, foram comprovados o aumento no teor de água, em todos os casos e a diminuição da massa seca entre 45 e 60 dias de cultivo. Nos casos de calos de raiz e hipocótilo, por exemplo, é possível afirmar que a diminuição da razão massa seca/massa fresca foi devida, principalmente, à intensa entrada de água nos calos entre os períodos de 45 e 60 dias de cultivo, já que, a variação nas massas secas não foi significativa. E, certamente, o que deve estar norteando a maior ou menor absorção de água pelos calos seria o metabolismo celular, já que a movimentação da água depende de alterações no gradiente de potencial hídrico entre o meio de cultura externo e citoplasma das células dos calos.

### 5.1.2 *Passiflora tenuifila*

Os máximos valores de massa fresca dos calos de *P. tenuifila* ocorreram aos 60 dias de cultivo em calos de sementes imaturas (1488,58 mg) e em calos de segmentos de caules cultivados em sacarose (1056,39 mg), enquanto que os calos de caule em frutose alcançaram a massa fresca máxima já aos 45 dias de cultivo (1346,37 mg) (Tabela 5). Aos 45 dias e 75 dias, os calos de caule em frutose apresentaram massas frescas superiores em relação aos demais tratamentos, porém aos 60 dias os calos de sementes imaturas apresentaram maior massa fresca. Os calos de caule em frutose tiveram massas frescas superiores em relação à sacarose, em todos os tempos de cultivo.

Em cada tipo de calo, observa-se que os máximos valores em massa seca foram alcançados aos 45 dias de cultivo, em calos originados a partir de segmentos de caule cultivados em frutose (55,32 mg) e em sacarose (74,67 mg) e aos 60 dias, em calos oriundos de sementes imaturas (81,15 mg) (Tabela 6). Aos 45 dias e 75 dias de cultivo as massas secas dos calos de caule em sacarose foram superiores aos demais tratamentos (74,67 mg e 83,21 mg, respectivamente). Os resultados indicam que, em calos originados a partir segmentos de caule, a sacarose foi a fonte de carbono mais eficiente que a frutose na promoção do aumento em massa seca.

**Tabela 5.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa fresca (mg), de calos de *Passiflora tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	951,38 $\pm$ 165,63 Cc	1488,58 $\pm$ 220,14 Aa	1146,46 $\pm$ 169,44 Bb
Caules (frutose)	1346,37 $\pm$ 169,75 Aa	1069,06 $\pm$ 132,33 Bc	1225,46 $\pm$ 130,08 Ab
Caules (sacarose)	971,17 $\pm$ 16,19 Bc	1056,39 $\pm$ 126,39 Ca	999,06 $\pm$ 152,38 Cb

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 10 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

**Tabela 6.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o crescimento, em massa seca (mg), de calos de *Passiflora tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	67,50 $\pm$ 4,18 Bb	81,15 $\pm$ 6,92 Aa	64,57 $\pm$ 6,59 Bb
Caules (frutose)	55,32 $\pm$ 4,99 Ca	50,67 $\pm$ 1,47 Cb	50,04 $\pm$ 5,12 Cb
Caules (sacarose)	74,67 $\pm$ 5,66 Aa	63,99 $\pm$ 6,88 Bb	83,21 $\pm$ 6,92 Aa

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 10 repetições seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Analisando-se os resultados observa-se que, em calos de *P. tenuifila*, não existiu a tendência de aumento da massa fresca em função do tempo de cultivo analisados e nem o tempo mediano, no caso 60 dias, ser aquele em que se encontra uma maior massa seca, exceto em calos de sementes imaturas. Os calos de *P. tenuifila* foram cultivados por mais tempo do que os calos de *P. setacea*, pois apresentaram crescimento mais lento, o que dificultaria a obtenção de amostras para as análises posteriores.

Em cada tipo de calo de *P. tenuifila*, o teor de água aumentou com o tempo de cultivo (Tabela 7). Os maiores teores de água dos calos ocorreram aos 60 dias, em calos de sementes imaturas (94,50%) e em caules em sacarose (93,93%) e aos 75 dias, em calos de caules em frutose (95,91%). Em todos os tempos de cultivo os calos de caule em frutose apresentaram valores superiores de teor de água em relação aos demais tratamentos. Os resultados indicam que a frutose favoreceu o acúmulo de água pelos calos de caule em relação à sacarose.

**Tabela 7.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os teores de água (% da massa fresca) de calos de *Passiflora tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	92,76 $\pm$ 1,080 Bc	94,50 $\pm$ 0,421 Ba	94,32 $\pm$ 0,598 Bb
Caules (frutose)	95,85 $\pm$ 0,374 Ab	95,21 $\pm$ 0,471 Ac	95,91 $\pm$ 0,222 Aa
Caules (sacarose)	92,17 $\pm$ 0,383 Cb	93,93 $\pm$ 0,304 Ca	91,58 $\pm$ 0,741 Cc

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 10 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Os máximos valores de razão massa seca/massa fresca de calos de *P. tenuifila* foram observados aos 45 dias cultivo, em calos de sementes imaturas (72 mg/g); aos 45 dias e 75 dias, em calos de segmentos de caule cultivados em sacarose (77 mg/g e 84 mg/g) e aos

60 dias, em calos de caule cultivados em frutose (45 mg/g) (Tabela 8). Aos 45 dias e 60 dias de cultivo os calos de sementes imaturas e os calos de caule em sacarose apresentaram os maiores acúmulos de massa seca por grama de massa fresca, quando comparados com os calos de caule cultivados em frutose, nos mesmos períodos de cultivo. Os resultados indicam a superioridade da sacarose em manter valores maiores de razão massa seca/massa fresca dos calos em relação à frutose, em calos de caule, em todos os períodos de cultivo.

**Tabela 8.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a razão massa seca/massa fresca (mg/g) de calos de *Passiflora tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	72 $\pm$ 1 Aa	55 $\pm$ 4 Ab	57 $\pm$ 6 Bb
Caules (frutose)	41 $\pm$ 4 Bb	48 $\pm$ 5 Ba	41 $\pm$ 2 Cb
Caules (sacarose)	77 $\pm$ 4 Aa	61 $\pm$ 3 Ab	84 $\pm$ 7 Aa

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de no mínimo 3 e no máximo 10 repetições seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

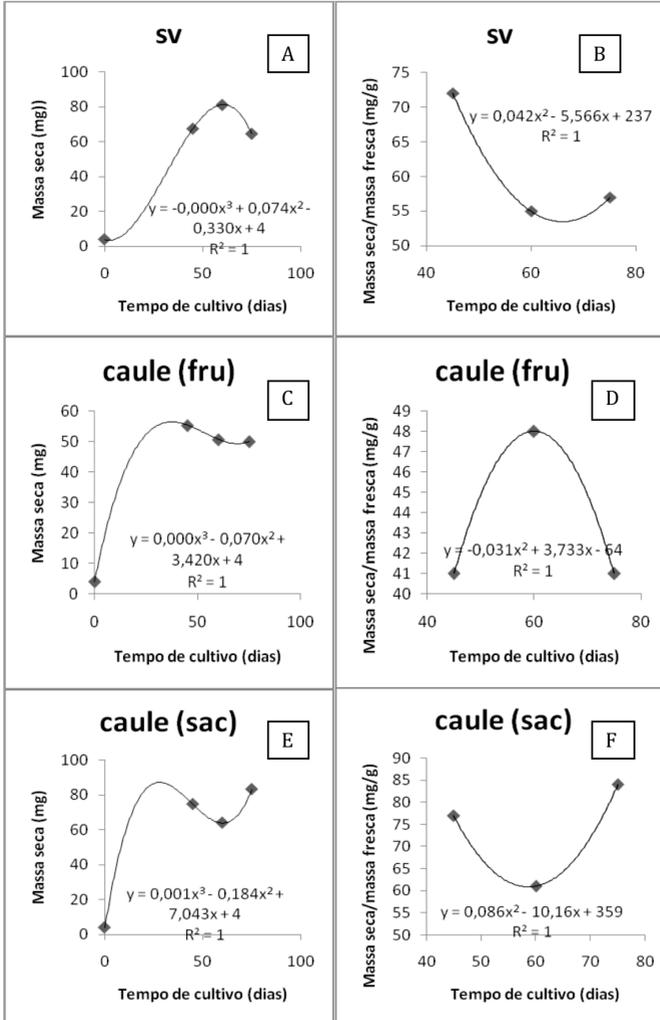
As análises de correlação linear simples (ao nível de 5%) realizadas entre massa seca e tempo de cultivo dos calos de *P. tenuifila*, apesar de indicarem associação linear altamente positiva ( $0,887 < r < 0,940$ ), os valores de  $r$  não foram significativos para nenhum tipo de calo. Para os calos de *P. tenuifila* os tempos escolhidos para as análises de crescimento foram de 45, 60 e 75 dias, pois observações anteriores pareceram indicar um crescimento mais lento dos calos, em relação aos calos de *P. setacea*. Como o objetivo era também conseguir a máxima biomassa seca para as análises posteriores dos metabólitos e, aos 30 dias de cultivo, a biomassa, para todos os tipos de calos dessa espécie, parecia menor, optou-se pelos períodos mais prolongados de análise acima.

As curvas de crescimento em massa seca, em função do tempo de cultivo dos calos de *P. tenuifila* (Fig. 6A, C, E) foram melhor descritas, para todos os tipos de explantes, por funções quadráticas (polinômios de terceiro grau). Observa-se que, a fase exponencial de crescimento ocorreu até os 45 dias de cultivo, em calos de sementes imaturas, havendo a desaceleração do crescimento, após esse período, enquanto que em calos de caules cultivados em frutose e sacarose a desaceleração do crescimento pareceu ocorrer antes dos 45 dias de cultivo.

As curvas de crescimento em sacarose e frutose sugerem que o máximo crescimento foi atingido antes dos 45 dias e que, nos períodos analisados os calos já estariam na fase de desaceleração do crescimento. Observa-se, também, o início de uma segunda fase de crescimento, a partir de 60 dias. Novos experimentos devem ser conduzidos, com o períodos de análise entre 0 e 45 dias, para definir com precisão o início da fase de desaceleração do crescimento e com períodos de análise posteriores a 75 dias, para confirmar a existência de uma segunda fase de crescimento.

Wolfart (2015) observou que em calos de *P. tenuifila* houve diferença no acúmulo de biomassa, em função da fonte de carbono e concentração de ANA utilizado. Em calos oriundos de caules, cultivados em meio com sacarose, constatou que houve maior massa seca do que com outras fontes de carbono, fato este também comprovado no presente trabalho, em que o calo cultivado em sacarose apresentou maior massa seca do que o calo cultivado em frutose. Wolfart (2015) ainda constatou que houve um alongamento celular e a presença de corpos eletrodensos, que correspondem a compostos fenólicos nas células.

Os resultados obtidos sobre as dinâmicas de crescimento dos diferentes tipos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, permitiram definir o melhor tipo de explante e o período de cultivo mais adequado, para viabilizar a maior produção de biomassa seca em futuros experimentos, visando a otimização da produção de metabólitos secundários por culturas de calos. Para *P. tenuifila* foi possível, também, definir qual a melhor fonte de carbono que propiciará o maior incremento em massa seca dos calos.



**Figura 6.** Relação entre massa seca (A, C, E) e tempo de cultivo e entre razão massa seca/massa fresca e tempo de cultivo (B, D, F) de calos de *P. tenuifila* originados a partir de sementes imaturas (sv), e de segmentos de caules cultivados por 45, 60 e 75 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM (sementes imaturas e caules- caule sac) ou frutose 88,5 mM (caules- caule fru) e 0,2% de Phytigel.

## 5.2 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o rendimento de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*

Existem vários métodos e solventes, que podem ser empregados na extração de compostos de material vegetal, como em estudos de análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante. Muitos fatores podem influenciar a eficiência da extração, tais como: tipo de solvente, temperatura, número de etapas de extração, pH, tamanho das partículas da amostra.

Grande parte dos ácidos fenólicos de plantas estão localizados em vacúolos e são extraídos utilizando-se solventes alcoólicos ou orgânicos (PRADO *et al.*, 2012). Dentre os solventes mais comumente utilizados estão: etanol ou etanol/água, metanol ou metanol/água, acetato de etila, acetona ou acetona/água (ARNAO *et al.*, 2001; CAETANO *et al.*, 2005; FURLAN *et al.*, 2009).

A extração é uma etapa importante, em estudos de análises de compostos fenólicos, pois os resultados das análises realizadas posteriormente à extração, seja a quantificação ou a atividade, são obtidos em função do conteúdo de substâncias presentes nos extratos. Alguns estudos são voltados apenas para testar a eficiência de solventes de extração, devido à importância desta etapa. (PELLEGRINI *et al.*, 2007; ROCKENBACH *et al.*, 2008).

A extração utilizada neste estudo foi a extração etanólica 96%, empregada devido ao etanol ser um bom solvente de extração, apresentar facilidade de manipulação e pelo custo. Devido à baixa quantidade de material vegetal disponível, o rendimento não foi quantificado em triplicata.

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados de rendimento da extração, obtidos com os diferentes calos de ambas as espécies estudadas. Observa-se que os rendimentos dos calos de *P. setacea* (Tabela 9) foram maiores nos calos cultivados por 30 dias, destacando-se o rendimento de nó foliar, de 39,1%.

**Tabela 9.** Rendimento (%) de extratos de *Passiflora setacea* oriundos de diferentes calos e tempos de cultivo, crescidos em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	24,8	8,9	9,8
Hipocótilo	22,6	9,8	10,8
Nó cotiledonar	20,8	11,8	9,8
Nó foliar	39,1	6,7	6,6
Cotilédone	18,2	7,8	10,4
Caule	16,7	6,0	7,5

Analisando-se os resultados da espécie *P. tenuifila* (Tabela 10), para os calos de sementes imaturas, o maior rendimento foi observado no cultivo de 45 dias, enquanto que para os calos provenientes de caules cultivados em frutose, o maior rendimento da extração foi obtido após o tempo de 60 dias de cultivo. Entre os calos de *P. tenuifila*, destacaram-se os provenientes de sementes imaturas, com um rendimento de 16,5%.

Comparando-se as duas espécies, observa-se que a média de rendimento geralmente foi maior no menor tempo de cultivo, diminuindo o rendimento em função ao aumento do tempo de cultivo.

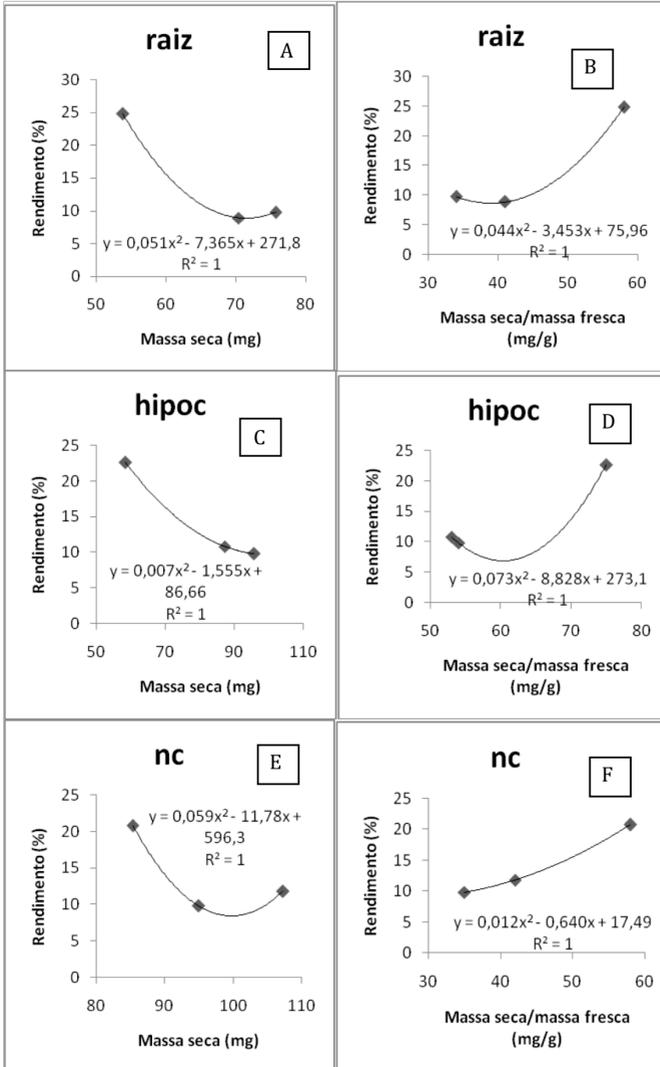
**Tabela 10.** Rendimento (%) de extratos de *Passiflora tenuifila* oriundos de diferentes calos e tempos de cultivo, crescidos em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Semente imatura	16,5	10,3	10,2
Caule (frutose)	4,6	14,3	8,6
Caule (sacarose)	10,0	10,5	-

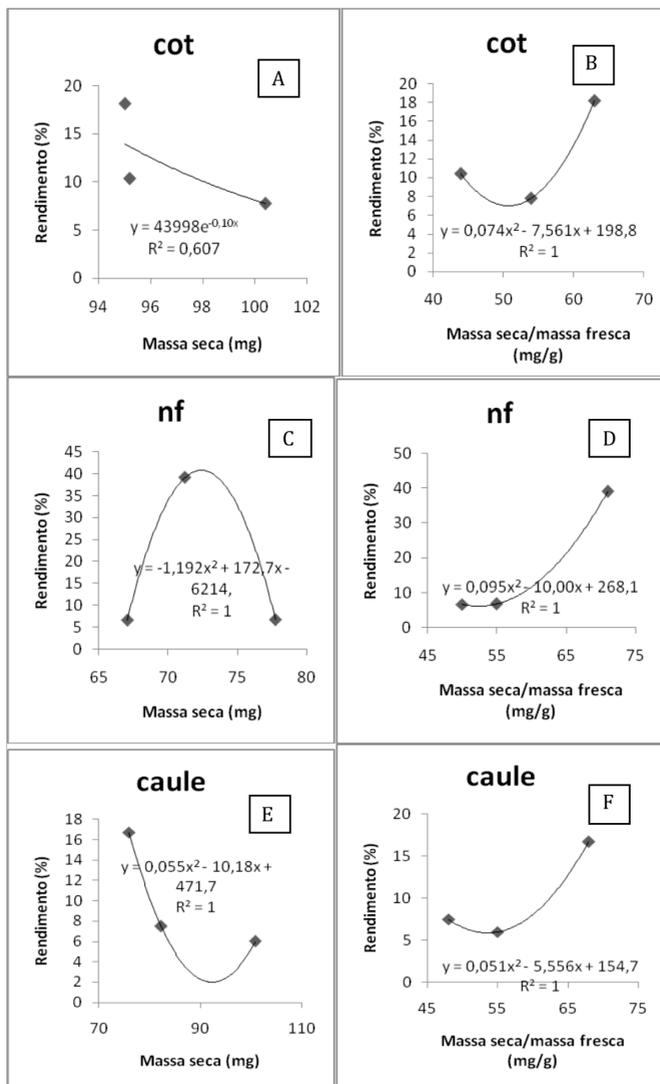
(- tratamento não analisado).

As análises de correlação linear simples (ao nível de 5%) entre rendimento do extrato (%) e massa seca dos calos e entre rendimento e razão massa seca/massa fresca dos calos indicaram alta associação linear negativa entre rendimento e massa seca, apenas para os calos de raiz e hipocótilo ( $r = -0,960$  e  $-0,988$ ) e média e negativa, para os demais tipos de calos ( $-0,714 < r < -0,784$ ), não sendo significativos para nenhum dos tipos de calos de *P. setacea*. Esses valores, porém, foram menores do que os obtidos entre rendimento e razão massa seca/massa fresca, em todos os tipos de calos, exceto cotilédone. Os coeficientes de correlação indicaram alta associação linear positiva, apesar de não significativos ( $0,886 < r < 0,993$ ), indicando que a maior correlação do rendimento foi com a razão massa seca/massa fresca.

As análises dos gráficos de rendimento dos calos de *P. setacea*, em função da massa seca, que mostram os perfis de variação entre esses dois parâmetros, para os diferentes tipos de calo, indicam que em todos os tipos, o rendimento máximo verificado aos 30 dias de cultivo diminuiu, progressivamente, com aumento em massa seca dos calos (Fig. 7 A, C, E e Fig. 8 A, E). Apenas em calos de nó foliar o rendimento aumentou com a massa seca, até os 45 dias de cultivo, decrescendo em seguida (Fig 6 B). Em todos os calos de *P. setacea* observa-se, nas curvas de rendimento em função da razão massa seca/massa fresca a tendência do aumento do rendimento com o aumento da razão (Figs. 7 e 8 B, D, E).



**Figura 7.** Relação entre rendimento e massa seca/massa fresca (A, C, E) e entre rendimento e massa seca (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de raiz, hipocótilo (hipoc) e nó cotiledonar (nc) cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 8.** Relação entre rendimento e massa seca/massa fresca (A, C, E) e entre rendimento e massa seca (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de cotilédone (cot), nó foliar (nf) e caule cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.

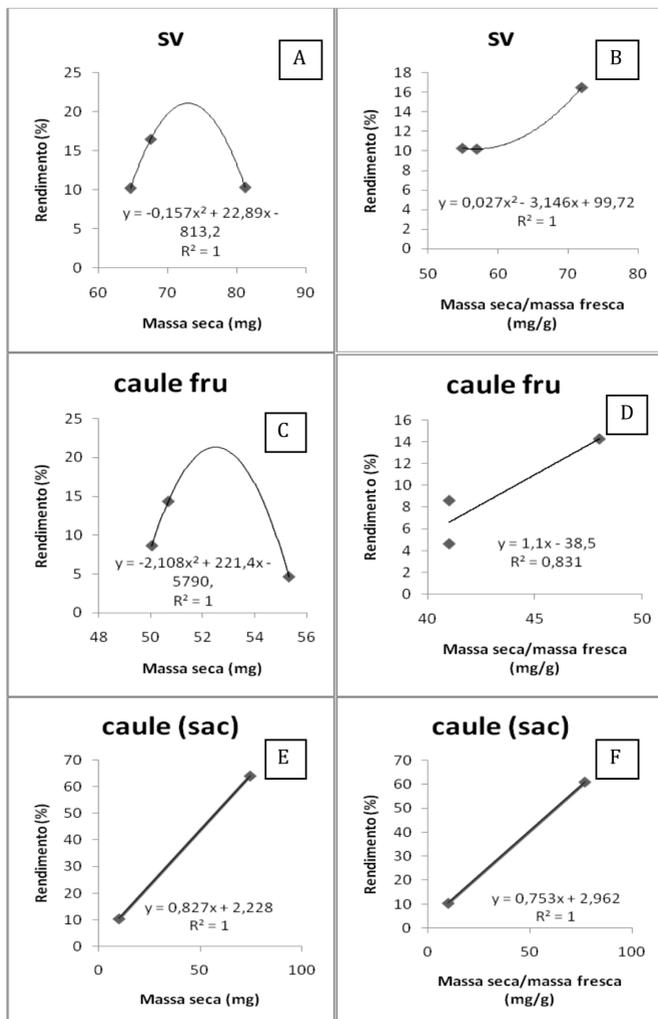
Já as análises dos gráficos de rendimento dos calos de *P. tenuifila*, em função da massa seca, indicaram que nos calos de sementes imaturas e calos de caule em frutose, o rendimento aumentou com o aumento em massa seca, até os 60 dias de cultivo, diminuindo aos 75 dias (Fig. 9 A, C). A mesma tendência de aumento foi observada em calos de caule em sacarose, até os 60 dias de cultivo (Fig. 9 E). Esse padrão de variação entre rendimento e massa seca foi diferente dos observados em todos os calos de *P. setacea*, exceto de nó foliar. A mesma tendência de aumento do rendimento dos calos com o aumento da razão massa seca/massa fresca, observada em *P. setacea*, ocorreu nos calos de *P. tenuifila* (Fig. 9 B, D, F).

Neto (2015) realizou a extração de folhas e caules de *P. setacea* e *P. tenuifila*, usando etanol 60% como solvente, e obteve um rendimento de e 18,7% e 13,8%, respectivamente. Almeida (2014) obteve extratos etanólicos a 60% de partes aéreas de *P. edulis* e *P. setacea*, e conseguiu um rendimento de 17,3% e 18,7%, respectivamente. Os resultados obtidos por Neto (2015) e Almeida (2014) para *P. setacea* foram consideravelmente menores do que os obtidos para os calos de *P. setacea* no presente estudo. Já o resultado de Neto (2015) para *P. tenuifila* foi similar ao deste presente estudo.

Gomes (2013) utilizou um sistema de extração acelerada com etanol 64% como solvente, em folhas de diversas espécies de Passiflora, inclusive *P. setacea* e *P. tenuifila*, obtendo um rendimento de 38,9% e 32,5%, respectivamente, sendo o rendimento de *P. setacea* similar ao obtido neste estudo.

Moresco (2014) utilizou a mesma metodologia utilizada neste estudo, para a extração de folhas de algumas espécies de Myrtaceae, como Guaramirim (*Myrcia splendens*) e Araçá (*Psidium cattleianum*), obtendo rendimentos que variaram de 8,6% a 17,0%. De maneira geral, é possível afirmar que neste estudo obteve-se bons rendimentos nas extrações dos calos. Como já mencionado anteriormente, são muitos os fatores que podem influenciar esta extração.

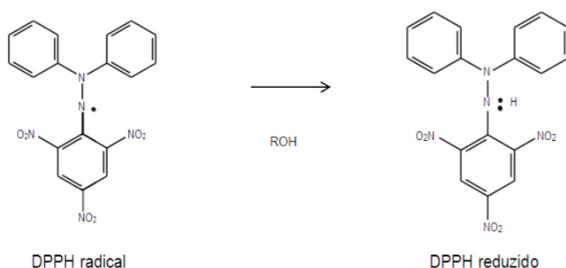
Os resultados indicam que os tipos de explantes e o tempo de cultivo influenciaram os rendimentos dos extratos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* e que, a razão massa seca/massa fresca foi melhor parâmetro que a massa seca, para definir o maior rendimento dos calos, uma vez que houve o aumento do teor de água dos calos no decorrer do tempo de cultivo.



**Figura 9.** Correlação entre rendimento e massa seca/massa fresca (A, C, E) e entre rendimento e massa seca (B, D, F) de extratos de calos de *P. tenuifila* originados a partir de sementes imaturas (sv), e de segmentos de caules cultivados por 45, 60 e 75 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM (sementes imaturas e caules- caule sac) ou frutose 88,5 mM (caules- caule fru) e 0,2% de Phytigel.

### 5.3 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre a atividade antioxidante (ação sequestradora de radical livre DPPH) de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*

A ação sequestradora de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada como método do DPPH. A base deste método é a habilidade redutora dos antioxidantes, presentes na amostra, sobre o DPPH, um radical livre, orgânico e estável, em temperatura ambiente, que em etanol possui uma coloração violácea, e que, através de uma reação de transferência de elétrons (Figura 10), torna-se incolor, o que permite medir, por espectrofotometria, o decréscimo desta absorção (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; BOUCHET *et al.*, 1998).



**Figura 10.** Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) por compostos fenólicos (ROH) (MOLYNEUX *et al.*, 2004).

Este método permite avaliar a atividade antioxidante a partir da reação demonstrada acima. Entretanto, não é específico, uma vez que qualquer substância com a capacidade de reduzir o radical DPPH é mensurada, mas é a metodologia mais empregada para análise de compostos com atividade antioxidante.

As análises fatoriais dos dados, realizadas para verificar os efeitos dos fatores tipo de explante e de tempo de cultivo dos calos sobre o parâmetro atividade antioxidante (atividade sequestradora de DPPH) dos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* indicaram diferenças significativas entre os tratamentos e interação significativa os fatores.

Aos 30 dias de cultivo, os extratos de calos de nó cotiledonar apresentaram a maior atividade antioxidante (70,58% de inibição do DPPH), em relação aos demais tipos de calos, e aos 45 dias de cultivo,

os calos de cotilédone foram superiores (65,55%) (Tabela 11). A menor atividade antioxidante (57,99%), nesse período de cultivo, ocorreu em extratos de calos de caule.

Verifica-se que, em todos os tipos de calos a máxima atividade antioxidante ocorreu aos 30 dias de cultivo, decrescendo nos períodos de cultivo seguintes, exceto em calos de cotilédone, em que a atividade antioxidante foi mantida até os 45 dias de cultivo, no mesmo nível observado aos 30 dias de cultivo e em calos de hipocótilo cultivados por 60 dias, sendo superior ao mesmo tipo de calo cultivado por 45 dias.

Em todos os extratos de calos de cotilédone, hipocótilo e nó cotiledonar foi observada atividade antioxidante superior a 57%, sendo que o melhor resultado foi encontrado no extrato de calos de nó cotiledonar cultivados por 30 dias, com 70,58%.

**Tabela 11.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a atividade antioxidante (100%-DPPH%) de calos de *P. setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	61,05 $\pm$ 0,78 Da	45,51 $\pm$ 1,33 Eb	43,36 $\pm$ 0,88 Bb
Hipocótilo	64,29 $\pm$ 0,88 Ca	57,12 $\pm$ 0,30 Cc	61,56 $\pm$ 0,78 Ab
Nó Cotiledonar	70,58 $\pm$ 0,78 Aa	62,39 $\pm$ 0,81 Bb	59,86 $\pm$ 1,79 Ab
Cotilédone	67,18 $\pm$ 0,59 Ba	65,55 $\pm$ 0,30 Aa	60,88 $\pm$ 1,93 Ab
Nó foliar	67,35 $\pm$ 0,51 Ba	48,33 $\pm$ 0,53 Db	37,75 $\pm$ 2,34 Cc
Caule	57,99 $\pm$ 1,28 Ea	48,85 $\pm$ 0,30 Db	45,40 $\pm$ 1,77 Bc

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Analisando-se as atividades antioxidantes dos calos da espécie *P. tenuifila* (Tabela 12), verifica-se que as maiores atividades antioxidantes ocorreram nos extratos de calos de caule cultivados em frutose por 45, 60 e 75 dias, 59,93%, 60,88% e 56,97%, sendo também

superior a 57%. Nos outros tipos de calos de *P. tenuifila* não foram observados valores superiores a 43% de atividade antioxidante.

Em calos de caule em frutose a atividade antioxidante não se alterou aos 45 e 60 de cultivo, mas diminuiu significativamente aos 75 dias e não houve influência do período de cultivo, em calos de caule em sacarose e em calos de sementes imaturas.

**Tabela 12.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre a atividade antioxidante (100%-DPPH%) de calos de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Semente imatura	41,32 $\pm$ 1,84 Ba	34,86 $\pm$ 3,32 Ca	38,60 $\pm$ 1,84 Ba
Caule (frutose)	59,93 $\pm$ 1,05 Aa	60,88 $\pm$ 1,28 Aa	56,97 $\pm$ 1,79 Ab
Caule (sacarose)	42,17 $\pm$ 1,52 Ba	43,36 $\pm$ 1,84 Ba	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. (- tratamento não analisado).

Malacrida & Jorge (2012) analisaram a atividade antioxidante, utilizando a capacidade de redução de radical DPPH, em extrato em éter de sementes de *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*, e obtiveram uma atividade de 48%, sendo esta 32% menor do que a observada em extrato de nó cotiledonar cultivado por 30 dias de *Passiflora setacea*. Já a atividade antioxidante observada por Sunitha & Devaki (2009) em extrato etanólico de folhas de *P. edulis* foi de 58%, este mesmo resultado foi observado por Prado (2010) em extrato em etanol 80%, de polpa de *P. edulis* Sims. Estes resultados demonstram que os diferentes extratos de *P. edulis* apresentaram valores similares aos obtidos para os calos de *Passiflora setacea* e de *Passiflora tenuifila*, indicando a

possibilidade da utilização dos calos de ambas as espécies para a produção de compostos com atividade antioxidante.

Antognoni *et al.* (2007) utilizaram o teste de DPPH para avaliar a atividade antioxidante de extratos de calos de folhas de *Passiflora quadrangulares*, nos quais estimulou a produção de compostos antioxidantes irradiando a cultura de calos com raios ultravioleta (UV-B). No tratamento controle, sem os raios UV, obtiveram uma atividade antioxidante de máxima de 35%, e no tratamento com a presença de raios UV, observou o aumento da atividade antioxidante, obtendo 49%, valor inferior aos máximos valores obtidos no presente trabalho para os calos de *P. setacea* (70,58% em calos de nó cotiledonar) e *P. tenuifila* (60,88% em calos de caule em frutose), não submetidos a qualquer tipo de elicitação. Antognoni *et al.* (2007) sugeriram a manipulação de calos, por meio de elicitores, para estimular a produção de compostos antioxidantes. A partir dos resultados obtidos com os extratos de calos de *P. setacea* e de *P. tenuifila*, torna-se interessante aplicar esta técnica, visando aumentar, ainda mais a produção de compostos antioxidantes nos calos.

Os extratos dos melhores calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, em que foram observados resultados superiores a 50% de atividade antioxidante, foram analisados quanto à concentração de extrato necessária para reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH (CE50), sendo que quanto menor o valor da CE50 maior é a atividade antioxidante do extrato.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos de concentração efetiva 50% (CE50), de compostos antioxidantes nos extratos de diferentes calos de *P. setacea*. Observa-se que os valores de CE 50 variaram significativamente entre os períodos de cultivo, aumentando, em relação aos 30 dias de cultivo, nos calos de nó cotiledonar, cotilédone e hipocótilo.

Verifica-se que os resultados, em geral, foram melhores em calos cultivados por 30 dias. Entre todos os extratos de calos cultivados por 30 dias, o calo de nó cotiledonar apresentou resultado consideravelmente melhor (CE 50 de 51,93 µg/mL) do que o segundo melhor resultado, extrato de calo de cotilédone (CE50 de 87,14), sendo 40% menor, ou seja, 40% mais eficiente em reduzir o radical DPPH.

**Tabela 13.** Concentração Efetiva 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos de calos de *Passiflora setacea* oriundos de diferentes explantes e tempos de cultivo, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	95,25 $\pm$ 7,15 B	-	-
Hipocótilo	91,02 $\pm$ 7,26 Bb	124,63 $\pm$ 4,93 Aa	90,35 $\pm$ 7,61 Bc
Nó Cotiledonar	51,93 $\pm$ 2,87 Cb	100,61 $\pm$ 5,80 Bb	106,86 $\pm$ 4,7 Aa
Cotilédone	87,14 $\pm$ 4,01 Bb	88,5 $\pm$ 1,72 Cb	105,72 $\pm$ 6,5 Aa
Nó foliar	102,30 $\pm$ 7,42 B	-	-
Caule	124,43 $\pm$ 5,88 A	-	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante.

Para *P. tenuifila* (Tabela 14), apenas em calos de caule cultivados com frutose foi determinada a CE50. O melhor resultado, ou seja, a menor CE50, de 95,48  $\mu\text{g/mL}$  ocorreu em calos cultivados por 45 dias.

**Tabela 14.** Concentração Efetiva 50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extratos de calos *Passiflora tenuifila* oriundos de diferentes explantes e tempos de cultivo, cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (semente imatura) ou 88,5 mM de sacarose ou frutose e 2,5  $\mu\text{M}$  de ANA (caules).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imatura	-	-	-
Caule (frutose)	95,48 $\pm$ 8,72 b	119,88 $\pm$ 6,13 a	129,42 $\pm$ 7,84 a
Caule (sacarose)	-	-	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo.

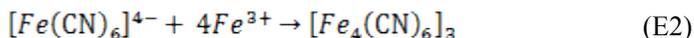
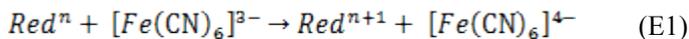
Os resultados de CE 50, observados para ambas as espécies estudadas, indicam que o melhor resultado obtido para o extrato de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, cultivados por 30 dias, foi cerca de 46% mais eficiente, como antioxidante, do que o extrato de calos de caule de *P. tenuifila* crescidos em frutose, por 45 dias.

As espécies *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* foram analisadas quanto à CE 50 de extratos de folhas em etanol 40% por Pineli *et al.* (2015). O resultado obtido indicou, para *P. setacea*, CE 50 equivalente a 783,74 µg/mL, que quando comparado ao melhor resultado obtido para o extrato, em etanol 96%, de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, cultivados por 30 dias, foi 93% inferior. Para *P. tenuifila*, Pineli *et al.* (2015) obtiveram CE 50 equivalente a 1121,80 µg/mL, sendo 91% inferior ao determinado, no presente estudo, em extrato de calos de caule de *P. tenuifila*, cultivado em frutose por 45 dias.

Lugato *et al.* (2014) determinaram a CE 50 em extrato, em etanol 80%, de calos friáveis derivados de segmentos de folha de *Passiflora alata* Curtis, e obteve o resultado equivalente a 12,53 µg/mL. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os extratos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* apresentam potencial como fontes de antioxidantes, estimulando a realização de futuros estudos para viabilizar a otimização da produção *in vitro*, a partir da definição do melhor tipo de explante e melhor tempo de cultivo do calos.

#### **5.4 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o poder redutor (redução do íon férrico) de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila***

A determinação do potencial redutor é um dos diversos métodos capazes de avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra. Cada metodologia de análise de atividade antioxidante difere quanto aos mecanismos de antioxição. O potencial redutor indica a presença de compostos doadores de elétrons, que podem reduzir os intermediários oxidativos do processo de peroxidação lipídica (YEN & CHEN, 1995). O teste do potencial redutor baseia-se na reação de redução de íons férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a íons ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pelos compostos doadores de elétrons (*Red*). Dessa forma, os íons ferricianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) são reduzidos (E1) a ferrocianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) que, por sua vez, formam um complexo com os íons ferro III (E2) de coloração azul intensa (azul da Prússia), apresentando pico de absorção em 720 nm ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ).



As análises fatoriais dos dados, realizadas para verificar os efeitos dos fatores tipo de explante e de tempo de cultivo dos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* sobre o parâmetro poder redutor dos calos indicaram diferenças significativas entre os tratamentos e interação significativa entre os dois fatores analisados.

Aos 30 dias de cultivo, o maior valor de poder redutor (313,11 mg Eq AA (ácido ascórbico) /g extrato seco) foi detectado em extrato de calos de cotilédone de *P. setacea* (Tabela 15). Porém, aos 45 dias de cultivo os extratos de calos de nó cotiledonar apresentaram poder redutor superior (361,39 mg Eq AA/g extrato seco), em relação aos demais tipos de calos e aos 60 dias de cultivo os calos de cotilédone foram superiores (314 mg Eq AA/g extrato seco). O maior potencial redutor encontrado foi em extrato de calo de nó cotiledonar, com 361,39 mg de ácido ascórbico/g do extrato seco.

**Tabela 15.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o poder redutor (mg Eq AA/g extrato seco) de extratos de calos de *P. setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5 µM de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	283,79±4,59 Ca	279,91±2,08 Ba	274,31±1,71 Bb
Hipocótilo	297,59±1,94 Ba	295,65±24,90 Ba	293,71±16,85 Ba
Nó Cotiledonar	306,42±0,99 Ba	361,39±21,76 Aa	272,80±3,32 Ba
Cotilédone	313,11±6,17 Aa	299,96±4,12 Ba	314,83±22,00 Aa
Nó foliar	291,55±0,75 Ba	268,92±0,37 Bb	263,96±1,12 Cc
Caule	280,34±4,54 Da	288,53±2,82 Ba	267,19±6,56 Cb

Valores são médias ± desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. EqAA= equivalente de ácido ascórbico.

Observa-se que, nos calos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone, os valores de poder redutor dos extratos não variaram significativamente, durante o decorrer do período de cultivo dos calos, mas em extratos de calos de raiz e caule os valores mantiveram-se similares, até 45 dias de cultivo e diminuíram, aos 60 dias. Apenas em calos de nó foliar é que o poder redutor dos extratos diminuiu progressivamente com o tempo de cultivo.

A partir dos resultados de potencial redutor obtidos com a espécie *P. tenuifila* (Tabela 16), verifica-se que o poder redutor dos calos de caule em sacarose foi superior, aos 45 dias de cultivo, em relação aos demais tipos de calos (287,45 mg Eq AA/g extrato) (Tabela 16). Contudo, aos 60 dias os calos de caule em sacarose e frutose apresentaram valores de poder redutor semelhantes e significativamente superiores aos calos de sementes imaturas. Comparando-se os melhores resultados das duas espécies analisadas neste estudo, verifica-se um maior potencial redutor no extrato bruto de *P. setacea*, sendo 20,5% maior quando comparado com a espécie *P. tenuifila*.

**Tabela 16.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre o poder redutor (mg Eq AA/g extrato seco) de extratos de calos de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de frutose ou sacarose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caule); ou com sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (sementes imaturas).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	259,43 $\pm$ 2,24 Ca	254,69 $\pm$ 0,99 Ba	258,57 $\pm$ 4,85 Ba
Caule (frutose)	276,25 $\pm$ 4,24 Ba	274,74 $\pm$ 1,63 Aa	275,38 $\pm$ 5,38 Aa
Caule (sacarose)	287,45 $\pm$ 5,50 Aa	271,72 $\pm$ 3,23 Ab	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. Eq AA= equivalente de ácido ascórbico. (- tratamento não analisado).

Observa-se que, em calos de caule em frutose e em calos de sementes imaturas os valores de poder redutor não variaram significativamente com os períodos de cultivo. Apenas em calos de caule em sacarose foram detectadas diferenças entre os 45 e 60 dias de cultivo, com decréscimo do poder redutor em função do tempo de cultivo.

Moresco (2010) utilizou a mesma metodologia empregada para a determinação do potencial redutor em extratos em etanol 96%, de partes aérea de carambola (*Averrhoa carambola*) e araçá (*Psidium cattleianum*), e obteve 98,02 mg Eq AA/g de extrato de *A. carambola* e 274,30 mg Eq AA/g do extrato de *P. cattleianum*. Queiroz (2012) e Mamede (2010) também empregaram a mesma metodologia. Queiroz (2012) detectou poder redutor de 146,60 mg Eq AA/g no extrato de ciruela (*Bunchosia armeniaca*) e também em diferentes frações, observando o maior resultado na fração em acetato de etila, com 270,30 mg Eq AA/g de amostra. Mamede (2010) verificou o potencial redutor de extrato do fungo, *Pisolithus microcarpus*, e obteve melhor resultado também na fração em acetato de etila, com 346,10 mg Eq AA/g de amostra.

O potencial redutor do extrato de *P. cattleianum* foi similar ao extrato de calo de caule de *P. tenuifila*, mas foi 24% menor quando comparado ao extrato de nó cotiledonar de *P. setacea*. Já o resultado de *P. microcarpus* foi similar ao de *P. setacea*. O esperado é que haja um potencial redutor maior em frações em acetato de etila, do que em outros solventes e até mesmo do que em extrato bruto, pois está relacionado ao maior conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides presentes nestas frações (MAMEDE, 2010; QUEIROZ, 2012; MORESCO, 2014).

Os resultados, apresentados pelos extratos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* indicam que o tipo de explante e o tempo de cultivo dos calos influenciaram o poder redutor e o potencial de utilização dos calos em futuros estudos, como fontes de poder redutor, apresentando vantagens devido à facilidade e rapidez da produção de biomassa, especialmente em *P. setacea*.

### **5.5 Comparação entre os padrões de variação da atividade antioxidante (ação sequestradora de radical livre DPPH) e pelo poder redutor (redução do íon férrico), de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* em função do tipo de explante e tempo de cultivo**

Os valores de  $r$  obtidos, através das análises de correlação linear simples (ao nível de 5%) entre poder redutor e tempo de cultivo dos calos de *P. setacea* indicaram alta associação linear negativa, apenas para os calos de raiz e nó foliar ( $r = -0,994$  e  $-0,937$ , não significativos) e perfeita negativa ( $r = -1$ , significativo a 5 % de probabilidade), para hipocótilo. Em todos os outros casos a associação linear foi baixa e negativa, apenas em cotilédone foi baixa e positiva. Para a atividade sequestradora de DPPH, em função do tempo de cultivo, os valores de  $r$  indicaram alta associação linear negativa ( $-0,916 < r < -0,986$ , não significativos) em todos os tipos de calos, exceto em calo de hipocótilo, em que houve baixa associação linear negativa.

Os gráficos obtidos através das análises de regressão não linear simples para o poder redutor em função do tempo de cultivo de calos de *P. setacea* (Fig. 11 A, C, E e Fig. 12 A, C, E) indicam ter havido, nos calos de raiz, hipocótilo e nó foliar (Fig. 11 A, C e Fig. 12 C), o decréscimo contínuo do poder redutor dos extratos com o aumento do tempo de cultivo dos calos, enquanto que nos calos de nó cotiledonar e caule observa-se que o poder redutor dos calos apresentou um padrão diferente de variação, aumentando, até os 45 dias de cultivo e declinando, drasticamente, no período de cultivo seguinte (Fig. 11 E e 12 E). Apenas em calos de cotilédone o padrão de variação do poder redutor diferiu dos demais tipos de calos, caindo, entre 30 e 45 dias de cultivo e aumentando acentuadamente para valor similar ao observado aos 30 dias (Fig. 11 A). Houve, portanto, similaridade entre os padrões de variação do poder redutor em função do tempo de cultivo em calos de raiz, hipocótilo e nó foliar e entre calos de nó cotiledonar e caule.

Os padrões de variação da atividade sequestradora de DPPH em função do tempo de cultivo de calos *P. setacea* (Fig. 11 B, D, F e Fig. 12 B, D, F) indicam que, em todos os calos, exceto hipocótilo, houve o decréscimo acentuado e contínuo, sendo os padrões similares entre os calos de raiz, nó cotiledonar, nó foliar e caule. Em calos de cotilédone observa-se, pelo tipo de linha de tendência, que a queda, entre 30 e 45 dias, pareceu ser mais lenta. Em calos de hipocótilo o padrão de variação diferiu dos demais, ocorrendo a queda drástica da ação

sequestradora do DPPH até os 45 dias de cultivo, seguida de um aumento, no período seguinte (Fig. 11 D).

Apenas nos calos de raiz e nó foliar os padrões de variação do poder redutor em função do tempo acompanharam as variações na atividade sequestradora de DPPH. Nos demais tipos de calos observa-se a similaridade entre os perfis apenas em certos períodos do ciclo de cultivo. Em calos de hipocótilo, entre 45 e 60 dias de cultivo a atividade sequestradora de DPPH aumentou, enquanto o poder redutor continuou caindo; em calos de cotilédone, ocorreu o contrário, o poder redutor aumentou enquanto a atividade sequestradora de DPPH decresceu. Em calos de caules, por outro lado, o poder redutor aumentou, entre 30 e 45 dias enquanto que a atividade antioxidante diminuiu, nesse período.

Para *P. tenuifila*, as análises de correlação linear simples entre o poder redutor e atividade sequestradora de DPPH geraram valores de coeficientes de correlação linear simples ( $r$ ), que indicaram média e baixa associação linear negativa para os calos de caule em frutose e calos de sementes imaturas.

Os gráficos obtidos através das análises de regressão não linear simples indicaram padrões de variação do poder redutor (Fig. 13 A) e da atividade sequestradora de DPPH (Fig. 13 B), em função do tempo de cultivo, de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* foram semelhantes. Verifica-se que o poder redutor e a atividade sequestradora de DPPH diminuíram, até 60 dias de cultivo, aumentando no período seguinte, seguindo o mesmo padrão de variação do poder redutor, em calos de cotilédone (Fig. 12 A) e de atividade sequestradora de DPPH, em calos de hipocótilo (Fig. 11 D) de *P. setacea*.

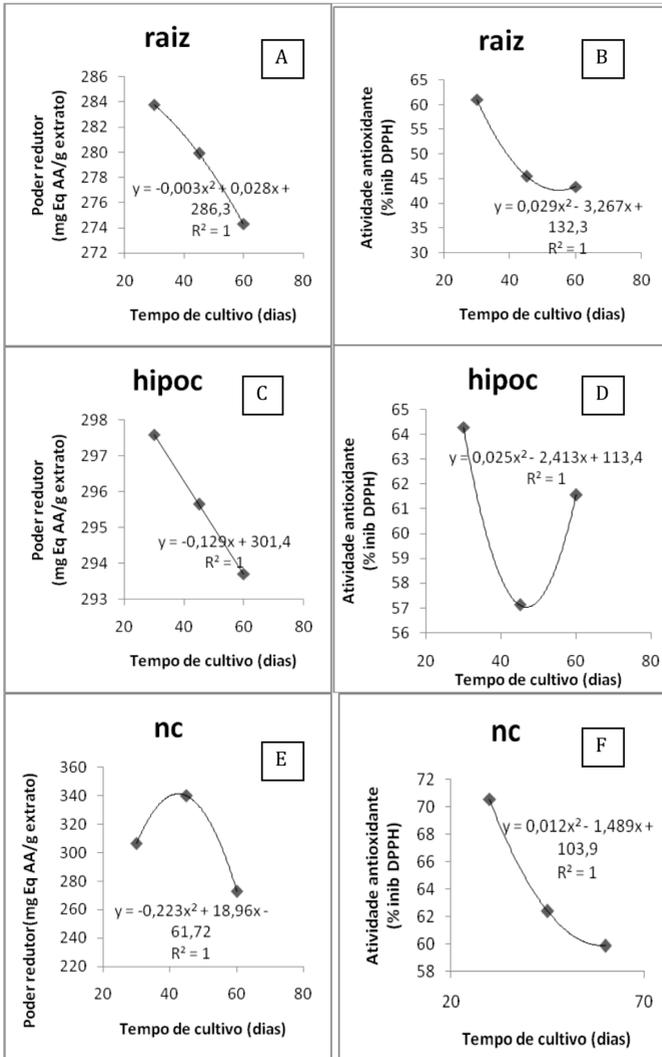
Os calos de caule em frutose apresentaram o mesmo padrão de variação de poder redutor que calos de hipocótilo e cotilédone de *P. setacea*, porém o padrão de variação da atividade sequestradora de DPPH diferiu, aumentando, até os 60 dias de cultivo e decrescendo, após esse período (Fig. 13 C, D), padrão não observado para a atividade antioxidante em calos de *P. setacea*.

Nas Figuras 13 E e F, verifica-se que os calos de caule em sacarose apresentaram tendência de queda do poder redutor, semelhante aos calos de hipocótilo de *P. setacea* e aos demais calos de *P. tenuifila*, e de aumento da atividade sequestradora de DPPH, até o período de cultivo analisado, de 60 dias, padrão esse apenas observado nos calos de caule de *P. tenuifila* em frutose.

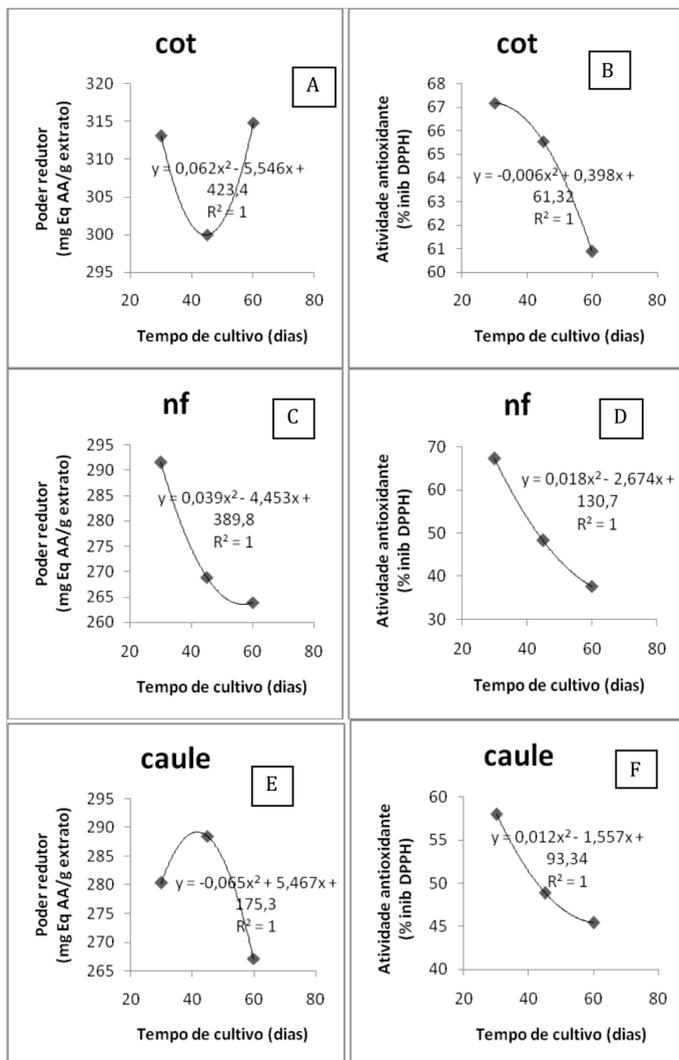
Esses resultados mostram que, para um mesmo tipo de calo de *P. setacea* (ex. nó cotiledonar, cotilédone e caule) e *P. tenuifila* (ex.

caule em frutose, caule em sacarose), o máximo poder redutor e a máxima ação sequestradora de DPPH, nem sempre ocorreram no mesmo período de cultivo. Portanto, nesses casos, os calos apresentaram diferentes cinéticas de biossíntese dos compostos responsáveis pelo poder redutor e pela ação sequestradora de DPPH, que dependeram do tempo de cultivo e do tipo de explante que originou os calos.

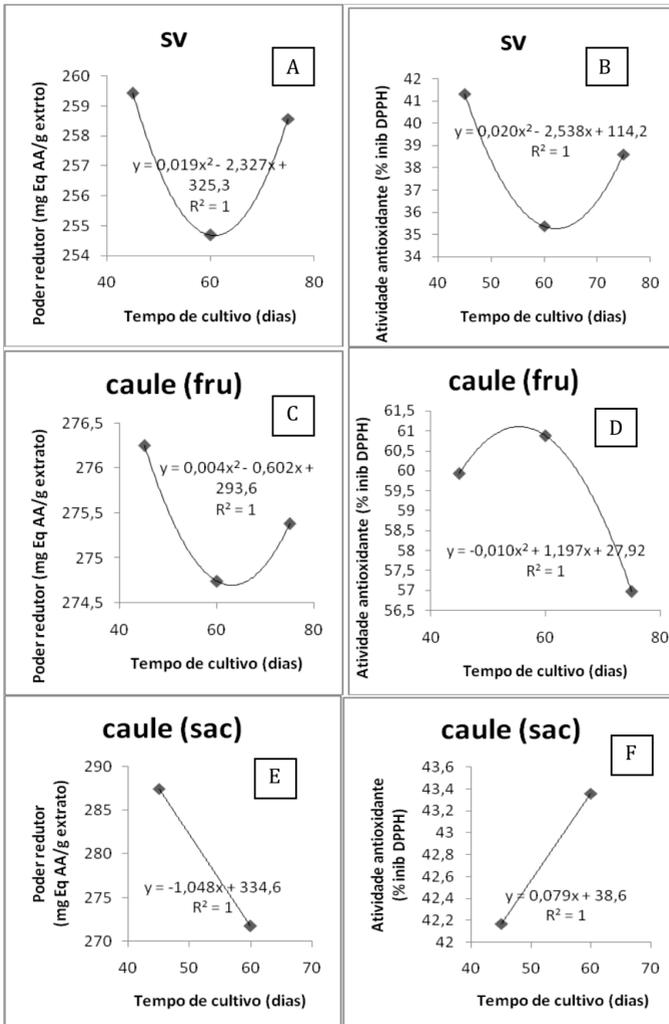
Portanto, os resultados aqui obtidos permitiram selecionar, para *P. setacea* e *P. tenuifila*, os melhores tipos de calo e, para cada tipo de calo, identificar os melhores tempos de cultivo para otimizar a produção de antioxidantes, sejam eles compostos responsáveis pelo poder redutor ou pela ação sequestradora de DPPH.



**Figura 11.** Relação entre poder redutor e tempo de cultivo (A, C, E) e entre atividade sequestradora de DPPH (% inibição DPPH) e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de raiz, hipocótilo (hipoc) e nó cotiledonar (nc) cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 12** Relação entre poder redutor e tempo de cultivo (A, C, E) e entre atividade sequestradora de DPPH (% inibição DPPH) e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de cotilédone (cot), nó foliar (nf) e caule cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 13.** Relação entre poder redutor e tempo de cultivo (A, C, E) e entre atividade sequestradora de DPPH (% inibição DPPH) e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos *P. tenuifila* originados a partir de sementes imaturas (sv), e de segmentos de caules cu cultivados por 45, 60 e 75 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM (sementes imaturas e caules- caule sac) ou frutose 88,5 mM (caules- caule fru) e 0,2% de Phytigel.

## 5.6 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o teor de compostos fenólicos totais de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*

A quantidade de compostos fenólicos nas plantas geralmente indica a atividade antioxidante, a partir deste fato e dos resultados obtidos no presente trabalho sobre a atividade antioxidante dos extratos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram desenvolvidos estudos para verificar o teor destes compostos nos extratos dos calos estudados. A determinação de compostos fenólicos totais utiliza o reativo de Folin-Ciocalteu, que consiste na mistura de ácido fosfomolibdídico e ácido fosfotúngstico, em que o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+. Quando este reagente entra em contato com agentes redutores, como os compostos fenólicos, em meio básico (fenolato), estes são oxidados, formando os complexos molibdênio azul e tungstênio azul, permitindo a determinação da concentração das substâncias redutoras por meio da coloração (WATERMAN & MOLE, 1994; SOUSA *et al.*, 2007).

As análises fatorias dos dados, realizadas para verificar os efeitos dos fatores tipo de explante e tempo de cultivo dos calos sobre o parâmetro teor de fenólicos totais de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* indicaram diferenças significativas entre os tratamentos, porém, a interação entre os dois fatores analisados foi significativa para *P. setacea* e não significativa para *P. tenuifila*.

Os níveis de fenólicos totais nos extratos de calos de *P. setacea* variaram significativamente entre os diferentes tipos de calos e, em cada tipo de calo, entre os tempos de cultivo (Tabela 17). Aos 30 dias de cultivo, o maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no extrato de calo de nó cotiledonar, com 43,73 mg Eq AG (ácido gálico) /g de extrato seco), enquanto que aos 45 e 60 dias de cultivo os calos de cotilédone apresentaram valores superiores em relação aos demais tipos de calos (35,99 e 40,24 mg Eq AG/g extrato seco, respectivamente). Calos de caule produziram os menores níveis de fenólicos totais, em todos os tempos de cultivo.

Verifica-se que, em todos os tipos de calo, exceto hipocótilo, cotilédone e caule, os teores de fenólicos totais diminuíram em relação aos 30 dias de cultivo, em que foram observados os máximos valores. Em calos de hipocótilo e cotilédone, ao contrário, os fenólicos totais aumentaram aos 60 dias de cultivo para os mesmos níveis detectados

aos 30 dias de cultivo. Apenas em calos de caule não foram detectadas diferenças significativas entre os níveis de fenólicos, nos diferentes períodos de cultivo. E, apenas em calos de nó cotiledonar e nó foliar, os fenólicos totais caíram para níveis menores do que os detectados aos 45 dias.

**Tabela 17.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de fenólicos totais (mg Eq AG/g extrato seco) de calos de *P. setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	34,24 $\pm$ 0,46 Ba	24,64 $\pm$ 0,43 Cc	28,39 $\pm$ 0,57 Db
Hipocótilo	35,74 $\pm$ 0,75 Ba	31,29 $\pm$ 1,43 Bb	33,59 $\pm$ 0,09 Ba
Nó Cotiledonar	43,73 $\pm$ 0,52 Aa	32,29 $\pm$ 0,61 Bb	29,74 $\pm$ 0,09 Cc
Cotilédone	38,79 $\pm$ 0,15 Ba	35,99 $\pm$ 0,83 Ab	40,24 $\pm$ 0,83 Aa
Nó foliar	36,59 $\pm$ 0,83 Ba	22,79 $\pm$ 0,43 Cb	25,14 $\pm$ 0,15 Ec
Caule	27,70 $\pm$ 0,98 Ca	23,74 $\pm$ 0,38 Ca	22,94 $\pm$ 0,23 Fa

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. Eq AG = equivalente de ácido gálico.

Analisando-se os resultados obtidos para os calos de *P. tenuifila* observa-se que, após 45 dias de cultivo, os calos de caule em frutose apresentaram níveis de fenólicos totais superiores (24,79 mg Eq AG/g extrato seco) aos calos de caule em sacarose (17,39 mg Eq AG/g extrato) e aos calos de sementes imaturas (22,89 mg Eq AG/g extrato) (Tabela 18). Porém, aos 60 dias de cultivo os teores de fenólicos totais nestes dois tipos de calos foram similares, mas continuaram superiores aos observados em calos de caule em sacarose. Os maiores teores de compostos fenólicos foram observados nos extratos de calos de caule cultivados em frutose, independente do tempo de cultivo, e também em calos de sementes imaturas, cultivados por 60 dias.

Nos calos de caules em frutose e de sementes imaturas, os níveis de fenólicos totais não variaram significativamente, com os períodos de cultivo. Apenas em calos de caule em sacarose, os níveis de fenólicos aumentaram com o decorrer do tempo de cultivo dos calos.

**Tabela 18.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de fenólicos totais (mg Eq AG/g extrato seco) de calos de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de frutose ou sacarose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caule); ou com sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (sementes imaturas).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	22,89 $\pm$ 0,15 Ba	25,80 $\pm$ 2,17 Aa	20,79 $\pm$ 0,54 Ba
Caule (frutose)	24,79 $\pm$ 0,43 Aa	24,30 $\pm$ 1,89 Aa	25,69 $\pm$ 0,68 Aa
Caule (sacarose)	17,39 $\pm$ 0,23 Cb	19,14 $\pm$ 0,15 Ba	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. EqAG=equivalente de ácido gálico. (- tratamento não analisado).

Considerando-se os melhores resultados obtidos para os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* verifica-se que a maior concentração de compostos fenólicos detectada no extrato bruto de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, (43,73 mg Eq AG/g extrato seco) foi 41% maior, quando comparada com a maior concentração observada em extrato de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*. (25,80 mg Eq AG/g extrato seco). Por meio da técnica que foi utilizada, é importante ressaltar que o resultado é apresentado em equivalentes de ácido gálico, um composto fenólico simples. Portanto, essa metodologia não é específica para subtipos de compostos fenólicos vegetais, e podem ser detectados no teste, além de compostos fenólicos simples, seus polímeros, tais como os taninos hidrolisáveis, além de flavonoides e catequinas, dentre outros.

Neto (2015), quantificou as substâncias fenólicas totais de extratos de partes aéreas de *P. setacea* em etanol 60% e obteve como

resultado uma concentração de 27,05 mg Eq AG/g do extrato seco. Pineli *et al.* (2015) quantificaram 22,17 mg Eq AG/g do extrato em extrato de folhas de *P. setacea* em etanol 40% e em extrato de folhas de *P. tenuifila* em etanol etanólico 40% obtiveram 18,82 mg Eq AG/g do extrato, sendo este resultado 27% menor do que em extrato de semente imatura, obtida neste presente estudo. Quando comparado ao melhor resultado das análises de extrato de folhas conduzidas por estes autores, o calo de nó cotiledonar de *P. setacea* apresentou 38% mais compostos fenólicos totais, do que os teores observados por Neto (2015), e 49.3% mais compostos fenólicos do que o teor obtido por Pineli *et al.* (2015). Pineli *et al.* (2015) observaram uma quantidade de fenólicos totais, em infusões das folhas de *P. setacea* e de *P. tenuifila*, superior aos extratos correspondentes em etanol 40%.

Lugato *et al.* (2014) determinaram o conteúdo total de compostos fenólicos de extratos de calos de *Passiflora alata* Curtis em etanol 80%, e obteve 5,97 mg Eq AA/g do extrato seco, sendo este resultado 86% menor do que o obtido em extrato oriundo de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*. Em extratos de folhas de *Passiflora alata* em etanol 80% esses autores detectaram 34,86 mg Eq AA/g do extrato seco, valor similar aos encontrados em todos os tipos de calos de *P. setacea*, exceto em calos de caule, mas ainda inferior ao obtido nos extratos de calos de nó cotiledonar.

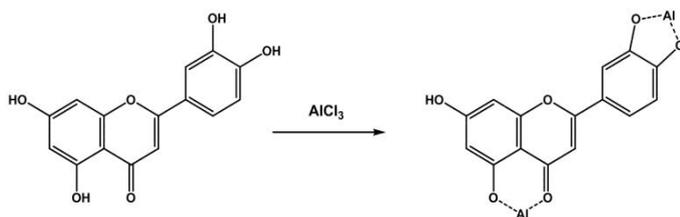
Ritter Netto (2014) analisou o teor de compostos fenólicos de partes aéreas de *Passiflora alata*, obtendo 16,8 mg de ácido gálico/g do extrato seco, sendo aproximadamente 62% menor que o teor de fenólicos totais de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*. Soares *et al.* (2005) observaram um incremento de compostos fenólicos em raízes de *Passiflora edulis* inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares, segundo Moreira & Siqueira (2002), plantas inoculadas com fungos podem estimular a síntese da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), que regula a produção dos metabólitos formados pela via do chiquimato, resultando no aumento da síntese dos compostos fenólicos.

Os resultados indicam o potencial de utilização dos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, para a produção *in vitro* de compostos fenólicos, além de poderem ser utilizados em futuras manipulações com elicitores e até mesmo a estimulação da síntese da PAL.

### 5.7 Efeito de diferentes tipos de explante e períodos de cultivo sobre o teor de flavonoides de extratos de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*

A atividade antioxidante está relacionada, de modo geral, com a presença de polifenóis e em particular dos flavonoides, em função disso avaliou-se o teor destes compostos nos extratos. Os flavonoides possuem estrutura ideal para sequestrar radicais livres, sendo antioxidantes mais eficientes do que as vitaminas C e E (CAO *et al.*, 1997). A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura química e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e/ou elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006). De modo geral, quanto maior o número de hidroxilas presentes na estrutura, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO *et al.*, 1997).

Assim, a determinação do teor de flavonoides nos calos das duas espécies estudadas foi realizada através do método da complexação com o reagente  $\text{AlCl}_3$ . Este agente complexante forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonoides (Figura 14), proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de UV-VIS (WOISKY & SALATINO, 1998).



**Figura 14.** Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio (MABRY *et al.*, 1970).

As Tabelas 19 e 20 mostram os resultados para este teste realizado com os extratos de calos de *P. setacea*. Quanto maior o equivalente em quercetina (Eq Q) encontrado nos extratos testados, maior é a quantidade de flavonoides encontrados por grama de extrato.

As análises fatoriais dos dados, realizadas para verificar os efeitos dos fatores tipo de explante e tempo de cultivo dos calos, sobre o parâmetro teor de flavonoides de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*,

indicaram diferenças significativas entre os tratamentos e interação significativa entre os dois fatores.

Observa-se, na Tabela 19, que as maiores concentrações de flavonoides estão presentes nos extratos de calos de nó foliar e nó cotiledonar de *P. setacea*, cultivados por 30 dias, respectivamente com 5,49 e 5,35 mg Eq Q/g de extrato seco, apesar de que, não foram detectadas diferenças significativas entre os teores de flavonoides dos diferentes tipos de calos aos 30 e aos 45 dias de cultivo. Porém, aos 60 dias de cultivo, os calos de nó foliar e caule apresentaram quantidades de flavonoides menores do que os demais tipos de calos.

Verifica-se que, apenas nos calos de hipocótilo e de caule ocorreram variações significativas nos níveis de flavonoides em função do tempo de cultivo, sendo que, em calos de hipocótilo os níveis aumentaram continuamente, alcançando 4,91 mg Eq Q/g extrato e nos calos de caule diminuíram progressivamente, para 2,94 mg Eq Q/g extrato.

**Tabela 19.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de flavonoides (mg Eq Q/g extrato seco) de calos de *P. setacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 0,2% de Phytigel, 88,5 mM de sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	30	45	60
Raiz	4,72 $\pm$ 0,29 Aa	4,24 $\pm$ 0,22 Aa	4,33 $\pm$ 0,08 Aa
Hipocótilo	3,81 $\pm$ 0,08 Ab	4,05 $\pm$ 0,08 Ab	4,91 $\pm$ 0,30 Aa
Nó Cotiledonar	5,35 $\pm$ 0,36 Aa	4,33 $\pm$ 0,08 Aa	4,96 $\pm$ 0,22 Aa
Cotilédone	4,24 $\pm$ 0,36 Aa	4,09 $\pm$ 0,08 Aa	4,43 $\pm$ 0,43 Aa
Nó foliar	5,49 $\pm$ 0,44 Aa	3,95 $\pm$ 0,22 Aa	4,19 $\pm$ 0,43 Ba
Caule	4,48 $\pm$ 0,30 Aa	4,05 $\pm$ 0,30 Aa	2,94 $\pm$ 0,22 Cb

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. Eq Q = equivalente de quercetina.

Analisando-se os resultados para os extratos de calos de *P. tenuifila* (Tabela 20), verifica-se que aos 45 e 60 dias de cultivo os calos de sementes imaturas apresentaram níveis de flavonoides (4,77 e 4,24 mg Eq Q (quercetina)/g extrato seco) superiores aos calos de caule em sacarose e de caule em frutose. Entretanto, aos 75 dias de cultivo os calos de caule em frutose produziram níveis equivalentes de flavonoides (4,57 mg Eq Q/g extrato seco), não havendo diferença significativa em relação aos calos de sementes imaturas.

Em calos de caule em frutose, a produção de flavonoides aumentou com o período de cultivo, enquanto que em calos de sementes imaturas os valores diminuíram. Mas, em calos de caule em sacarose os níveis de flavonoides permaneceram iguais, nos dois períodos de cultivo analisados.

**Tabela 20.** Efeito do tipo de explante e do tempo de cultivo sobre os conteúdos de flavonoides (mg Eq Q/g extrato seco) de calos de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de frutose ou sacarose e 2,5  $\mu$ M de ANA (caule); ou com sacarose e 2,5  $\mu$ M de 2,4-D (sementes imaturas).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)		
	45	60	75
Sementes imaturas	4,77 $\pm$ 0,17 Aa	4,24 $\pm$ 0,22 Ab	4,33 $\pm$ 0,17 Ab
Caule (frutose)	4,00 $\pm$ 0,14 Bb	3,95 $\pm$ 0,08 Bb	4,57 $\pm$ 0,38 Aa
Caule (sacarose)	4,05 $\pm$ 0,30 Ba	4,19 $\pm$ 0,08 Ba	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de três repetições seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas, na linha, comparam os tempos de cultivo; letras maiúsculas, na coluna, comparam os tipos de explante. Eq Q = equivalente de quercetina. (- tratamento não analisado).

Comparando-se os melhores resultados obtidos para os extratos de calos de ambas as espécies analisadas neste estudo, observa-se que houve maior concentração do teor de flavonoides em extratos de calos de nó foliar de *P. setacea*, sendo apenas 13% maior do que o maior valor detectado em extrato de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*.

Em alguns estudos, como o de Pineli e colaboradores (2015) e de Neto (2015) foram analisados os teores de flavonoides em extratos de *P. setacea* e *P. tenuifila*. Pineli e colaboradores (2015) analisaram extrato de folhas de *P. setacea* em etanol 40% e obtiveram 3,08 mg Eq Q/g do extrato seco, resultado que foi 44% menor do que obtido no presente estudo, em extratos de calos de nó foliar de *P. setacea*. Neto (2015) utilizou extrato de folhas e caules de *P. setacea* em etanol 60% e determinou um teor de 3,10 mg Eq Q/g do extrato seco, resultado bastante similar ao de Pineli e colaboradores (2015). Em extrato de folhas de *P. tenuifila* em etanol 40%, Pineli e colaboradores (2015) obtiveram 2,93 mg Eq Q/g do extrato seco, sendo este resultado 38% menor do que o observado em extrato de semente imatura, no presente estudo.

Quando comparados os resultados de teor de flavonoides de *P. setacea* com os de outras espécies, como os de extratos brutos de folhas e caules de *Passiflora nitida*, com 2,3 mg Eq Q/g do extrato e de extratos brutos de folhas e caule de *Passiflora alata*, com 6,7 mg Eq Q/g do extrato seco (WASICKY, 2007), nota-se que os valores obtidos, a partir de extratos brutos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, estão dentro da faixa já conhecida do gênero *Passiflora*, indicando o potencial dos sistemas de culturas de calos para viabilizar a produção de flavonoides *in vitro* e que poderá ser otimizada através da manipulação de elicitores e das condições de cultivo.

### **5.8 Comparação entre os padrões de variação de fenólicos totais e flavonoides com o tempo de cultivo dos calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila***

As análises de correlação linear simples (ao nível de 5%) entre fenólicos totais e tempo de cultivo dos calos de *P. setacea*, geraram coeficientes de correlação ( $r$ ) que indicaram alta associação linear negativa entre fenólicos totais e tempo de cultivo ( $r = -0,939$  e  $r = -0,985$ ), apenas em calos de nó cotiledonar e de caule. Porém, os valores não foram significativos para nenhum dos tipos de calos. Com exceção de calos de cotilédone, os valores de  $r$  foram todos negativos, indicando a queda dos fenólicos totais com o tempo de cultivo. Para os flavonoides em função do tempo de cultivo, a alta associação linear positiva ( $r = 0,959$ , não significativo) foi observada em calos de hipocótilo e negativa ( $r = -0,968$ , não significativo), em calos de caule.

Os gráficos obtidos, através das análises de regressão não linear simples, relacionando o teor de fenólicos totais em função do tempo de cultivo de calos de *P. setacea* (Fig. 15 A, C, E e Fig. 16 A, C, E), indicam ter havido, nos calos de nó cotiledonar e caule (Fig. 15 E e Fig. 16 E), o decréscimo contínuo no teor de fenólicos, com o aumento do tempo de cultivo, enquanto que nos demais tipos de calos observa-se a tendência dos níveis de fenólicos aumentarem entre 45 e 60 dias, tendo sido esse aumento mais drástico em calos de cotilédone (Fig. 16 A), em que a maior concentração de fenólicos ocorreu aos 60 dias.

Os padrões de variação dos níveis de flavonoides em função do tempo de cultivo de calos *P. setacea*, representados nas Figura 15 B, D, F e Figura 16 B, D, F, indicam que esses acompanharam os padrões de variação dos fenólicos totais nos respectivos tipos de calos, exceto em calos de hipocótilo (Fig. 15 D) e de caule (Fig. 16 E). Verifica-se que, em calos de hipocótilo, os teores de flavonoides aumentaram continuamente com o tempo de cultivo e com o declínio dos fenólicos totais. Em calos de caule, o decréscimo contínuo dos níveis de flavonoides, em função do tempo de cultivo, pareceu ser mais lento do que o observado para os fenólicos totais, no mesmo tipo de calo.

Outra observação interessante foi que o aumento dos flavonoides, entre 45 e 60 dias de cultivo acompanhou os padrões de aumento dos fenólicos totais nos calos de raiz, hipocótilo, cotilédone e nó foliar, porém, nos calos de nó cotiledonar houve aumento significativo dos flavonoides, nesse período de cultivo, enquanto que o teor de fenólicos totais, nesse tipo de calo, decresceu de forma contínua. Novamente, o aumento dos flavonoides entre 45 e 60 dias de cultivo, nos calos de cotilédone (Fig. 16 B), foi marcante, acompanhando o aumento nos níveis de fenólicos totais. Esses resultados indicam a necessidade de se realizar, em estudos futuros, análises de fenólicos totais e flavonoides em calos com tempos de cultivo superiores a 60 dias.

Para os calos de *P. tenuifila*, os valores de coeficientes de correlação linear obtidos indicaram alta associação linear positiva entre flavonoides e tempo de cultivo ( $r = 0,8274$ ), apenas em calos de caule de *P. tenuifila* em frutose, mas não foi significativo. Nos demais casos os coeficientes de correlação linear indicaram média associação linear ( $r < 0,776$ ) entre fenólicos, flavonoides e tempo de cultivo.

Os níveis de fenólicos totais (Fig. 17 A) em calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* tenderam a aumentar até 60 dias de cultivo, padrão oposto ao observado em todos os calos de *P. setacea*, e declinar no período subsequente. Os níveis de flavonoides (Fig. 17 B), porém,

decreceram com o decorrer do tempo de cultivo, até os 60 dias, aumentando em seguida, tendência semelhante à observada para os calos de *P. setacea*.

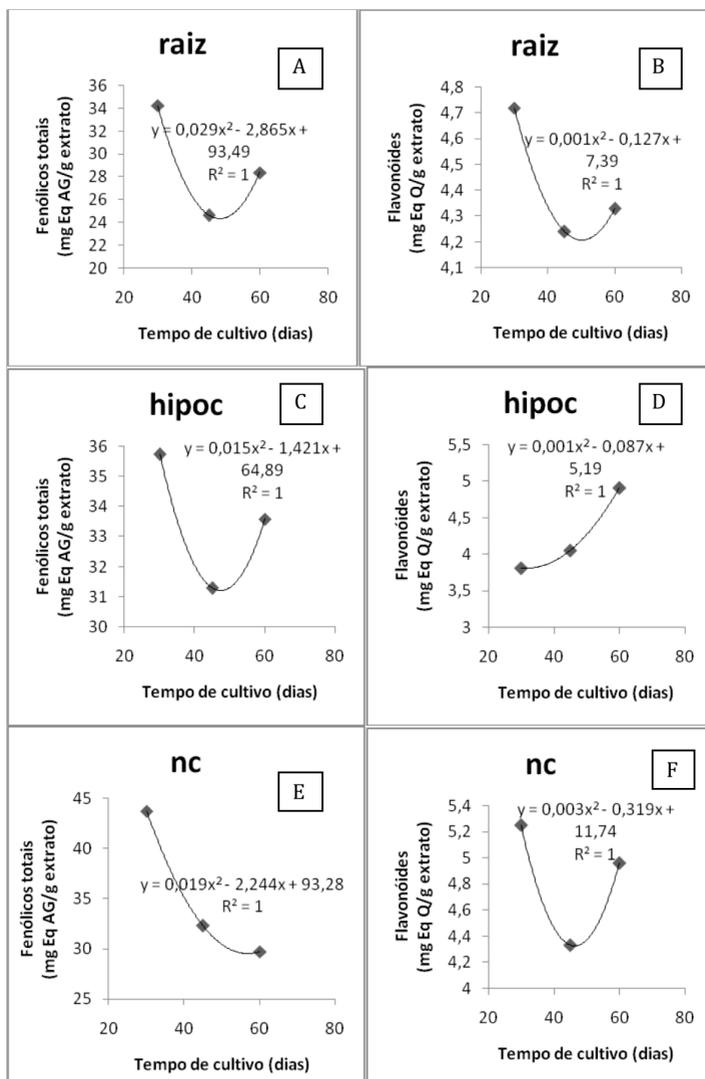
Os calos de caule em frutose apresentaram padrões de variação de fenólicos totais e de flavonoides, em função do tempo de cultivo (Fig. 17 C, D) semelhantes entre si e aos calos de cotilédone de *P. setacea*, apresentando queda até os 60 dias de cultivo e aumento drástico no período subsequente, alcançando valores acima dos detectados aos 45 dias.

Nas Figuras 15 E e F, verifica-se que os calos de caule em sacarose apresentaram tendência de aumento no níveis de fenólicos totais e flavonoides até o período de cultivo analisado, de 60 dias, com padrão similar aos calos de sementes imaturas, diferindo dos calos de *P. setacea*.

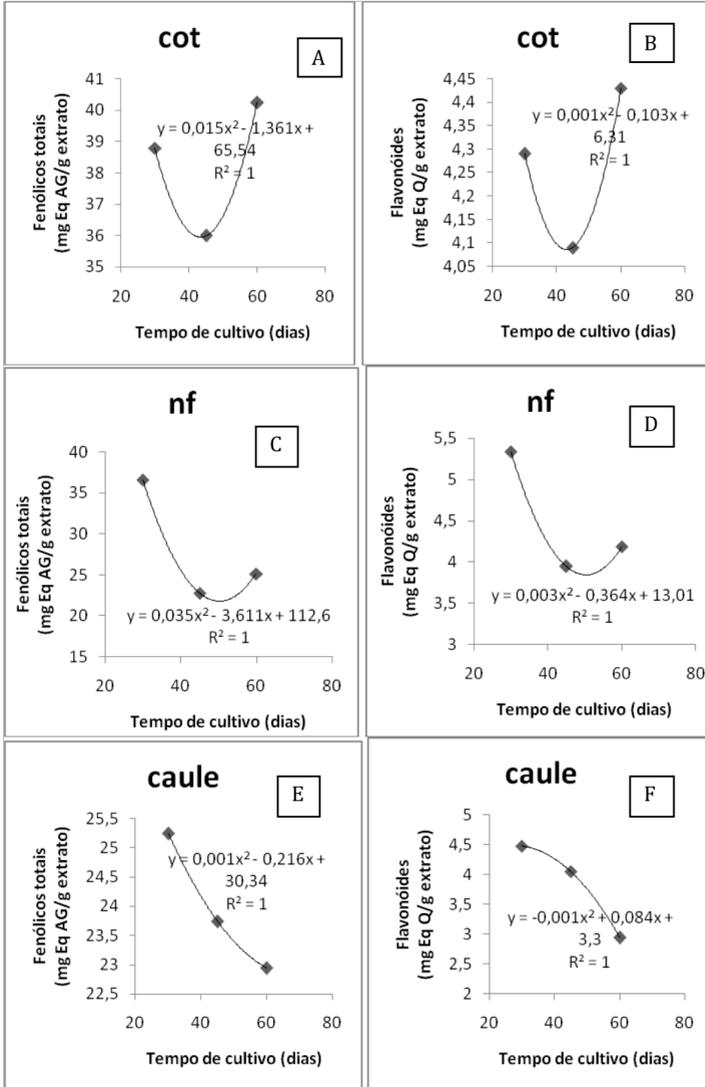
Com exceção dos fenólicos totais, em calos de sementes imaturas e dos calos em sacarose, em que não foram realizadas as análises de fenólicos e flavonoides para 75 dias de cultivo, observa-se o aumento de flavonoides e fenólicos totais entre 60 e 75 dias de cultivo, nos calos de caule em frutose, padrão semelhante ao observado nos calos de *P. setacea*. Esses resultados indicam a necessidade de se realizar, em estudos futuros, análises de fenólicos totais e flavonoides em calos de sementes imaturas com tempos de cultivo superiores a 75 dias.

Nos calos de *P. tenuifila* verifica-se que os picos de biossíntese de fenólicos totais e flavonoides foram sincronizados, com relação ao período de cultivo, apenas nos calos de caule em frutose e calos de caule em sacarose, sendo que nos calos de sementes imaturas, o máximo pico de produção de fenólicos, aos 45 dias, coincidiu com a mínima produção de flavonoides.

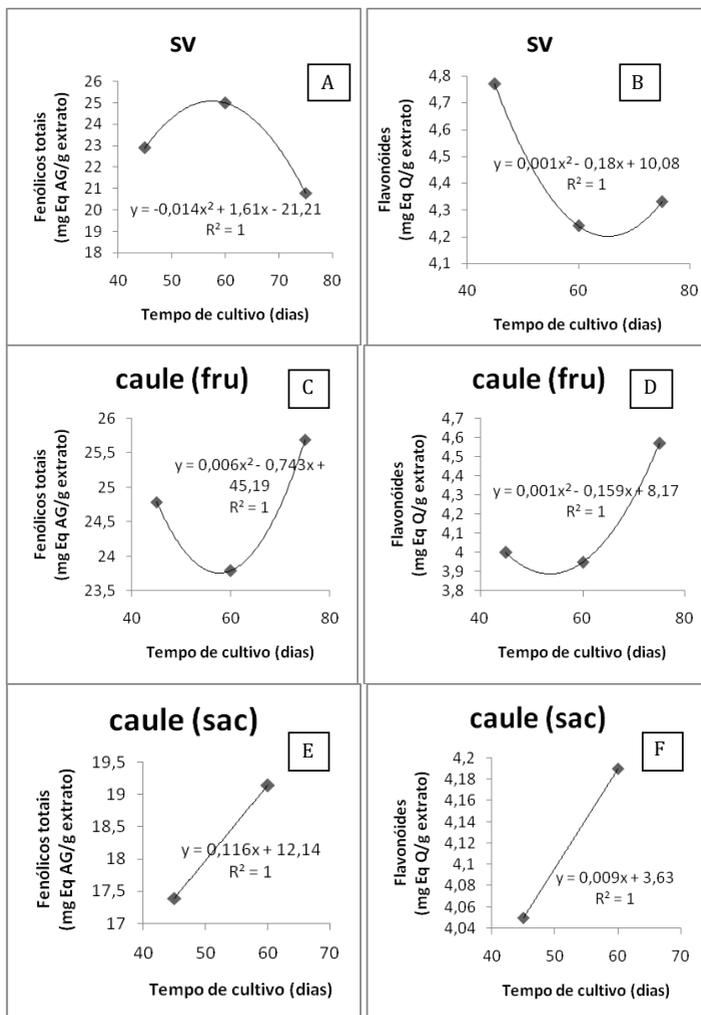
A comparação entre os padrões de variação dos teores de fenólicos totais e flavonoides indicam diferenças nas cinéticas de biossíntese desses compostos entre os calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*. Em calos de *P. setacea* a máxima biossíntese de fenólicos totais e flavonoides ocorreu no mesmo período de cultivo de 30 dias, na maioria dos calos; apenas em calos de hipocótilo, houve defasagem entre os picos de biossíntese desses compostos sendo que, a máxima biossíntese de fenólicos ocorreu aos 30 dias, enquanto que a de flavonoides ocorreu mais tardiamente, aos 60 dias de cultivo, mesmo padrão observado para fenólicos totais e flavonoides em calos de sementes imaturas e em caules em frutose e em sacarose de *P. tenuifila*.



**Figura 15.** Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo (A, C, E) e entre flavonoides e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de raiz, hipocótilo (hipoc) e nó cotiledonar (nc) cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 16.** Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo (A, C, E) e entre flavonoides e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos de *P. setacea* originados a partir de cotilédone (cot), nó foliar (nf) e caule cultivados por 30, 45 e 60 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM e 0,2% de Phytigel.



**Figura 17.** Relação entre fenólicos totais e tempo de cultivo (A, C, E) e entre flavonoides e tempo de cultivo (B, D, F) de extratos de calos de *P. tenuiflora* originados a partir de sementes imaturas (sv), e de segmentos de caules cultivados por 45, 60 e 75 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com sacarose 88,5 mM (sementes imaturas e caules- caule sac) ou frutose 88,5 mM (caules- caule fru) e 0,2% de Phytigel.

Os padrões de variação nos níveis de fenólicos totais e flavonoides observados nos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* resultam de variações na regulação das rotas metabólicas, que levam à biossíntese desses compostos, nos diferentes tipos de calos, durante o ciclo de cultivo.

De acordo com Taiz & Zeiger (2010) os compostos fenólicos são sintetizados, nas plantas, principalmente a partir da rota do ácido chiquímico, utilizando os precursores de carboidratos derivados da via glicolítica e da via da pentose-fosfato. As classes mais abundantes de fenólicos em plantas são derivados da fenilalanina pela ação da enzima PAL, que catalisa a síntese de ácido trans-cinâmico. A partir do ácido trans-cinâmico são sintetizados os compostos fenólicos simples, lignina e os flavonoides, a maior classe de fenólicos, que são sintetizados pela enzima chalcona sintase. Dessa forma, o esperado é que quanto maior a atividade da PAL, mais precursores estariam disponíveis para a chalcona sintase catalisar a produção dos flavonoides.

A atividade da PAL é aumentada por fatores como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos e múltiplos genes codificam essa enzima, mas alguns são expressos somente em tecidos específicos. Assim, é possível que os calos em questão, derivados de diferentes tipos de tecidos, poderiam estar expressando genes específicos, para a codificação das enzimas envolvidas, em níveis diferentes e em diferentes etapas do ciclo de cultivo dos calos, gerando as variadas respostas nas concentrações de fenólicos e flavonoides.

No caso dos calos, cujos padrões de variação dos fenólicos e flavonoides com o tempo de cultivo foram coincidentes, pode-se inferir que ambas as enzimas (PAL, que catalisa a transformação de fenilalanina em ácido trans-cinâmico) e chalcona sintase (que catalisa a transformação da p-coumaril-CoA nos vários tipos de flavonoides) estiveram ativas ( ou perderam a atividade) de forma sincronizada; nos casos em que os níveis de fenólicos e flavonoides aumentaram no final do ciclo de cultivo dos calos, a biossíntese de fenólicos totais poderia ser explicada pela possível baixa disponibilidade de nutrientes, já que esse fator pode estimular a atividade da PAL. Nos casos dos calos que apresentaram declínio contínuo dos teores de fenólicos totais e flavonoides, o processo de envelhecimento e senescência dos calos poderia estar influenciando essa resposta, possivelmente, através da diminuição de atividade das enzimas envolvidas na biossíntese.

A partir dessas informações foi possível estipular, para ambas as espécies estudadas e para cada tipo de calo analisado, o melhor

período do tempo de cultivo, para otimizar a produção de fenólicos totais e de flavonoides por cultura de calos *in vitro*. As análises futuras dos tipos de fenólicos e tipos de flavonoides produzidos por cada tipo de calo será imprescindível na elaboração de estratégias de otimização desse processo.

### **5.9 Comparação entre os padrões de variação de poder redutor, atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides com o tempo de cultivo dos calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuiflora***

As comparações entre os padrões de variação do poder redutor (redução do íon férrico), atividade antioxidante (atividade seqüestradora de radical livre DPPH (Figs. 11, 12), fenólicos totais e flavonoides, em função do tempo (Figs. 15, 16), indicaram que, em *P. setacea*, em calos de raiz e de nó foliar houve coincidência entre os valores máximos verificados para cada parâmetro (30 dias de cultivo), indicando o envolvimento dos fenólicos totais e flavonoides nas respostas antioxidantes. Da mesma forma, em calos de cotilédone, os picos máximos de fenólicos totais e flavonoides coincidiram com os máximos valores de poder redutor, podendo responder por essa atividade, e com o pico máximo de atividade antioxidante, por DPPH, aos 30 dias de cultivo, já que não houve diferença significativa entre os níveis de fenólicos e flavonoides aos 30 e 60 dias de cultivo.

Em calos de caule e nó cotiledonar, os picos máximos de fenólicos totais e flavonoides coincidiram apenas com a máxima atividade antioxidante por DPPH, podendo responder por essa atividade, mas não com o máximo poder redutor. Em calos de hipocótilo os picos máximos de fenólicos totais coincidiram com os picos de máxima atividade antioxidante, por DPPH e poder redutor, mas não com o máximo teor de flavonoides.

Em calos de *P. tenuiflora* (Fig. 13 e Fig. 17), apenas em calos de caule em sacarose houve coincidência entre os máximos níveis de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, mas não com o poder redutor, indicando o envolvimento desses compostos na atividade antioxidante por DPPH. Já em calos de sementes imaturas, o pico máximo de flavonoides coincidiu com os picos de máxima atividade antioxidante, por DPPH e do poder redutor, mas não com a máxima concentração de fenólicos totais. E nos calos de caule em frutose, o pico máximo de produção de fenólicos totais coincidiu com o de flavonoides,

mas não com a máxima atividade antioxidante e nem com o poder redutor.

O fato de não haver coincidência entre os máximos níveis de fenólicos totais e/ou flavonoides com a máxima atividade antioxidante, por DPPH e/ou poder redutor, pelo íon férrico, não significa, porém que esses compostos não estejam envolvidos nas respostas antioxidantes. Pode ser que, moléculas ativas e eficientes na antioxidação possam estar sendo produzidas em determinados momentos do ciclo de cultivo dos calos, que não correspondem, exatamente, aos momentos em que foram detectadas as maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides. Também é possível que moléculas de outros grupos de compostos, que não fenólicos e/ou flavonoides estejam atuando como antioxidantes.

Da mesma maneira, o fato dos teores de flavonoides não variarem entre os tipos de calos e entre os tempos de cultivo (exceto em calos de hipocótilo e caule), não indica que desempenhariam atividade antioxidante semelhante, em todos os tempos de cultivo dos calos. Uma prova disso é que, por exemplo, em calos de raiz, nó foliar, nó cotiledonar e cotilédone, as diferenças entre as atividades antioxidantes, por DPPH, durante os ciclos de cultivo desses diferentes tipos de calos foram estatisticamente significativas, o que poderia indicar que, apesar dos níveis de flavonoides permanecerem iguais, estatisticamente, diferentes tipos de moléculas mais eficientes como antioxidantes poderiam estar sendo produzidas, por exemplo, aos 30 dias de cultivo, que responderiam pela maior atividade antioxidante, por DPPH, e até pelo poder redutor, pelo íon férrico, nos casos em que houve diferença significativa entre os valores.

Apenas a identificação dos compostos fenólicos e dos flavonoides, produzidos em cada período do ciclo de cultivo dos calos, e a respectiva determinação da atividade antioxidante dos mesmos permitirão definir, com precisão, o nível de envolvimento dessas classes de compostos nas respostas antioxidantes obtidas. Da mesma maneira, também será necessário realizar estudos para verificar as variações nos níveis de outros possíveis grupos de compostos, que poderiam estar atuando como antioxidantes.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Os tipos de explantes e tempo de cultivo influenciaram o crescimento, as cinéticas de biossíntese de compostos fenólicos e flavonoides e a atividade antioxidante dos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*;
- Todos os calos de *P. setacea* apresentaram maior crescimento em massa seca aos 45 dias e maior rendimento aos 30 dias de cultivo; as maiores biomassas secas foram detectadas nos calos de nó cotiledonar, cotilédone, caule e hipocótilo. Calos de *P. tenuifila* apresentaram maior crescimento em massa seca aos 45 dias (caule em sacarose), aos 60 dias (sementes imaturas) e aos 75 dias de cultivo (caule em frutose) e maior rendimento, aos 45 dias (sementes imaturas) e aos 60 dias (caule em sacarose e em frutose);
- Para *P. setacea*, o melhor tipo de calo para a produção de fenólicos, flavonoides e de compostos com atividade antioxidante, por DPPH, foi o calo originado a partir de nó cotiledonar aos 30 dias de cultivo, e aos 45 dias de cultivo para atividade antioxidante quando usado o teste do poder redutor;
- Para *P. tenuifila*, os melhores tipos de calos para a produção de fenólicos foram os calos de caule em frutose, aos 45 e 60 dias de cultivo, e calos de sementes imaturas, aos 60 dias de cultivo; para produção de flavonoides, os calos de sementes imaturas, aos 45 dias, e caules em frutose, aos 75 dias; para atividade antioxidante por DPPH, os calos de caule em frutose, aos 45 e 60 dias; para atividade antioxidante por redução do íon férrico, os calos de caule em sacarose, aos 45 dias, e calos de caule em frutose, aos 60 e 75 dias;
- Em todos os tipos de calos de *P. setacea*, exceto calos de hipocótilo e cotilédone, houve tendência dos níveis de fenólicos, de flavonoides e atividade antioxidante, por DPPH e por redução do íon férrico, decrescerem com o decorrer do tempo de cultivo. Apenas em calos de hipocótilo (flavonoides) e calos de cotilédone (fenólicos, flavonoides, poder redutor) houve tendência de aumento com o decorrer do período de cultivo;

- Em *P. tenuifila*, nos calos de sementes imaturas houve tendência de decréscimo dos níveis de fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante, por DPPH e poder redutor, com o tempo de cultivo de calos; em calos de caule em frutose houve tendência de aumento dos níveis de fenólicos totais e flavonoides em função do tempo de cultivo e de queda da atividade antioxidante, por ambos os métodos testados; em calos de caule em sacarose houve tendência de aumento de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, por DPPH, em função do tempo de cultivo, mas de queda do poder redutor;
- Os padrões de variação semelhantes entre os conteúdos de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em relação ao tempo de cultivo indicam o envolvimento, com maior probabilidade, desses grupos de compostos na atividade antioxidante. É possível que outros grupos de compostos estejam atuando nos casos em que as variações entre a resposta antioxidante e os níveis de fenólicos e flavonoides foram em sentidos contrários;
- A identificação dos compostos fenólicos e dos flavonoides, produzidos em cada período do ciclo de cultivo, pelos calos mais promissores de ambas as espécies, e a respectiva determinação da atividade antioxidante dos mesmos são necessárias para confirmar o nível de envolvimento dessas classes de compostos nas respostas antioxidantes obtidas e permitir a comparação, entre as espécies, quanto aos tipos de moléculas produzidas;
- Os calos de *P. tenuifila* apresentaram teores de flavonoides e de atividade antioxidante, por DPPH e pelo teste do poder redutor, que foram, respectivamente, 87%, 79% e 88% dos máximos valores apresentados por calos de *P. setacea*, mas teores de fenólicos que foram apenas 59% do teor máximo observado em calos de *P. setacea*;
- Os resultados obtidos permitiram selecionar, para *P. setacea* e *P. tenuifila*, os melhores tipos de explantes para produzir os calos e, para cada tipo de calo, identificar os melhores tempos e condições de cultivo, para otimizar a produção de fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante, através da manipulação de

diferentes tipos de elicitores, do meio de cultura e das condições de cultura;

- Os níveis de atividade antioxidante, de fenólicos e de flavonoides encontrados em calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* indicam o grande potencial de aplicação comercial da abordagem biotecnológica para a produção *in vitro* de compostos, para atender a demanda crescente das indústrias farmacêuticas e nutracêuticas e reduzir a pressão sobre as populações naturais das espécies, contribuindo para promover a conservação de germoplasma.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALMEIDA, A. R. **Caracterização morfoanatômica e química de *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora setacea* DC e seus mecanismos de cicatrização de feridas em ratos**. Dissertação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2014.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food chemistry**, v.94, n.1, p.19-25, 2006.

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.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.73, n.2, p.239-244, 2001.

ARIKI, J.; TOLEDO, P. R.; RUGGIERO, C.; DE OLIVEIRA, J. C. Aproveitamento de cascas desidratadas e sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. flavi carpa Deg.) na alimentação de frangos de corte. **Científica**, 1977.

ARBIX, G. Biotecnologia sem fronteiras. **Novos Estudos-CEBRAP**, n.78, p.5-10, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v.29, n.1, p.113, 2006.

BEDOUKIAN, P. Z. Bedoukian's 36th annual review: Perfumery and flavor materials. **Perfumer and Flavorist**, 1980.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P. E. **Plante medicinale; chimica, farmacologia, e terapia**. Vol.2. Milan: Inverni della Beffa, 1964.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DEAZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. 2015. Passifloraceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 24 Jan. 2016

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.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p.45-48, 88-90, 2011.

BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. Harwood academic publishers, 1998.

BORSATO, D.; MAIA, E. C. R.; DALL'ANTONIA, L. H.; SILVA, H. C. D.; PEREIRA, J. L. Kinetics of oxidation of biodiesel from soybean oil mixed with TBHQ: determination of storage time. **Química Nova**, v.35, n.4, p.733-737, 2012.

BOUCHET, N.; BARRIER, L.; FAUCONNEAU, B. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera*

*senegalensis* (Combretaceae). **Phytotherapy research**, v.12, n.3, p.159-162, 1998.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, p.1367, 2000.

CAETANO, A. C. S.; MELO, E. A.; LIMA, V. L. A. G.; MACIEL, M. I. S.; ARAÚJO, C. R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.2, p.155-160, 2009.

CANHOTO, J. M. **Biotechnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Univ. de Coimbra, 2010.

CANTERI, M. H.; SCHEER, A.; PETKOWICZ, C.; GINIES, C.; RENARD, C.; WOSIACKI, G. Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. **Journal of Food & Nutrition Research**, v.49, n.3, 2010.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, n.5, p. 749-760, 1997

CARVALHO, A. P. Biotechnologia. In: SCHWARTZMAN, S. **Ciência e Tecnologia no Brasil: Uma Nova Política para o Mundo Global**. Rio de Janeiro: Ed. Fundação Getúlio Vargas, 1996.

CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K. D. Q.; SOUSA, F. M. D.; COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, v.47, n.1, p.143-151, 2016.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v.64, p.393-396, 1998.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; DE JESUS, O. N.; DOS SANTOS, E. S. L.; DE SOUZA, A. P. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora spp.*). In: **Genetic**

**Diversity and Erosion in Plants.** Springer International Publishing. p.215-231. 2016.

CERVI, A. C. **O gênero Passiflora L.(Passifloraceae) no Brasil: espécies descritas após o ano de 1950.** Real Jardín Botánico, 2006.

CETIN, E. S. Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. Öküzgözü callus cultures. **Biological Research**, p.37-47, 2014.

CLEMENT, C. R.; BOVI, M. L. A. Standardization of growth and yield measurements in pejibaye heart-of-palm experiments. **Acta Amazonica**, v.30, n.3, p.349-349, 2000.

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, A. M.; CELESTINO, S. M. C.; TEIXEIRA, L. P. Rede Passitec: desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres. **Planaltina, DF: Embrapa Cerrados**, 2010.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D.; FALEIRO, F. G. O maracujá e suas propriedades medicinais—estado da arte. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, p.475-508, 2005.

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

DE PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, p.5–8, 2002.

DIAS, M. I; SOUSA, M. J; ALVES, R. C; FERREIRA, I. C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v.82, p.9-22, 2016.

DURIGAN, J. F.; YAMANAKA, L. H. Aproveitamento de subprodutos da fabricação do suco de maracujá. In: **RUGGIERO, C. Cultura do maracujazeiro, Ribeirão Preto: Legis Summa**, p.202-209, 1987.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Informe Agropecuário: A cultura do Maracujazeiro**, v.21, n.206. EPAMIG, Belo Horizonte, 2000.

FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia: uma visão geral. **Estado da arte e aplicações na agropecuária**, p. 13, Embrapa Cerrados, 2011.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Characterization of by-products of passion fruit industrialization utilization of seeds. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.101-102, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Passifloraceae. In: **Flowering Plants· Eudicots**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p.270-281.

FIGUEIREDO, M. A.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; DE OLIVEIRA PAIVA, P. D.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Ceres**, v.62, n.4, 2015.

FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; GUZZO, F.; LEVI, M.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnology letters**, v.30, n.11, p.2031-2036, 2008.

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

FURLAN, V. J. M.; SILVA, A. P. R. D.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoíta (*Engraulis anchoita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2009.

GLOTZBACH, B.; RIMPLER, H. Die flavonoide von *P. incarnata* L. *P. quadrangularis* L. und *P. pulchella*. **Planta Medica**, v.16, n.1, p.1-7, 1968.

GOMES, S. V. F. **Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero Passiflora**. Tese em Química Orgânica, Universidade Federal da Bahia, 2013.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives**, v.17, p.419, 2012.

GUEVEN, A.; KNORR, D. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. **Journal of Food Engineering**, v.103, n.3, p.237-243, 2011.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2**. John Wiley & Sons, 1999.

HARMAN, D. The free radical theory of aging. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.5, n.5, p.557-561, 2003.

IBAMA. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial**. Portaria nº443, de 17 de dezembro de 2014.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal 2014** : culturas temporárias e permanentes, v.41, p1-100. Rio de Janeiro: IBGE, 2014.

JÚNIOR, F. L. C.; ESTANISLAU, M. L. L.; DE PAIVA, B. M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Maracujá: perspectivas promissoras com mercado crescente**, v.21, n.206, p.10-17, 2000.

JÚNIOR, J. E. L.; DA COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.1, p.70-76, 2008.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.81–106, 2005.

KANUFRE, V. C; SANTOS, J. S; ALVES, M. R. A; SOARES, R. L. Fenilcetonúria: tabelas com a quantidade de fenilalanina dos alimentos. Belo Horizonte: NUPAD/FM/UFMG, 2010.

KATEROVA, Z.; TODOROVA, D.; TASHEVA, K.; SERGIEV, I. Influence of ultravioleta radiation on plant secondary metabolite production. **Genetics and plant physiology**, v.2, p.113–144, 2012.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas “in vitro”: uma realidade. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.1, p.30-33, 1997.

KILLIP, E.P. **The american species of Passifloraceae**. Publication Field Museum of Natural History - Botanical Series 19 (1-2): p.1-613, 1938.

KURITA, F. M. K. **Crescimento in vitro da bromélia Alcantarea imperialis (Carrière) Harms com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio**. Dissertação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, do Instituto de Botânica, 2011.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.18, n.2, p.87-94, 2003.

LEONEL, S.; LEONEL, M.; DUARTE FILHO, J. Principais produtos e subprodutos obtidos do maracujazeiro. **Informe agropecuário**, v.21, p.81-85, 2000.

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

MABBERLEY, D. J. **Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classifications and uses**. Cambridge University Press, 2008.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. **New York: Springer-Verlag**, 354p., 1970.

MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. Systematics. p.27-31 in. Ulmer, T. & MacDougal, J.M. **Passiflora: passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, 2004.

MACHADO, I. S.; GOMES, A. C.; BERTOZZO, F.; SORIANO, L.; DE ARCALÁ, L. F. L. Indução de calogênese em meristemas de curauá in vitro. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.13, n.2, 2009.

MACHADO, M. W.; STERN NETO, C.; SALGADO, J.; ZAFFARI, G.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; BIAVATTI, M. W. Search for alkaloids on callus culture of *Passiflora alata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, p.901-910, 2010.

MAISUTHISAKUL, P.; PASUK, S.; RITTHIRUANGDEJ, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, n.3, p.229-240, 2008.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): physical and chemical characteristics. **Brazilian archives of biology and technology**, v.55, n.1, p.127-134, 2012.

MAMEDE, A. C. P. Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dissertação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MASTRO-DURÁN, R.; BORJA-PADILLA, R. Antioxidant activity of natural sterols and organic acids. **Grasas y Aceites**, v.44, n.3, p.208-212, 1993.

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D. A. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à "morte prematura de plantas". **Científica**, v.22, p.95-104, 1994.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.3, p.577-599, 2000.

MICELI, M.; BONTEMPO, P.; NEBBIOSO, A.; ALTUCCI, L. Natural compounds in epigenetics: a current view. **Food and Chemical Toxicology**, v.73, p.71-83, 2014.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. **Revisão taxonômica de *Passiflora L.* subgênero *Decaloba (DC.) Rchb.* (Passifloraceae) no Brasil**. Tese de Doutorado em Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Food Science and Technology**, Wiltshire, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, UFLA, 626p. 2002.

MORESCO, H. H. Investigação fitoquímica e biológica de *Averrhoa carambola* e *Psidium cattleianum*. Dissertação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MORESCO, H. H. Estudo fitoquímico e biológico de quatro espécies da família Myrtaceae. Tese em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NETO, A. V. **Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de *Passiflora setacea* D.C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae)**. Dissertação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2015.

OLIVEIRA, M. Margarida. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v.66, p.22-27, 2000.

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

ONU. Organização da Nações Unidas. **Convenção sobre Diversidade Biológica**. Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, Rio de Janeiro, 1992.

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

PAIVA, R. Leite com Maracujá. **Revista Globo Rural**, Universidade Federal de Viçosa, junho 98, p.9 – 15,1998.

PAULA, M. S. **Diversidade genética e reação de *Passiflora sp.* a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica***. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 2006.

PAULS, K. P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology advances**, v.13, n.4, p.673-693, 1995.

PAPASAVAS, A. **Βελτιστοποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών παραγόντων των φυτών μέσω του ελέγχου των θρεπτικών συστατικών**. Tese em Produtos Agrícolas e Alimentares da Universidade de Patras, Agrinio, Grécia, 2014.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O. V.; GALAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n.1, p.103-111, 2007.

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

PINELI, L.D.; RODRIGUES, J.S.Q.; COSTA, A.M.; LIMA, H.C.; CHIARELLO, M.D. ; MELO, L. Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild passiflora from Brazilian savannah: potential as functional beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.95, n.7, p.1500-1506, 2015.

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 1, n.4, p.12-15, 1998.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 106p, 2009

PRADO, J. M.; DALMOLIN, I.; CARARETO, N. D.; BASSO, R. C.; MEIRELLES, A. J.; OLIVEIRA, J. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v.109, n.2, p.249-257, 2012.

QUEIROZ, G. S. **Flavonoides de *Bunchosia armeniaca* e derivados de 2-arilideno-1- $\alpha$ -tetralona: Obtenção e atividades biológicas.** Dissertação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical pharmacology**, v.72, n.11, p.1439-1452, 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, p.755-760, 2006.

RAZIA, M.; KARITHGA, V.; BERNALA, W.; SHAVISHA, L. P. E.; BANU, S. S. In vitro antioxidant and antibacterial activity of leaf extract of *Passiflora ligularis*. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)**, v.3, n.3, p.1124-1129, 2014.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R.; AKOH, C. C.; MIN, D. B. Antioxidants. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**, n. Ed. 2, p.489-516, 2002.

RITER NETTO, A. F.; FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. J. C.; VITORAZI FILHO, J. A. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares na bioprodução de fenóis totais e no crescimento de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.1-9, 2014.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Anceleta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.1, p.238-244, 2008.

SANTOS, F. C. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do maracujá-do-sono (*Passiflora setacea*DC.)** Dissertação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, 2006.

SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; SANTOS, F. C.; LIMA, L. C. O.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C. Características físico-químicas

do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. **Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro**, v.4, p.143-146, 2005.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. D. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, p.3-12, 2007.

SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6 Volume Set, 6<sup>th</sup> ed., John Wiley: New York, 2005

SILVA, W.J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p.441-451, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da Universidade/UFRGS, 2.ed, 2000.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**,v.11, p.118–131, 1957.

SIDDIQUI, Z.; MUJIB, A.; MAHMOODUZZADAR, A. *In vitro* Production of Secondary Metabolites Using Elicitor in *Catharanthus roseus*: A Case Study. **Crop Improvement**, p.401-419, 2013.

SOARES, A. C. F.; MARTINS, M. A.; MATHIAS, L.; FREITAS, M. S. M. Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of flavonoids in roots of passion fruit seedlings. **Scientia Agrícola**, v.62, n.4, p.331-36, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOUSA, J. D.; MELETTI, L. M. M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. **FEALQ, Piracicaba**, 1997.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, J. S.; CARDOSO, C. E. L.; FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Mercado Mundial. Maracujá Pós-colheita. Embrapa Mandioca Fruticultura (Cruz das almas, BA). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 51p.

SOZO, J. S. Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados in vitro de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae). Florianópolis, 2014.

SUÁREZ, J. C. A.; PÉREZ, J. O.; GÓMEZ, R. U. Sistemas de polinización en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) como base para estudios genéticos y de conservación. **Acta Agronómica**, v.65, n.2, p.197, 2016.

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

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5ª ed. Porto Alegre, Artmed. 918p. 2013.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B radiation in *Withania somnifera* Dunal, an indigenous medicinal plant. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.140, p.332-343, 2014.

TAPIA, G. T.; MONROY, M. R. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, v.32, n.10, p.669-674, 2007.

TIVERON, A. P.; MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; VIEIRA, T. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A.; ALENCAR, S. M. Antioxidant

activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.7, p.8943-8957, 2012.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998.

TRIPATHI, L.; TRIPATHI, J. N. Role of biotechnology in medicinal plants. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.2, n.2, p.243-253, 2003.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. **Passiflora: passionflowers of the world**. Portland, Or.: Timber Press, 2004.

VASIL, I.K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant cell reports**, v.27, n.9, p.1423-1440, 2008.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, p.105–113, 2015.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Springer, p.1400, 2009.

VERPOORTE, R.; MARASCHI, M. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes R. A., Calixto J.B. (org.) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó, Brasil: Argos, p.381- 432, 2001.

WASICKY, A. **Estudo farmacognóstico comparativo de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae): Avaliação das atividades antiúlcera e antioxidante dos seus extratos**. Dissertação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2007.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific, p.238, 1994.

WOFALT, M. R. Calos de passifloras silvestres: indução, caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural. Dissertação em Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apiculture Research**, v.37, p.99-105, 1998

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V.; POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Inhibiting oxidation. **Antioxidants in food: Practical applications**, p.22-70, 2001.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.27-32, 1995.

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