



BEATRIZ GARBIM VERONESE

**PRODUÇÃO DE FENÓLICOS EM CALOS DE *Passiflora edulis*
E *Passiflora gibertii* SUBMETIDOS A DIFERENTES
REGULADORES DE CRESCIMENTO**

LAVRAS - MG

2019

BEATRIZ GARBIM VERONESE

**PRODUÇÃO DE FENÓLICOS EM CALOS DE *Passiflora edulis* E *Passiflora gibertii*
SUBMETIDOS A DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Renato Paiva, PhD

Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

LAVRAS - MG

2019

BEATRIZ GARBIM VERONESE

**PRODUÇÃO DE FENÓLICOS EM CALOS DE *Passiflora edulis* E *Passiflora gibertii*
SUBMETIDOS A DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO**

**PHENOLICS PRODUCTION OF *Passiflora edulis* AND *Passiflora gibertii* CALLUS
SUBMITTED TO DIFFERENT GROWTH REGULATORS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 2 de julho de 2019.

Renato Paiva, PhD - UFLA

Dra. Michele Valquíria dos Reis - UFLA

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas - UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD

Orientador

Profa. Dra. Michele Valquíria dos Reis

Coorientadora

LAVRAS - MG

2019

Aos meus pais, Gislene e José Renato.

À minha irmã Giovana.

Ao meu namorado Samuel.

Minhas fontes de amor diário e todo o meu mundo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, local que me acolheu nestes quatro anos e possibilitou toda a infraestrutura e recursos necessários para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão das bolsas de iniciação científica desde maio de 2016, o que me incentivou a pesquisar e permitiu um auxílio financeiro essencial. Também à CAPES e FAPEMIG, pelos recursos concedidos.

Ao meu orientador, prof. Renato Paiva, pelas oportunidades as quais sou e serei sempre extremamente grata.

À minha coorientadora, profa. Michele, por se desdobrar tantas vezes por mim, pelas ajudas, conselhos e voto de confiança. Obrigada por tudo!

Ao Diogo, pela amizade, (puxões de orelha) e carinho de sempre. Obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e ao Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, por me mostrarem o que é ciência todos os dias.

À equipe do prof. Eduardo Vilas Boas, especialmente ao Rafael Carvalho do Lago, que me auxiliou na análise dos resultados deste trabalho e me cedeu gentilmente o espaço e recursos necessários.

Ao Lucas, meu primeiro mentor, obrigada por ter sido um guia, um amigo, uma inspiração. Agradeço e levarei comigo todos os seus ensinamentos por onde eu for.

Ao Afonso, Carol, Jober, Judith, também às Déboras, Júnia, Camila, Rapha, Rafa e demais alunos da Pós-Graduação, exemplos de dedicação, por participarem de alguma maneira no meu crescimento e pelos incentivos de sempre.

À Letícia, minha primeira companheira, por não me deixar perdida no meu primeiro dia; Bruna e Raquel, minhas parceiras de turma e de laboratório, pelos momentos compartilhados, alegrias e desabafos diários. Não teria sido o mesmo sem vocês três!

Aos amigos de 2015/1, aqueles que entraram e permaneceram em minha vida, especialmente à Sofia, Beatriz, Calabresa, Lyra, Ícaro, Gilson, Richard, Ellen e Luana, por me mostrarem o valor da amizade em todos os momentos que passamos juntos. Aos demais amigos da UFLA, principalmente ao Geovanne, Victor e Melina.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas que me ensinaram não só a Biologia, mas a mudar minha visão de mundo, enquanto futura bióloga, humana e parte da natureza.

À minha mãe, meu pai e minha irmã, que sempre torceram por mim. Obrigada por permitirem que eu tivesse o privilégio de somente me dedicar aos estudos e por me incentivarem a voar longe, cada vez mais.

Ao meu namorado, por me fazer uma pessoa melhor a cada dia e por acreditar em mim. Obrigada por segurar a minha mão em novembro de 2015 e não ter soltado mais.

À todas as pessoas que um dia passaram pelo meu caminho, me apoiando de alguma forma, muito obrigada!

RESUMO

As propriedades benéficas do maracujá são consequências da ação dos metabólitos secundários. Apesar dos avanços da química sintética, o estudo dos produtos derivados de metabólitos secundários é feito majoritariamente pelo cultivo de plantas medicinais, limitando a produtividade e contribuindo com a exploração indevida de espécies. Deste modo, a cultura de tecidos, principalmente a calogênese, representa uma alternativa promissora e sustentável, permitindo a manipulação *in vitro* dos fatores que influenciam a síntese desses metabólitos. Assim, este trabalho visou gerar conhecimentos sobre a influência de reguladores de crescimento e do tempo de cultivo na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em culturas de calos de *Passiflora gibertii* em comparação com *P. edulis*, permitindo avaliar o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção dos compostos bioativos. Para a indução de calogênese, explantes foliares das duas espécies de maracujazeiro foram inoculados em meio MS suplementado com 0, 4, 8 e 16 μM de Picloram (PIC) em combinação ou não com 2,5 μM de Cinetina. Após trinta dias, os calos foram avaliados quanto à porcentagem no explante e cobertura calogênica. Após a avaliação dos calos, as culturas foram mantidas em sala de crescimento e coletadas após quarenta, sessenta e oitenta dias de cultivo para a determinação da massa fresca e, posteriormente, de compostos fenólicos e flavonoides totais. Para a elaboração dos extratos, triturou-se calos e folhas de *P. gibertii* e *P. edulis* em nitrogênio líquido, e então foi adicionado metanol 80%. Após maceração por duas horas no escuro, as amostras foram centrifugadas e lidas em espectrofotômetro. Foi visto que os calos de *P. edulis* possuem rendimento de compostos fenólicos e de flavonoides influenciado pelas concentrações de PIC e tempos de cultivo. Já o rendimento em *P. gibertii* não é influenciado por estes fatores, indicando a estabilidade da síntese de metabólitos secundários nesta espécie. Também foi possível verificar o potencial de aplicação dos calos como estratégia biotecnológica de produção dos metabólitos secundários, uma vez que isto permitiu o estudo dos fatores que influenciam o rendimento em ambas as espécies, além de ser uma alternativa sustentável e mais rápida de produção, dentro de um ambiente asséptico e controlado.

Palavras-chave: Calogênese. Metabolismo secundário. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The beneficial properties of passion fruit are due to the action of secondary metabolites. Despite the advances in synthetic chemistry, the study and use of products derived from secondary metabolites is mostly made by the cultivation of medicinal plants, limiting productivity and contributing to the undue exploration of species. Thus, tissue culture, especially calogenesis, represents a promising and sustainable alternative, allowing an *in vitro* manipulation of the factors that influence the synthesis of these metabolites. Thereby, this work aimed to generate knowledge about the influence of growth regulators and culture time on the production of phenolic compounds and total flavonoids in *Passiflora gibertii* callus cultures compared to *P. edulis*, allowing evaluate the potential of biotechnological strategies application for the production of bioactive compounds. For calogenesis induction, passion fruit leaf were inoculated in MS medium supplemented with 0, 4, 8 and 16 μM of Picloram (PIC) in combination or not with 2.5 μM of Kinetin. After 30 days, the calluses were evaluated for percentage on explant and calogenic cover. After the callus evaluation, the cultures were kept in the growth room and collected after forty, sixty and eighty days of cultivation for the fresh mass determination and, after that, for the total phenolic compounds and flavonoids determination. For the extracts preparation, calli and leaves of *P. gibertii* and *P. edulis* were ground in liquid nitrogen, and then 80% methanol was added. After maceration for two hours in the dark, the samples were centrifuged and read in a spectrophotometer. The callus of *P. edulis* was found to have phenolic and flavonoid yields influenced by PIC concentrations and culture times. However, the yield in *P. gibertii* is not influenced by these factors, indicating a stability of the syntax of metabolites. It was also possible to verify the potential of callus application as a biotechnological strategy for the production of secondary metabolites, since it was possible to study the factors influencing yield in both species, besides being a sustainable and faster production alternative, within an aseptic and controlled environment.

Keywords: Calogenesis. Secondary metabolism. *In vitro* culture.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 10 |
| 2.1 | <i>Passiflora</i> (Passifloraceae) | 10 |
| 2.1.1 | Aspectos econômicos, nutricionais e farmacológicos | 11 |
| 2.1.2 | Importância das espécies silvestres | 12 |
| 2.1.3 | Uso medicinal | 13 |
| 2.1.4 | Metabólitos secundários | 15 |
| 2.1.5 | Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários | 17 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 20 |
| 3.1 | Objetivo geral | 20 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 20 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 | Material vegetal | 21 |
| 4.2 | Indução de calos | 21 |
| 4.3 | Determinação da massa fresca..... | 22 |
| 4.4 | Determinação de compostos fenólicos totais..... | 22 |
| 4.5 | Determinação de flavonoides totais..... | 23 |
| 4.6 | Análise estatística | 23 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 5.1 | Indução de calos | 23 |
| 5.2 | Determinação da massa fresca..... | 27 |
| 5.3 | Determinação de compostos fenólicos totais..... | 29 |
| 5.4 | Determinação de flavonoides totais..... | 32 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 35 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, além de maior produtor mundial de maracujá é também seu maior consumidor. Entre as espécies de maracujazeiros, o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) é o mais produzido, representando 95% dos pomares. Seus frutos são consumidos *in natura* ou processados, devido ao alto valor nutritivo. Além dos frutos, suas flores, sementes, raízes e folhas são utilizadas para fins farmacológicos, pois apresentam princípios ativos que tornam o maracujá um fitoterápico eficaz.

Plantas medicinais e fitoterápicos são recursos terapêuticos reconhecidos pela comunidade médica e científica, cada vez mais buscados na medicina alternativa. Apesar da diversidade nacional de passifloras, que conta com 83 espécies de maracujazeiros endêmicos, apenas *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis estão incluídas na lista de espécies medicinais brasileiras, demonstrando a falta de conhecimento sobre as espécies de passifloras silvestres.

Na forma de medicamento, o maracujá é indicado como ansiolítico e sedativo suave, possuindo vários outros benefícios conhecidos etnofarmacologicamente. Estas propriedades são consequências da ação, isolada ou em conjunto, dos metabólitos secundários presentes no maracujá, principalmente dos flavonoides, compostos fenólicos abundantes no gênero.

Apesar dos avanços da química sintética, o uso e estudo dos produtos provenientes do metabolismo secundário é feito majoritariamente pelo cultivo de plantas medicinais, limitando a produtividade e contribuindo com a exploração indiscriminada de espécies. Deste modo, a cultura de tecidos representa uma alternativa promissora e sustentável, trazendo um conjunto de técnicas que permite manipular a síntese dos fitoconstituintes *in vitro*, independentemente das condições ambientais.

Uma das respostas mais comuns obtidas *in vitro* é a formação de calos, um conjunto de células indiferenciadas normalmente induzido pela adição de reguladores de crescimento. A calogênese possibilita aumentar a biomassa vegetal e a taxa de produção dos metabólitos, por meio da manipulação dos fatores que influenciam sua síntese, como a formulação do meio de cultura, de maneira controlada e em larga escala.

Assim, este trabalho visou gerar conhecimentos sobre a influência de reguladores de crescimento e do tempo de cultivo na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em culturas de calos de *P. gibertii* em comparação com *P. edulis*, permitindo avaliar o

potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção dos compostos bioativos e contribuir para o desenvolvimento do uso medicinal das passifloras silvestres, além de reduzir sua exploração extensiva.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Passiflora* (Passifloraceae)

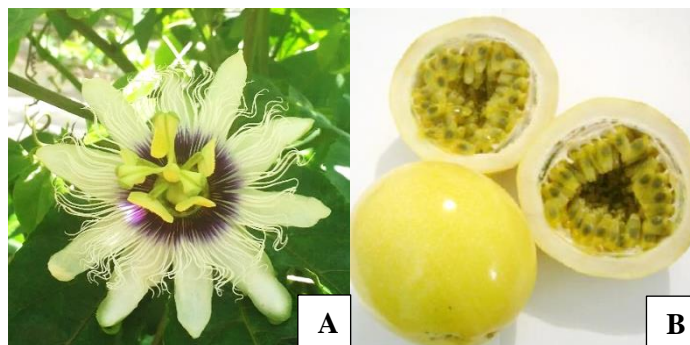
A família Passifloraceae pertence ao Filo Magnoliophyta, à Classe Magnoliopsida e à Ordem Malpighiales. Possui aproximadamente 700 espécies, distribuídas em climas tropicais e subtropicais, ocorrendo com maior diversidade nas Américas Central e do Sul (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007; ULMER & MACDOUGAL 2004). Também há registros de indivíduos, em menor grau de diversidade, na região dos paleotrópicos – Ásia, África e Austrália –, América do Norte e Nova Zelândia (OCAMPO et al., 2007).

Passifloraceae *sensu stricto* possui duas tribos e 17 gêneros (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007). No Brasil, quatro gêneros são conhecidos: *Ancistrothyrsus*, *Dilkea*, *Mitostemma* e *Passiflora* (BERNACCI et al., 2015). Dentre esses, o gênero *Passiflora* é o maior e mais importante dentro da família. Existem mais de 530 espécies descritas no mundo, dentre as quais 142 ocorrem no Brasil e 83 destas são endêmicas, tornando o país principal centro de diversidade genética do gênero. Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado são, respectivamente, os domínios fitogeográficos com maior abundância de passifloras (ULMER & MACDOUGAL, 2004; BERNACCI et al., 2015).

No Brasil, as espécies de *Passiflora* são popularmente conhecidas como “maracujás”, nome de origem indígena. É derivado da palavra “maraú-ya” ou “marakuia”, de etnias de Tupis Guaranis, que significa “polpa que se toma de sorvo” ou “alimento em formato de cuia” (ZERAİK et al., 2010).

P. edulis é o maracujazeiro mais conhecido pela população brasileira (Figura 1), comercializado nas variedades de “maracujá-amarelo” ou “azedo” (*P. edulis* f. *flavicarpa* Degener), principalmente, e “maracujá-roxo” (*P. edulis* f. *edulis* Sims) (BERNACCI et al., 2003; FALEIRO et al., 2018).

Figura 1 – Flor e fruto de maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*).



Fonte: A – Da autora (2019); B – Mesquita (2019).

Além desse, *P. alata* Curtis, popularmente chamado de “maracujá-doce”, é outra espécie cultivada nacionalmente, embora possua comercialização ainda restrita por ser pouco conhecida popularmente (ZERAIK et al., 2010). Também a *P. incarnata* Linnaeus, ou “maracujá-rosado”, é uma espécie comercializada no país e, ainda que não seja nativa nem possua frutos comestíveis, é utilizada pela indústria farmacêutica e de cosméticos (ROCHA, 2017).

2.1.1 Aspectos econômicos, nutricionais e farmacológicos

A cultura do maracujá no país começou a ganhar importância econômica entre as décadas de 1960 e 1970 (MADALENA; COSTA; LIMA, 2013). Atualmente, o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, sendo que *P. edulis* ocupa mais de 95% dos pomares. Além disso, a produção dessa espécie já chegou a quase 1 milhão de toneladas em 2014 e, atualmente, é superior a 80% da produção mundial (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016). Sua plantação se encontra em quase todos os estados, com destaque para Bahia e Ceará como os principais produtores (SOZO et al., 2016).

Os frutos do maracujá-amarelo possuem polpa rica em vitamina C, cálcio, fósforo e vitaminas, sendo consumidos *in natura* ou processados na forma de sucos, polpas, geleias e doces, o que aponta grande valor para o mercado nacional e de exportações (MELETTI, 2011; SOZO et al., 2016). Pesquisas realizadas com frutos de passifloras revelam seu potencial de

aproveitamento integral, utilizando, além da polpa, as sementes, a casca e o albedo, o que promove oportunidades de renda para os segmentos produtivos e auxilia na redução do desperdício de alimentos (COELHO; AZEVEDO; UMSZA-GUEZ, 2016; COSTA; LIMA; FALEIRO, 2018).

Suas sementes são boas fontes de ácidos graxos essenciais, de grande interesse para as indústrias de alimentos e cosmética, sendo que o farelo obtido de sua extração é usado na fabricação de ração animal e de esfoliantes (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016; PEREIRA, 2017). A casca do maracujá é rica em vitamina B3, ferro, cálcio, fósforo e fibras solúveis, como pectinas e mucilagens, cada vez mais utilizada em estudos nutricionais na forma de farinha, indicando que o maracujá é um alimento funcional (CÓRDOVA et al., 2005; ZERAIK et al., 2010).

Além dos frutos e suas sementes, suas flores, raízes e, principalmente, folhas, são utilizadas também para fins farmacológicos. Estes órgãos apresentam princípios ativos que garantem a eficácia do maracujá como fitoterápico, recurso terapêutico cada vez mais utilizado pela comunidade médica (ZERAIK et al., 2010; LEAL, 2016). Hoje em dia, muitos preparados à base de *Passiflora*, principalmente com a finalidade calmante, já são encontrados no mercado (FALEIRO & JUNQUEIRA, 2016).

2.1.2 Importância das espécies silvestres

O interesse pela produção de frutos de passifloras silvestres tem aumentado significativamente devido às potencialidades nutricionais, sensoriais e terapêuticas, cada vez mais evidenciadas nos estudos. Maior longevidade, adaptação a condições climáticas adversas e período de florescimento são características vantajosas que estas espécies apresentam, de grande importância econômica. O Brasil, principal centro de biodiversidade do gênero, exibe variabilidade genética suficiente para o desenvolvimento de novas alternativas de produção e uso dos maracujás silvestres (FALEIRO et al., 2018).

O endurecimento dos frutos, a bacteriose, a murcha de *Fusarium* sp. e a antracnose são as principais doenças que acometem as espécies comerciais. Com isso, a busca pela obtenção de híbridos que apresentem resistência a doenças é de extrema importância para os programas de melhoramento genético. Desse modo, as passifloras silvestres representam um leque de possibilidades para os estudos científicos dentro do gênero, uma vez que são fonte de genes resistentes aos principais patógenos da cultura (SOZO et al., 2016; FALEIRO et al., 2018).

Além disso, conhecer as espécies silvestres também permite sua preservação. De acordo com a portaria de número 443 do Ministério do Meio Ambiente, algumas espécies do gênero *Passiflora* encontram-se na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção”, principalmente em virtude do desmatamento extremo da Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado, biomas naturais das espécies nativas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

Dentre as espécies de maracujazeiros silvestres que apresentam as características descritas acima, destaca-se *P. gibertii* N. E. Brown (FIGURA 2).

Figura 2 – Flor e fruto de *P. gibertii*.



Fonte: A – Soares et al. (2011); B – Gurski (2015).

Popularmente denominada de “maracujá-do-campo”, é uma planta rústica nativa do cerrado brasileiro, muito produtiva e de fácil adaptação, com potenciais alimentício e ornamental (BERNACCI et al., 2003). Também se destaca por possuir alta concentração de componentes químicos de interesse para a indústria farmacêutica, aspecto ainda pouco explorado (ARTIOLI-COELHO et al., 2015). Apresenta resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, à morte precoce, à cladospirose, ao *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Phytophthora* sp. (SOUSA & MELETTI, 1997).

2.1.3 Uso medicinal

O uso de *Passiflora* sp. no tratamento de doenças foi descrito pela primeira vez no Peru, em 1569. Desde então, várias espécies do gênero têm sido amplamente utilizadas no sistema tradicional de terapêutica em diversos países até os dias de hoje (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; ANDRADE et al., 2019). Etnofarmacologicamente, o maracujá

é conhecido no mundo todo por diversas propriedades benéficas à saúde, com destaque para *P. incarnata*, *P. alata* e *P. edulis*.

P. incarnata é conhecido como analgésico, antiespasmódico, antiasmático, vermífugo, sedativo e usado para tratar a dependência de morfina (DHAWAN; DHAWAM; SHARMA, 2004). Também é anti-hipertensivo e antitussígeno (ULBRICHT et al., 2008). *P. alata* é anorexígeno, ansiolítico, antidiabético, anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante, além de possuir potenciais citotóxico e hepatotóxico (VASIC et al., 2012; GOMES, 2013; OZAROWSKI & THIEM, 2013; COLOMEU et al., 2014). *P. edulis* é sedativo, diurético, anti-helmíntico, antidiarreico, estimulante, tonificante (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Além disso, pode combater insônia, sintomas de alcoolismo, asma, enxaqueca, bronquite e até infecções urinárias (WALZER; WEINMANN; TOEGEL, 2015).

Outras espécies de passifloras de menor representatividade também são utilizadas etnofarmacologicamente. *P. capsularis* é emenagoga, *P. contrayerva* é desobstruente, *P. suberosa* é usada no tratamento de doenças da pele e *P. quadrangularis* é usada como sedativo, trata dores de cabeça, diabetes e aumenta a pressão arterial. A *P. caerulea* é usada como antiespasmódica e antimicrobiana, e o suco de *P. maliformis* pode aliviar febres intermitentes (DHAWAN; DHAWAM; SHARMA, 2004).

Um benefício à saúde pode ser consequência do uso de remédios ou medicamentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) define “remédio” como qualquer tipo de cuidado utilizado para curar ou aliviar sintomas, como chás caseiros, banhos, massagens ou a prática de atividades físicas. Já o “medicamento” é proveniente de substâncias ou preparos elaborados de modo técnico, por meio do processamento de plantas medicinais ou de similares sintéticos.

Plantas medicinais e fitoterápicos são recursos terapêuticos reconhecidos pela comunidade médica e científica, cada vez mais inseridos nos tratamentos médicos da população. Possuem um importante papel, central ou adjuvante, devido ao crescente custo da prescrição de medicações tradicionais e aumento dos efeitos colaterais advindos destes (LAKHAN & VIEIRA, 2010; NASCIMENTO-JÚNIOR et al., 2016; RIZZI et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), transtornos de ansiedade acometem 9,3% da população brasileira, apontando o Brasil como o país mais ansioso do mundo. Neste contexto, o maracujá é uma das espécies de maior interesse medicinal para o tratamento

ansiolítico, sendo que as partes aéreas da planta, principalmente as folhas, têm uma longa história de uso tradicional para distúrbios de sono e ansiedade (LAKHAN & VIEIRA, 2010; LEAL et al., 2016).

Entre 1970 e 1990, passifloras foram listadas como drogas oficiais pelas farmacopeias da América, Grã-Bretanha, Alemanha, França, Suíça, Egito e Índia, ampliando seu uso para o tratamento de agitação e nervosismo (LAKHAN & VIEIRA, 2010). A Farmacopeia é um documento de cada nação que registra medicamentos sintéticos e fitoterápicos e lista as espécies reconhecidas oficialmente como medicinais para aquele país, que podem ser utilizadas na elaboração de medicamentos.

Apesar da diversidade nacional de passifloras, apenas *P. edulis* e *P. alata* estão incluídas na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Um exemplo bem conhecido de medicamento contendo *P. alata* é o Maracugina®, composto de *P. alata*, *Erythrina mulungu* e *Crataegus oxyacantha* (ANDRADE et al., 2019).

2.1.4 Metabólitos secundários

Toda a diversidade de efeitos e benefícios à saúde discutida anteriormente é consequência da ação, isolada ou em conjunto, dos metabólitos secundários presentes no maracujá. Os metabólitos secundários são compostos pouco abundantes nos vegetais e de distribuição restrita, mas que desempenham vários papéis importantes na adaptação das plantas aos diferentes ecossistemas (HARBORNE, 1994).

São quimicamente distintos e usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética. Três famílias de moléculas principais são consideradas: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados. Esses produtos estão envolvidos na proteção da planta, defesa contra patógenos, competição planta-planta e nas simbioses plantas-microorganismos, além de serem essenciais para a atração de polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ et al., 2017).

Devido à ampla gama de atividades biológicas às quais estão associados, os metabólitos secundários têm sido usados há séculos na medicina tradicional. Hoje, quase um terço dos medicamentos é exclusivamente oriundo de plantas, mediante seu processamento pela indústria farmacêutica ou sua manipulação por farmácias (PIMENTEL et al., 2015).

O isolamento e reconhecimento dos princípios ativos das plantas, visando a formulação de fitoterápicos e outros medicamentos derivados, dependem do uso de ferramentas farmacobotânicas e técnicas de análises cromatográficas. Estas são essenciais para a identificação de compostos provenientes do metabolismo secundário, particularmente importantes para as espécies de passifloras, uma vez que a natureza diversa de suas propriedades biológicas está intimamente associada a um vasto número de moléculas químicas (PIMENTEL et al., 2015; WOSCH et al., 2017).

No gênero *Passiflora*, os constituintes químicos mais frequentemente citados são os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (GADIOLI et al., 2018). Apesar de apresentarem uma ampla distribuição no gênero, diferenças qualitativas e quantitativas foram relatadas para essas substâncias, principalmente nas espécies cultivadas como *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. alata*, que apresentam elevados teores. Isto pode ser devido ao provável efeito da seleção direcionada para essa finalidade, uma vez que tais substâncias estão relacionadas com a maioria das atividades biológicas do maracujá (GOSMANN et al., 2011; MONTERO, 2017).

As substâncias fenólicas se destacam pelo importante papel na inibição da síntese de radicais livres por processos celulares oxidativos, atividade conhecida como antioxidante. São caracterizados pela presença de uma ou mais hidroxilas funcionais acopladas a um anel aromático, o grupo fenol, apresentando número variado de carbonos de acordo com a classe fenólica (ANGELO & JORGE, 2007).

Com a descoberta da propriedade antioxidante dos compostos fenólicos vegetais, aumentou-se o interesse na sua aplicação, como alternativa aos fármacos e antioxidantes sintéticos. Esses metabólitos também podem influenciar a qualidade da produção alimentícia, além de produzirem baixos resíduos tóxicos (ANGELO & JORGE, 2007). Além de evitar o estresse oxidativo dos tecidos, aos fenóis são atribuídas diversas outras ações, como anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antiviral, fotoprotetora, estrogênica e anticoagulante (CUNHA et al., 2016).

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonoides, que integram a maior classe dentro deste grupo, são extremamente abundantes nas passifloras. Devido à sua grande prevalência, diversidade estrutural e estabilidade química, os flavonoides são marcadores químicos adequados para fornecer a autenticação de amostras, utilizados na padronização do maracujá em sua forma medicamentosa (ANGELO & JORGE, 2007; GOSMANN et al., 2011).

A composição bioquímica de extratos de diferentes partes das plantas de *P. alata*, *P. incarnata* e *P. edulis* tem sido extensivamente estudada ao longo das últimas décadas, devido ao interesse medicinal e econômico associado a elas (PATEL et al., 2011; MONTERO, 2017). Já neste ano, por exemplo, foi publicado um trabalho associando a atividade antiproliferativa em colônias celulares de adenocarcinoma humano aos flavonoides rutina e quercetina, presentes nos extratos foliares de *P. edulis* f. *flavicarpa* (RAMIREZ et al., 2019). No entanto, o estudo fitoquímico de espécies menos comuns do gênero, principalmente de passifloras silvestres, permanece pouco explorado (MONTERO, 2017).

2.1.5 Produção *in vitro* de metabólitos secundários

O teor final de metabólitos secundários nas plantas medicinais é afetado por diversos fatores, sejam eles endógenos à planta, como a ontogenia e o ritmo circadiano ou exógenos, como as condições ambientais. Fatores como coleta, estabilização e estocagem também podem influenciar a qualidade do material vegetal e, conseqüentemente, o valor terapêutico dos fitoterápicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Além disso, apesar dos grandes avanços da química sintética, a produção de metabólitos secundários ainda é feita majoritariamente pelo cultivo das plantas medicinais. Isto limita a produção de algumas espécies fora de seus ecossistemas locais, devido à susceptibilidade à patógenos, além de aumentar a exploração exaustiva de outras tantas (FUMAGALI et al., 2008).

De modo a evitar as conseqüências advindas dos fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários bem como a limitação da produtividade e risco de extinção das espécies medicinais, o cultivo *in vitro* de tecidos representa uma estratégia promissora e sustentável, permitindo a síntese e manipulação dos fitoconstituintes de maneira controlada e em larga escala (GAOSHENG & JINGMING, 2012; ISAH, 2015). Além disso, as culturas celulares podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de algumas semanas, em comparação com a produção na planta, que pode levar anos (FUMAGALI et al., 2008).

Técnicas de propagação *in vitro* já foram estabelecidas para diversas passifloras e possuem aplicações variadas, visando a rápida multiplicação de indivíduos e a obtenção de plantas-matrizes com características desejáveis, que são fonte de compostos bioativos. Entretanto, o cultivo *in vitro* de espécies de *Passiflora* com a finalidade de produção de

metabólitos secundários é relatado em poucos trabalhos na literatura, demonstrando a importância da criação de protocolos, principalmente voltado para as espécies silvestres com este objetivo (SOZO et al., 2016).

Como a biossíntese e armazenamento dos metabólitos é restrita a alguns tipos de células e tecidos especializados, a extração e a purificação dos produtos são difíceis de se executar. Desse modo, diversas ferramentas biotecnológicas podem ser aplicadas às espécies cultivadas *in vitro*, visando não apenas a produção, mas a otimização deste processo, como por exemplo a indução de calos e estabelecimento de suspensões celulares (SOUZA; SOUZA; NUNEZ, 2018). Alguns protocolos existentes baseiam-se, por exemplo, nos métodos já estabelecidos para *P. tenuifila* e *P. setacea*, envolvendo a isolação de gemas, seguida pela indução de calos e então a avaliação do seu teor de compostos secundários (SOZO et al., 2016).

O calo é um aglomerado de células em diferentes estádios de dediferenciação. Na natureza, as plantas podem gerar calo em resposta a um determinado estresse, como um ferimento mecânico ou uma infecção patogênica. A formação de calo, denominada calogênese, pode também ser obtida *in vitro*, normalmente pela aplicação de diversos reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Seu potencial proliferativo faz com que o calo seja uma boa fonte de biossíntese de metabólitos secundários, uma vez que a grande quantidade de biomassa vegetal obtida com o calo possibilita a manipulação dos fatores que influenciam a produção destes compostos (VERPOORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002). Além disso, a constatação de que ocorrem modificações no teor de compostos de acordo com o grau de diferenciação das células levou ao desenvolvimento de várias pesquisas, com o intuito de se estudar a viabilidade de produção de compostos em calos com diferentes características (FLORES; NICOLOSO; VASCONCELLOS, 2006).

No contexto da cultura de tecidos, o meio de cultivo é extremamente importante para o desenvolvimento do explante. Esse fornece as condições nutricionais e de sinalização hormonal, esta última afetada pela adição de reguladores de crescimento externos. Estas substâncias, dissolvidas no meio, podem atuar na produção de metabólitos secundários, uma vez que influenciam diversos processos fisiológicos nos vegetais (NAMDEO, 2007).

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de células estão as auxinas e as citocininas. A concentração e a combinação ideais desses para suplementar o meio de cultura dependem da espécie, do tipo de tecido ou órgão e do objetivo da pesquisa (JARDIM et al., 2010). As auxinas desempenham diversas funções no desenvolvimento vegetal, incluindo o alongamento celular, a dominância apical e o enraizamento. Já as citocininas estão envolvidas nos processos de divisão celular, proliferação e formação da parte aérea (TAIZ et al., 2017).

As auxinas mais utilizadas na cultura de tecidos são o AIA (ácido indol-3-acético), o AIB (ácido indol-3-butírico), o 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético) e o Picloram (PIC), esse último bastante utilizado para a indução de calos em diferentes espécies (ARTIOLI-COELHO et al., 2015). Já as citocininas mais usadas são o BAP (6- benzilaminopurina), a Zeatina (ZEA), o Thidiazuron (TDZ) e a Cinetina (KIN), essa última importante por ser termo-estável, uma vez que nenhum produto de sua decomposição é observado após sua autoclavagem (PAIVA & PAIVA, 2001). Várias respostas de crescimento e regeneração de calos já foram observadas com o uso de PIC e KIN no meio de cultivo, indicando o potencial destes reguladores em estudos envolvendo a calogênese (KAUR & KOTHARI, 2004).

De acordo com Skoog e Miller (1957), a razão entre eles é responsável por regular a morfogênese de plantas cultivadas *in vitro*, estimulando diferentes processos. No trabalho de Rocha, Monte-Bello e Dornelas (2015), foi realizado um diagrama esquemático para as diferentes vias morfogenéticas em embriões zigóticos de *P. edulis*, nas quais a razão entre auxina e citocinina utilizada se mostrou essencial na indução de organogênese, calogênese ou embriogênese somática, dependendo das concentrações aplicadas. Com isso, foi possível demonstrar que, em níveis intermediários destes fitoreguladores, a formação do calo é favorecida.

A formulação dos meios de cultura com o uso de diferentes combinações e concentrações de reguladores de crescimento, além de desenvolver mudanças morfogenéticas, é usada visando o acúmulo de metabólitos de interesse nos explantes (NAMDEO, 2007). Além disso, a síntese de produtos secundário *in vitro* é influenciada pelo genótipo da planta-matriz, tipo de explante e, no caso do calo, é importante considerar seu tecido de origem e o tempo de estabelecimento da cultura (SOZO et al., 2016). O crescimento dos calos ao longo do tempo geralmente apresenta um padrão sigmoidal, com cinco fases: lag, exponencial,

linear, desaceleração e estacionária. A última fase representa o período no qual ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A calogênese é bastante empregada em estudos envolvendo espécies de *Passiflora*. Em *P. suberosa*, estudou-se a influência dos diferentes tipos de explante, reguladores de crescimento, sais do meio de cultivo e qualidade de luz na indução de calos (GARCIA et al., 2011). Fitorreguladores e antioxidantes presentes no meio de cultivo já foram estudadas quanto aos seus efeitos na calogênese e organogênese em *P. edulis* f. *edulis* (HUH; LEE; NAM, 2017). *P. gibertii* já foi estudada quanto à indução de calos a partir do uso de citocininas (FIGUEIREDO et al., 2007) e quanto à produção de compostos fenólicos ao longo do tempo, a partir da calogênese induzida pelo balanço entre citocininas e auxinas (ARTIOLI-COELHO et al., 2015). Além disso, o efeito de diferentes auxinas na indução de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* já foi estudado em relação à produção fenólica e de flavonoides nestas espécies, também em função do tempo de cultivo (SOZO et al., 2016; FIGUEIREDO, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Gerar conhecimentos sobre a influência de reguladores de crescimento e do tempo de cultivo na produção de compostos fenólicos e flavonoides totais em calos de *P. gibertii*, em comparação com *P. edulis*, permitindo avaliar o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção dos compostos bioativos.

3.2 Objetivos específicos

1 – Comparar o rendimento de compostos fenólicos com a de flavonoides totais das espécies estudadas, a partir dos reguladores de crescimento e tempos de cultivo utilizados.

2 – Determinar a massa fresca dos calos das duas espécies trabalhadas e relacionar o acúmulo desta com os reguladores de crescimento e tempos de cultivo utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP), Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. A quantificação dos produtos secundários foi realizada

no Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças, do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas matrizes de *P. edulis* (BRS Rubi do Cerrado) e *P. gibertii* (acesso CPAC MJ-22-02), cultivadas em casa de vegetação a partir de sementes da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados – Planaltina, DF, doadas pelo pesquisador Dr. Fábio Gelape Faleiro.

4.2 Indução de calos

Folhas jovens de duas espécies de maracujazeiro (*P. edulis* e *P. gibertii*) foram coletadas de plantas matrizes presentes em casa de vegetação. Na câmara de fluxo laminar, o material foi submetido à desinfestação, feita com álcool 70% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2,5% acrescido de uma gota de Tween, por quinze minutos, e posteriormente lavado três vezes com água destilada autoclavada. Após a desinfestação, secções foliares de 0,5 cm² foram excisadas com o bisturi e inoculadas em tubos de ensaio, com a face adaxial do limbo foliar em contato com o meio de cultura.

Para a indução de calogênese utilizou-se o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, suplementado com a auxina Picloram (PIC), nos níveis 0, 4, 8 e 16 µM em combinação ou não com os níveis da citocinina Cinetina (KIN), 0 e 2,5 µM. O pH do meio foi ajustado para 5,75 ± 0,05, antes da autoclavagem a 120 °C e 1 atm de pressão por vinte minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de dezesseis horas, durante trinta dias.

No prazo estimado avaliou-se os tratamentos quanto à área calogênica obtida (cm²), com auxílio do software *ImageJ* (Versão 1.48, 2014). Para isso, foi considerada a porcentagem de calo por tratamento e a cobertura calogênica de cada parcela experimental, representada por um explante foliar. Foram utilizadas vinte repetições por tratamento.

Após a avaliação dos calos em área, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições descritas acima, e amostras foram coletadas após quarenta, sessenta e oitenta dias de cultivo para a determinação da massa fresca e, posteriormente, de compostos fenólicos e flavonoides totais, sem nenhum subcultivo entre os tempos.

4.3 Determinação da massa fresca

Para a determinação da massa fresca, utilizou-se calos proveniente de três tratamentos testados anteriormente, nas proporções de PIC/KIN (μM): 4,0/2,5; 8,0/2,5 e 16,0/2,5, que foram as melhores concentrações observadas para a indução e aumento da cobertura calogênica em *P. gibertii*, foco deste trabalho.

Os calos foram retirados da sala de crescimento e pesados aos quarenta, sessenta e oitenta dias de estabelecimento. A cada coleta pesou-se calos das duas espécies, em balança analítica comum e escolhidos ao acaso, sendo que novas parcelas foram usadas para coletas subsequentes. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

Após a pesagem, os calos foram imediatamente utilizados na elaboração dos extratos vegetais, e estes, então, foram armazenados em refrigerador (-80 °C) até o momento da determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais.

4.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais utilizou-se calos proveniente de três tratamentos testados anteriormente, nas proporções de PIC/KIN (μM): 4,0/2,5; 8,0/2,5 e 16,0/2,5, que foram as melhores concentrações observadas para o aumento da cobertura calogênica em *P. gibertii*, foco deste trabalho. Foram utilizadas, no total, cinco repetições por tratamento para cada espécie, sendo cada parcela experimental representada por um calo. Também foi usado um controle externo, constituído de folhas de plantas matrizes das duas espécies, crescidas na casa de vegetação.

Para a elaboração dos extratos, triturou-se calos e folhas de *P. gibertii* e *P. edulis* em nitrogênio líquido, e então foi adicionado metanol 80% ao material triturado, estabelecendo o volume final da amostra em 10 mL. Após maceração por duas horas no escuro, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm em centrífuga refrigerada, à temperatura de 15 °C, por quinze minutos.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado a partir do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como composto padrão, de acordo com Waterhouse et al. (2003), com modificações. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL do extrato de maracujá (calos e folhas), 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2M e 2,0 mL de carbonato de sódio 4%. As misturas foram homogeneizadas em

vórtex e repousaram durante duas horas, no escuro. Posteriormente foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro de luz UV-Visível, a 750 nm.

A quantificação dos fenólicos foi realizada com base na curva padrão construída, utilizando as concentrações de 1,5; 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico, obtendo-se a seguinte equação: $y = 0,0204x + 0,0166$ ($R^2 = 0,9991$). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico a cada 100 g de material vegetal fresco.

4.5 Determinação de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado utilizando o flavonoide quercetina como padrão, de acordo com Zacarias et al. (2007), com modificações. Em um tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de etanol PA, 0,5 mL do mesmo extrato de maracujá (calos e folhas) feito anteriormente e 0,5 mL de cloreto de alumínio 2%. As misturas foram homogeneizadas em vórtex e repousaram durante duas horas, no escuro. Posteriormente foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro de luz UV-Visível, a 420 nm.

A quantificação dos flavonoides foi realizada com base na curva padrão construída, utilizando as concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 120; 160; 180 e 200 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, obtendo-se a seguinte equação: $y = 0,0159x - 0,0205$ ($R^2 = 0,9984$). Os resultados foram expressos em mg de quercetina a cada 100 g de material vegetal fresco.

4.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão polinomial. No caso de comparação entre mais que dois tratamentos, as médias foram separadas pelo teste de Scott-Knot, a 5% de significância. Os cálculos foram feitos com auxílio do software *Sisvar* (FERREIRA, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de calos

Após trinta dias de estabelecimento, verificou-se a presença de calos em explantes foliares de *P. gibertii* em todos os tratamentos testados ($p \leq 0,05$). As maiores coberturas calogênicas foram observadas em explantes nas concentrações de PIC/KIN: 4,0/2,5; 8,0/2,5 e 16,0/2,5, com as áreas (cm^2): 1,593; 1,633 e 1,413, sem ter havido diferença estatística entre

elas. As menores coberturas calogênicas foram vistas no tratamento controle, no qual não se adicionou fitorreguladores, apresentando cerca de 0,009 cm² por explante (TABELA 1).

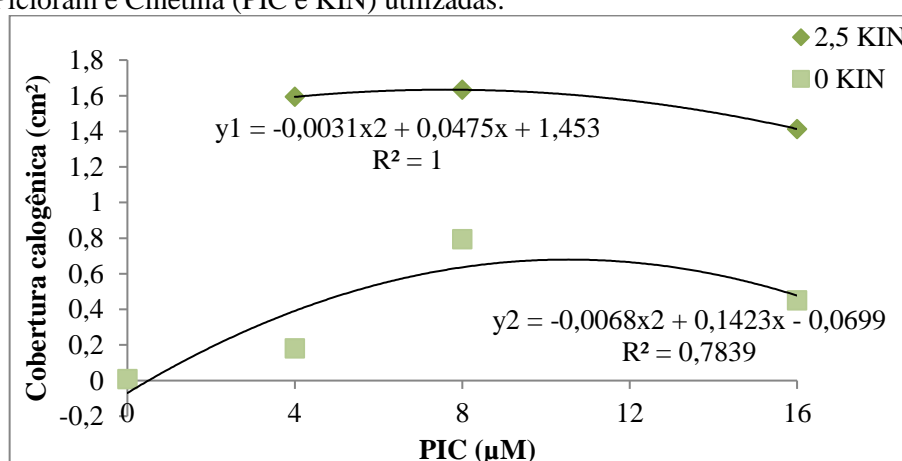
Tabela 1 – Presença de calos e cobertura calogênica em explantes foliares de *P. gibertii*.

| PIC/KIN (μM) | PRESENÇA DE CALOS (%) | COBERTURA CALOGÊNICA (cm ²) |
|--------------|-----------------------|---|
| 0/0 | 65% b | 0,009 d |
| 4,0/0 | 100% a | 0,181 d |
| 8,0/0 | 100% a | 0,794 b |
| 16,0/0 | 100% a | 0,451 c |
| 4,0/2,5 | 90% a | 1,593 a |
| 8,0/2,5 | 100% a | 1,633 a |
| 16,0/2,5 | 100% a | 1,413 a |

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

A cobertura calogênica foi estudada em função das combinações de PIC/KIN utilizadas, por meio da análise de regressão, na qual foi possível verificar a correlação entre a formação de calos e a concentração de fitorreguladores utilizada para *P. gibertii* ($p \leq 0,05$). Observou-se forte dependência da calogênese pela combinação entre PIC/KIN para esta espécie, uma vez que as maiores formações de calos foram vistas quando se utilizou os fitorreguladores em conjunto no meio de cultura (FIGURA 3).

Figura 3 – Cobertura calogênica em explantes foliares de *P. gibertii* em função das combinações entre Picloram e Cinetina (PIC e KIN) utilizadas.



Equação “y1” referente ao comportamento de PIC na presença de KIN; equação “y2” referente ao comportamento de PIC na ausência de KIN. Fonte: Da autora (2019).

Para *P. edulis*, após trinta dias de estabelecimento, verificou-se a presença de calos apenas em quatro tratamentos ($p \leq 0,05$). As maiores coberturas calogênicas foram observadas

em explantes nas concentrações de PIC/KIN: 8,0/2,5 e 16,0/2,5, com as áreas (cm²): 0,944 e 0,852, sem ter havido diferença estatística entre elas. As menores coberturas calogênicas foram vistas na combinação 4,0/2,5, alcançando uma área de 0,383 cm² por explante (TABELA 2).

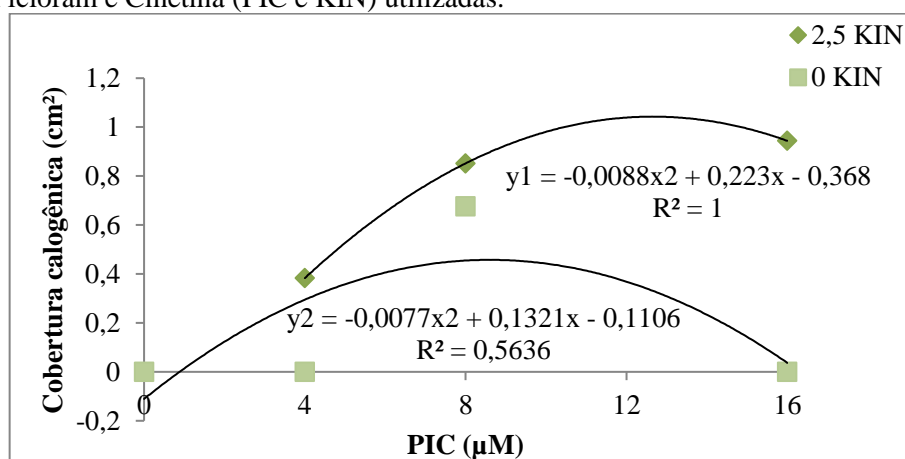
Tabela 2 – Presença de calos e cobertura calogênica em explantes foliares de *P. edulis*.

| PIC/KIN (μM) | PRESENÇA DE CALOS (%) | COBERTURA CALOGÊNICA (cm ²) |
|--------------|-----------------------|---|
| 8,0/0 | 90% b | 0,676 b |
| 4,0/2,5 | 85% b | 0,383 c |
| 8,0/2,5 | 100% a | 0,852 a |
| 16,0/2,5 | 100% a | 0,944 a |

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

A cobertura calogênica também foi estudada em função das combinações de PIC/KIN utilizadas, por meio da análise de regressão. Houve menor dependência da calogênese pela combinação entre PIC/KIN para esta espécie, pois as maiores formações de calos foram vistas quando se utilizou apenas PIC, na concentração intermediária (8,0 μM), ou em conjunto com KIN, em concentrações mais elevadas (8,0 e 16,0 μM). Portanto, aumentando-se os níveis de auxina exógena, a formação de calos foi favorecida (FIGURA 4).

Figura 4 – Cobertura calogênica em explantes foliares de *P. edulis* em função das combinações entre Picloram e Cinetina (PIC e KIN) utilizadas.



Equação “y1” referente ao comportamento de PIC na presença de KIN; equação “y2” referente ao comportamento de PIC na ausência de KIN. Fonte: Da autora (2019).

O balanço hormonal entre citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, estimula a proliferação celular, essenciais para a formação de calos (GEORGE; HALL;

KLERK, 2008). Este fato pôde ser observado em *P. gibertii*, uma vez que a ausência de fitorreguladores não foi eficiente no aumento da cobertura calogênica e os melhores tratamentos para a indução de calos foram os que utilizaram a combinação entre PIC e KIN. Como a cobertura calogênica não foi alterada com 2,5 μ M de KIN, confirmou-se o papel central de PIC neste processo, relatado como uma auxina que induz alta formação de calos (PACHECO et al., 2012).

Em um trabalho de calogênese em graviola (*Annona muricata*), foi observado que o balanço entre reguladores de crescimento no meio de cultivo leva à indução de calos em diferentes taxas, sendo que sua velocidade indutiva depende da concentração destes reguladores, juntamente com as taxas hormonais endógenas do explante (HAMAD & MAJID, 2018). Isto foi observado para *P. gibertii*, revelando que a sinalização hormonal atua nesta espécie influenciando o crescimento em massa fresca de acordo com a concentração de auxina presente no meio de cultivo.

No entanto, muitos tecidos se desenvolvem *in vitro* apenas com a adição de auxinas no meio de cultivo. O tratamento com auxinas faz com que células diferenciadas do explante sofram a desdiferenciação, além de acelerar a divisão celular, culminando na formação do calo (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Isto explica porque a calogênese foi observada em alguns tratamentos com a ausência de KIN. Também pode esclarecer o motivo da calogênese em *P. edulis* ter sido favorecida com a presença de KIN no meio de cultura, uma vez que aumentou a resposta dose dependente de PIC.

Em outros trabalhos envolvendo o estudo da calogênese, *P. tenuifila*, *P. alata* e *P. setacea* se mostraram fortemente dependentes da adição de concentrações elevadas de auxinas para a formação de calos (PACHECO et al., 2012; WOLFART, 2015; SOZO et al., 2016; FIGUEIREDO, 2018). Já espécies como *P. gibertii* formaram calo na ausência de auxinas (FIGUEIREDO et al., 2007) ou a partir do equilíbrio entre auxinas e citocininas (ARTIOLI-COELHO et al., 2015), assim como visto em *P. edulis* (ROCHA et al., 2015), apresentando o mesmo comportamento observado neste trabalho.

Para a determinação da massa fresca e dos compostos fenólicos e flavonoides totais, calos submetidos às proporções PIC/KIN: 4,0/2,5; 8,0/2,5 e 16,0/2,5, de ambas as espécies, foram selecionados para compor as amostras (FIGURAS 5 e 6).

Figura 5 – Calos obtidos por explantes foliares de *P. gibertii*, após trinta dias de estabelecimento.



Proporção PIC/KIN (μM) utilizada: 4,0/2,5 (A); 8,0/2,5 (B) e 16,0/2,5 (C). Fonte: Da autora (2019).

Figura 6 – Calos obtidos por explantes foliares de *P. gibertii*, após trinta dias de estabelecimento.



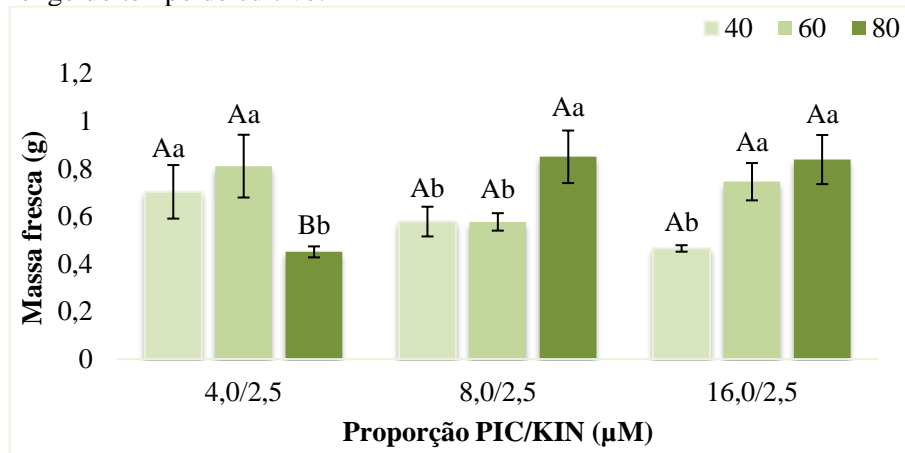
Proporção PIC/KIN (μM) utilizada: 4,0/2,5 (A); 8,0/2,5 (B) e 16,0/2,5 (C). Fonte: Da autora (2019).

5.2 Determinação da massa fresca

A análise da variância mostrou que houve diferença estatística e interação significativa entre os fatores estudados para massa fresca dos calos ($p \leq 0,05$) apresentando um coeficiente de variação igual à 25,2%.

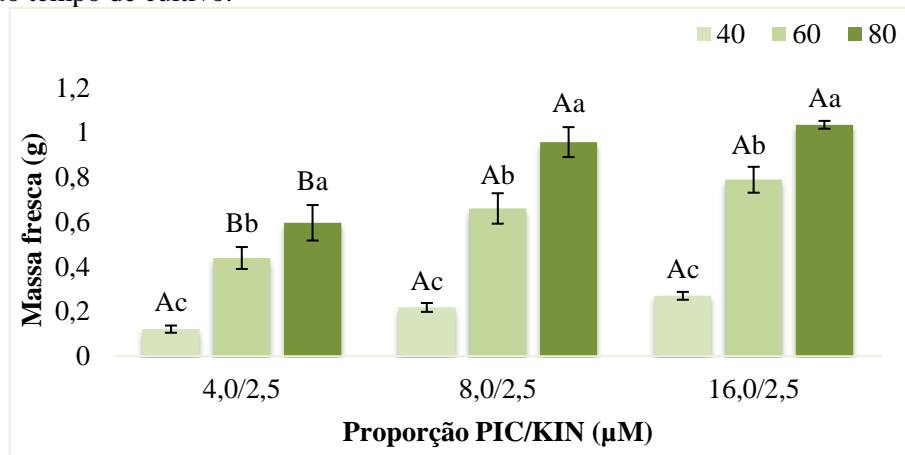
A comparação da massa fresca média obtida pelos calos de *P. gibertii* e *P. edulis* submetidos às diferentes proporções de PIC/KIN e dias de cultivo foi feita pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância (FIGURAS 7 e 8).

Figura 7 – Massa fresca de calos de *P. gibertii* submetidos a diferentes proporções de PIC/KIN ao longo do tempo de cultivo.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo, em cada proporção de PIC/KIN (μM), e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma proporção de PIC/KIN (μM), em cada tempo de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

Figura 8 – Massa fresca de calos de *P. edulis* submetidos a diferentes proporções de PIC/KIN ao longo do tempo de cultivo.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro do mesmo tempo de cultivo, em cada proporção de PIC/KIN (μM), e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma proporção de PIC/KIN (μM), em cada tempo de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

Em *P. gibertii*, as concentrações de PIC influenciaram o acúmulo de biomassa de modo diferente em cada tempo de cultivo. Até sessenta dias, a massa é a mesma, independentemente do nível de auxina, para alguns tratamentos observados. Aos oitenta dias, a menor concentração de PIC utilizada influenciou negativamente o acúmulo de massa fresca.

Em *P. edulis*, as concentrações de PIC influenciaram o acúmulo de biomassa do mesmo modo em cada tempo de cultivo. Aos quarenta dias, a massa é a mesma,

independentemente do nível de auxina, para alguns tratamentos observados. A partir de sessenta dias, a menor concentração de PIC utilizada também influenciou negativamente o acúmulo de massa fresca.

Existem dois estágios na produção de metabólitos secundários a partir do cultivo *in vitro*. O primeiro consiste no cultivo de células para o crescimento e acúmulo de biomassa e o segundo se refere à síntese de metabólitos (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Esse padrão pôde ser visto para aos calos de *P. edulis*, uma vez que a biomassa fresca foi acumulada com o tempo, independentemente da proporção de PIC/KIN utilizada, indicando o investimento da espécie em crescimento, num primeiro momento, sem responder aos níveis de fitorreguladores exógenos. No entanto, esta relação não foi vista para os calos de *P. gibertii*.

Similarmente para as espécies, verificou-se que, a partir de um certo período de tempo, as concentrações de PIC levaram às diferentes respostas no acúmulo de massa fresca. Foi visto que o menor nível desta auxina não é capaz de aumentar a massa dos calos, em comparação com os demais. Isto se deve, provavelmente, ao fato da disponibilidade de PIC no meio de cultivo, uma vez que, com o passar do tempo, os calos demandaram maior quantidade de auxina para estimular divisões celulares, essenciais para o crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

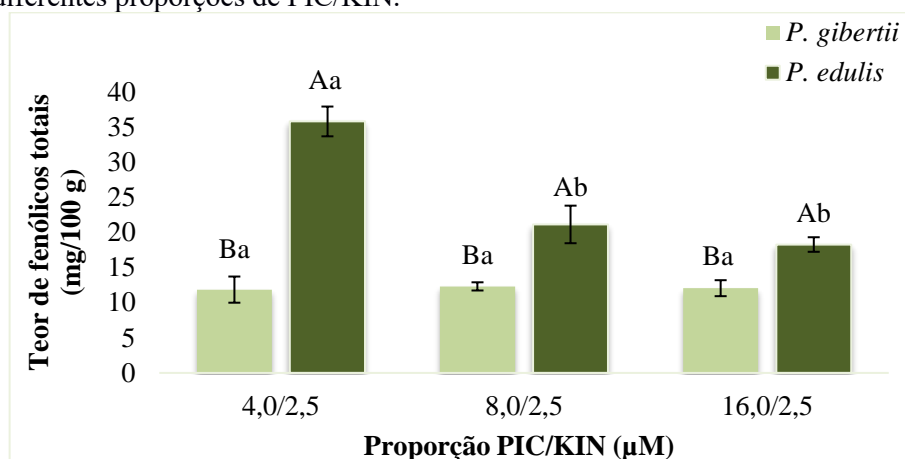
5.3 Determinação de compostos fenólicos totais

A análise da variância mostrou que houve diferença estatística e interação significativa entre os fatores estudados para o teor de fenólicos totais ($p \leq 0,05$) apresentando um coeficiente de variação igual à 25,54%.

Considerando apenas os controles externos (extratos foliares) em comparação com os demais tratamentos (extratos de calos), foi possível verificar maiores teores de compostos fenólicos nas folhas do que nos calos. Os maiores teores foram observados para *P. edulis*, que apresentou cerca de $209,35 \pm 54,95$ mg/100 g, em detrimento de *P. gibertii*, com média de $91,76 \pm 17,09$ mg/100 g.

A comparação do teor de fenólicos totais nos extratos de calos obtido por cada espécie, proporção de PIC/KIN e dias de cultivo foi feita pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, sendo significativa apenas aos quarenta dias de cultivo (FIGURA 9).

Figura 9 – Teor de fenólicos totais aos 40 dias em calos de *P. gibertii* e *P. edulis*, submetidos a diferentes proporções de PIC/KIN.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as espécies e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma espécie, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

O rendimento em *P. edulis* foi maior do que em *P. gibertii*, independentemente das concentrações de auxina utilizadas. *P. edulis* é capaz de produzir maior quantidade de compostos fenólicos na concentração mais baixa de auxina (4,0 μM). Já *P. gibertii* não tem seu rendimento fenólico alterado pelas diferentes concentrações de PIC.

Em *P. gibertii*, a produção fenólica não foi alterada ao longo do tempo, indicando estabilidade nesta espécie. Já em *P. edulis*, observou-se que o rendimento de compostos fenólicos decresce a partir dos sessenta dias. Desse modo, a partir dos sessenta dias, as espécies não apresentam diferença significativa no acúmulo de fenóis.

Em extratos foliares de *P. cincinnata*, foi encontrado 45,53 mg/100 g de ácido gálico (LEAL et al., 2018). Similarmente no maracujá-cobra (*P. trintae*), determinou-se cerca de 47,89 mg/100 g de compostos fenólicos em extratos foliares, também expressos em ácido gálico (MIRANDA, 2015). Em um trabalho utilizando ácido tânico como padrão de determinação fenólica, encontrou-se 708,63 mg /100 g de compostos fenólicos em folhas de *P. gibertii*. Os fenóis totais quantificados em calos, provenientes destas folhas, alcançaram valores entre 16,25 mg/100 g e 66,213 mg/100 g, quando os meios de cultivo foram suplementados com 4,14 μM de PIC + 0,207 μM de KIN e 8,28 μM de PIC + 0,828 μM de KIN, respectivamente (ARTIOLI-COELHO et al., 2015).

As diferenças no rendimento de compostos fenólicos podem ser atribuídas à diversidade genética, estado fisiológico e condições de cultura dos explantes (GEORGE;

HALL; KLERK, 2008). A diversidade genética foi um fator crucial, uma vez que os indivíduos selecionados vieram de sementes, genotipicamente únicas; assim como as concentrações de fitorreguladores utilizadas, que podem alterar a sinalização hormonal endógena e modificar as rotas biossintéticas; e também o composto padrão utilizado, ácido tânico ou ácido gálico, sendo que essas moléculas interagem de modo diferente quando extraídas, modificando a determinação fenólica (MIRANDA, 2015).

O decréscimo do teor fenólico em *P. edulis*, aos sessenta dias, pode ser explicado devido à presença de sacarose no meio de cultivo. Além de energia metabólica, os açúcares fornecem esqueletos de carbono para a biossíntese de metabólitos secundários (CALDAS et al., 1998). Devido à demanda das fases de crescimento dos calos, os açúcares foram utilizados pelo metabolismo primário, acarretando no declínio de metabólitos secundários ao longo do tempo. Isto não foi observado em *P. gibertii*, indicando que o metabolismo voltado à biossíntese destes compostos varia entre as espécies de *Passiflora*.

O fato do teor de fenólicos totais ter sido maior em *P. edulis* do que em *P. gibertii*, aos quarenta dias de cultivo, pode ser devido à influência do tecido foliar, provavelmente ainda presente no explante neste período (ARTIOLI-COELHO et al., 2015). Coerente com essa observação, verificou-se também maior rendimento fenólico nas folhas de *P. edulis* do que em *P. gibertii*. Este resultado corrobora uma das hipóteses deste trabalho, de que a espécie medicinal (*P. edulis*) apresentaria maior teor de metabólitos secundários, uma vez que sua seleção é direcionada à esta finalidade (MONTERO, 2017).

Tecidos indiferenciados possuem capacidade limitada em sintetizar compostos fenólicos. Porém, ao sofrerem organogênese, seu rendimento aumenta significativamente (PALACIO et al., 2012). Manter as culturas de *P. gibertii* mais tempo *in vitro* pode contribuir para o aumento do rendimento, já que isto favorece a diferenciação celular. Além disso, uma curva de crescimento elaborada para calos de *P. gibertii* mostrou que a fase de desaceleração ocorre entre o 70° e 80° dia de estabelecimento (FIGUEIREDO et al., 2007). O período de tempo observado pode não ter sido suficiente para esta espécie, uma vez que o acúmulo de metabólitos é visto na fase posterior à esta (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Os calos de *P. edulis* têm maior produção fenólica quando o menor nível de auxina é utilizado. No entanto, este comportamento foi visto apenas aos quarenta dias de cultivo, sendo que, a partir dos sessenta dias, a concentração de PIC não influenciou seu rendimento. Para o acúmulo de biomassa destes calos, também não foi visto influência pelas concentrações de

PIC. Componentes do meio de cultivo associados a diferentes fitorreguladores, bem como a diversos elicitores, que estão envolvidos com a sinalização do metabolismo secundário, apresentam capacidade de melhorar a produção fenólica (GIRI & ZAHEER, 2016), o que seria interessante para esta espécie com o passar do tempo.

Em *P. gibertii*, a sensibilidade ao PIC não foi verificada. Como seu crescimento foi influenciado pelas concentrações de PIC, isto indica que há uma atividade metabólica relacionada à quantidade de auxina disponível no meio de cultivo. No entanto, pode ser que os níveis hormonais endógenos cessaram a produção fenólica, seja pela diminuição metabólica induzida pelo etileno, seja pelo tipo e concentração de auxina fornecida ao meio (SKOOG & MILLER, 1957). Sugere-se que estudos futuros sejam desenvolvidos com esta espécie, a fim de otimizar um protocolo de produção fenólica *in vitro*, seja utilizando maior período de tempo de observação, seja com o uso de outros fitorreguladores e concentrações.

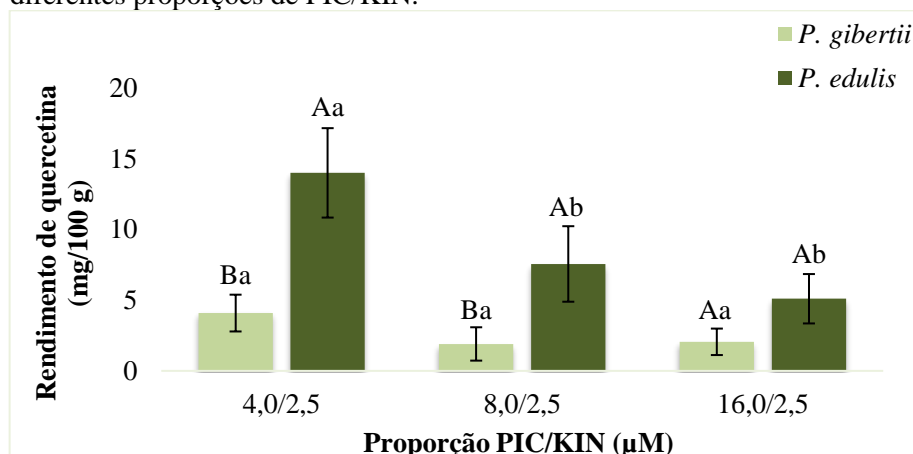
5.4 Determinação de flavonoides totais

A análise da variância mostrou que houve diferença estatística e interação significativa entre os fatores estudados para o rendimento de flavonoides ($p \leq 0,05$) apresentando um coeficiente de variação igual à 81,9%.

Considerando apenas os controles externos (extratos foliares) em comparação com os demais tratamentos (extratos de calos), foi possível verificar maiores teores de flavonoides nas folhas do que nos calos. O maior rendimento foi visto para *P. gibertii*, que apresentou cerca de $211,15 \pm 26,83$ mg/100 g em detrimento de *P. edulis*, cujo rendimento médio foi de $99,28 \pm 35,28$ mg/100 g.

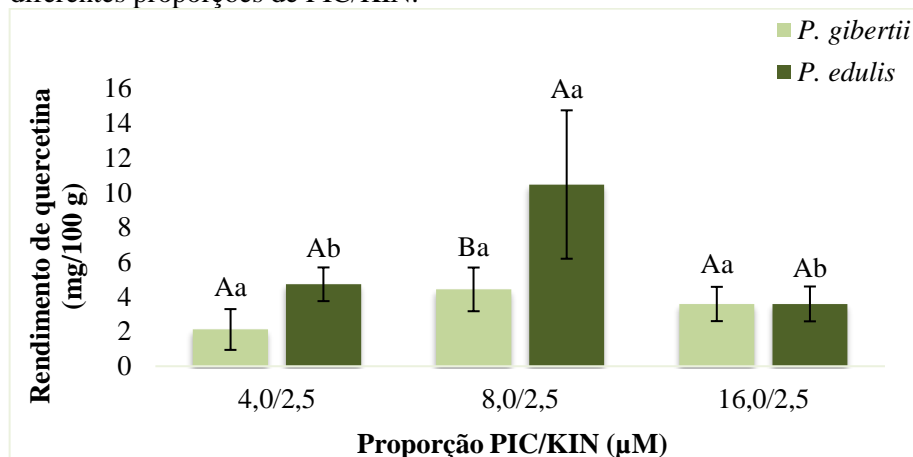
A comparação do rendimento médio de flavonoides nos extratos de calos obtido por cada espécie, proporção de PIC/KIN e dias de cultivo foi feita pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância, sendo significativa apenas aos quarenta e sessenta dias de cultivo (FIGURAS 10 e 11).

Figura 10 – Rendimento de quercetina aos 40 dias em calos de *P. gibertii* e *P. edulis*, submetidos a diferentes proporções de PIC/KIN.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as espécies e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma espécie, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

Figura 11 – Rendimento de quercetina aos 60 dias em calos de *P. gibertii* e *P. edulis*, submetidos a diferentes proporções de PIC/KIN.



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre as espécies e médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem dentro da mesma espécie, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Fonte: Da autora (2019).

O rendimento em *P. edulis* foi maior do que em *P. gibertii*, porém em apenas algumas das concentrações de auxina utilizadas, 4,0 e 8,0 µM aos quarenta dias e 8,0 µM aos sessenta dias. *P. edulis*, aos quarenta dias, é capaz de produzir maior quantidade de compostos fenólicos na concentração mais baixa de auxina (4,0 µM); aos sessenta dias, a concentração intermediária (8,0 µM) proporciona maior rendimento. Já *P. gibertii* não tem o rendimento de flavonoides alterado pelas diferentes concentrações de PIC.

Em *P. gibertii*, a produção de flavonoides não foi alterada ao longo do tempo, indicando estabilidade nesta espécie. Já em *P. edulis*, observou-se que o rendimento de

flavonoides decresce a partir dos oitenta dias. Desse modo, a partir dos oitenta dias, as espécies não apresentam diferença significativa no acúmulo de flavonoides.

P. gibertii apresentou maior rendimento de flavonoides do que *P. edulis*, não corroborando o que era esperado. Além disso, em comparação com outras espécies silvestres de *Passiflora*, como *P. cincinnata* (LEAL et al., 2018), *P. tenuifila* e *P. setacea* (FIGUEIREDO, 2018), os calos de *P. gibertii* se destacaram quanto ao rendimento de flavonoides, cerca de três vezes maior. Isto revela seu potencial em direcionar substratos para a biossíntese de flavonoides, ao invés de outros compostos fenólicos.

O fato dos calos de *P. edulis* terem apresentado as maiores concentrações de fenólicos totais aos quarenta dias de cultivo, mas os maiores valores de flavonoides aos quarenta e sessenta dias de cultivo, indicam diferenças no metabolismo de produção destes metabólitos em função do tempo de cultivo. Este mesmo comportamento foi visto para a produção fenólica e de flavonoides em calos de *P. tenuifila*, quando estes eram submetidos à 2,5 μM de 2,4-D no meio de cultura (FIGUEIREDO, 2018). O 2,4-D é uma auxina sintética com efeitos similares ao PIC, o que pode explicar esta semelhança (KAUR & KOTHARI, 2004).

Os calos podem ter apresentado declínio dos teores de fenólicos totais e flavonoides com o passar do tempo devido à demanda de açúcares pelo metabolismo primário, explicado anteriormente. Como o declínio do rendimento de fenólicos ocorreu a partir dos sessenta dias, mas o de flavonoides apenas aos oitenta dias, isto indica que a atividade enzimática da PAL (fenilalanina amônio liase), envolvida na síntese de fenólicos, e da chalcona sintase, envolvida na síntese de flavonoides, são influenciadas de modo diferente ao longo do tempo de cultivo dos calos de *P. edulis* (SOZO et al., 2016).

A concentração de 4,0 μM de PIC foi suficiente para os calos de *P. edulis* apresentarem maior rendimento de flavonoides aos quarenta dias, no entanto, não foi o bastante quando os calos cresceram, aos sessenta dias. Assim, aos sessenta dias, a concentração de 8,0 μM de PIC aumentou o rendimento, uma vez que disponibilizou maior quantidade de auxina no meio de cultura, necessária aos calos maiores (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Para *P. gibertii*, isso não é verificado. Esta espécie, assim como para a produção fenólica, não demonstrou sofrer influências na produção de flavonoides pela mudança nos níveis de PIC e tempos de cultivo. O fator espécie é, muitas vezes, o principal motivo das

diferenças encontradas no comportamento de produção de metabólitos, sendo que uma série de variáveis podem ser responsáveis por isto, como elucidado anteriormente (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Sugere-se, novamente, que estudos futuros sejam realizados para *P. gibertii*, de modo a conhecer sua regulação hormonal, tanto endógena quanto exógena, e suas consequências na produção de fenólicos totais.

6 CONCLUSÕES

Os tempos de cultivo influenciam o acúmulo de biomassa de modo diferente em cada concentração de PIC em *P. gibertii* e, em *P. edulis*, do mesmo modo. A menor concentração de PIC utilizada influenciou negativamente o acúmulo de massa fresca aos oitenta dias em *P. gibertii* e a partir de sessenta dias em *P. edulis*.

Os calos de *P. edulis* possuem rendimento de compostos fenólicos e de flavonoides influenciado pelas concentrações de PIC e tempos de cultivo. O rendimento em *P. gibertii* não é influenciado por estes fatores, indicando a estabilidade da síntese de metabólitos secundários nesta espécie.

Verificou-se o potencial de aplicação dos calos como estratégia de produção dos metabólitos secundários, pois isso permitiu o estudo dos fatores que influenciam o rendimento, além de ser uma alternativa sustentável e rápida de produção, dentro de um ambiente asséptico e controlado. Vale salientar que esta técnica permitirá a produção de metabólitos o ano todo, independentemente das condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. N. et al. Efeitos biológicos de extratos da *Passiflora alata*: Uma revisão da literatura. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT**, Aracaju, v. 5, n. 2, p. 33-66, mar. 2019.

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

ARTIOLI-COELHO, F. A. et al. Vitamin C and total phenols quantification in calli of native passion fruit induced by combinations of Picloram and Kinetin. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 45, n. 8, p. 1459-1465, ago. 2015.

BERNACCI, L.C. et al. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

BERNACCI, L.C. et al. Maracujá–doce: O autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 355-356, ago. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 2. ed. Brasília, 2010. 904 p.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v. 1, p. 87-132, 1998.

COELHO E. M., AZEVEDO L. C., UMSZA-GUEZ M. A. Fruto do maracujá: Importância econômica e industrial, produção subprodutos e prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 347-361, jul./set. 2016.

COLOMEU, T. C. et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 106-115, jan. 2014.

CÓRDOVA, K. R. V. et al. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 2, p. 221-230, jan./jun. 2005.

COSTA, A. M.; LIMA, H. C.; FALEIRO, F. G. Avanços e Perspectiva para Aproveitamento Integral de Frutos do Maracujazeiro. In: MORERA MP, MORERA M, COSTA A, FALEIRO F, CARLOSAMA A, CARRANZA C. **Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico**. Embrapa Cerrados - Livro técnico. Brasília: ProImpress, p. 73-83, 2018.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema, AL, v. 1, n. 2, p. 175-181, maio/ago. 2016.

DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. *Passiflora*: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, Panchkula, India, v. 94, n. 1, p. 1-23, set. 2004.

FALEIRO, F. G. et al. Avanços e Perspectivas do Melhoramento Genético de *Passifloras* no Brasil. In: MORERA MP, MORERA M, COSTA A, FALEIRO F, CARLOSAMA A, CARRANZA C. **Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico**. Embrapa Cerrados - Livro técnico. Brasília: ProImpress, p. 73-83, 2018.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2016. 341 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar./abr. 2014.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. *Passifloraceae*. In: Kubitzki, K. **The families and genera of vascular plants**, Berlin: Springer, v. 4, p. 270-281, 2007.

FIGUEIREDO, I. R. **Quantificação de metabólitos secundários e atividade antioxidante em extratos de sementes e de calos cultivados *in vitro* de *Passiflora tenuifila* Killip**

(**Passifloraceae**). 2018. 60 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

FIGUEIREDO, M. A., et al. Indução in vitro de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 288-290, jul. 2007.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, PR, v. 18, n. 4, p. 627-641, out./dez. 2008.

GADIOLI, I. L. et al. A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Brasília, v. 58, n. 5, p. 785-807, 2018.

GAOSHENG, H.; JINGMING, J. Production of the useful secondary metabolites through the regulation of biosynthetic pathway in the cell & tissue suspension culture of medicinal plants. In: GAOSHENG, H.; JINGMING, J. **Recent advances in plant in vitro culture**. Rijeka: IntechOpen, 2012.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer Science & Business Media, v. 1, 2008.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: Recent trends and a sky eye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Telangana, India, v. 126, n. 1, p. 1-18, jul. 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Ribeirão Preto, SP, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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**. 2013. 161 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

GOSMANN, G. et al. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, s. 1, p. 88-99, abr. 2011.

GURSKI, C. **Anatomia de frutos e sementes de espécies de Passiflora L. – subgêneros Decaloba (dc.) rchb. e Passiflora L. (Passifloraceae)**. 2015. 82 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

HAMAD, M. S.; MAJID, N. B. Influence of explant and growth regulators in the induction of callus of *Annona muricata* in vitro. **Euphrates Journal of Agriculture Science**, Baghdad, v. 10, n. 1, p. 178-184, 2018.

HARBORNE, J.B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1994. 384 p.

ISAH, T. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, New Delhi, India, v. 57, n. 2, p. 9-28, dez. 2015.

JARDIM L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 275-279, 2010.

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Rajasthan, India, n. 77, p. 73-79, 2004.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: Systematic review. **Nutrition Journal**, Los Angeles, v. 9, n. 1, p. 42, out. 2010.

LEAL, A. E. P. B. et al. Atividade ansiolítica e sedativa de espécies do gênero passiflora – um mapeamento científico e tecnológico. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 323-336, jul./set. 2016.

LEAL, A. E. P. B. et al. Determination of phenolic compounds, *in vitro* antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. **Natural product research**, Petrolina, p. 1-7, dez. 2018.

MADALENA, J. O.; COSTA, A. M.; LIMA, H. C. Avaliação de usos e conhecimentos de maracujás nativos como meio para definição de estratégias de pesquisa e transferência de tecnologia. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 30, n. 1/3, p. 55-72, jan./dez. 2013.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 83-91, out. 2011.

MESQUITA, L. S. S. de. **Estudo de revisão e prospecção biotecnológica das espécies *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims**. 2019. 68 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)–Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção**. Diário Oficial. Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014.

MIRANDA, C. E. P. **Compostos bioativos do maracujá cobra (*Passiflora trintae*)**. 2015. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Triângulo Mineiro - Campus Uberaba, Uberaba, 2015.

MONTERO, D. A. V. **Etnobotânica de Passiflora: uma aproximação na biogeografia, agroecologia e conservação dos maracujazeiros**. 2017. 185 p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura)–Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

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

MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Ch'ongju, Republic of Korea, v. 118, n. 1, p. 1-16, jul. 2014.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. **Pharmacognosy Reviews**, Pune, India, v. 1, n. 1, p. 69-79, maio 2007.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J. et al. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 57-66, 2016.

OCAMPO, J. P. et al. Diversity of Colombian Passifloraceae: Biogeography and an updated list for conservation. **Biota Colombiana**, Bogotá, Colombia, v. 8, n. 1, p. 1-45, jun. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. 2017. Disponível em:

<<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>>.

Acesso em: 25 mar. 2019.

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

PACHECO, G. et al. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, Rio de Janeiro, v. 144, p. 42-47, jun. 2012.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. Cultura de Tecidos. In: **Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas**. Lavras: UFUVFAEPE, 2001. 97 p.

PALACIO, L. et al. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). **Plant Science**, Córdoba, Argentina, v. 193, p. 1-7, set. 2012.

PATEL, S. S. et al. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. **International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology**, Madhya Pradesh, India, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2011.

PEREIRA, M. G. **Caracterização do óleo de sementes de maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) e de maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) obtido por diferentes métodos de extração**. 2017. 118 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: Uma nova esperança? **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 43, p. 41-89, jun. 2015.

RAMIREZ, V. et al. Biological activity of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* ethanolic leaves extract on human colonic adenocarcinoma cells. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Medellin, Colombia, v. 9, n. 2, p. 64-71, fev. 2019.

RIZZI, G. et al. Effects of *Valeriana officinalis* and *Passiflora* sp on the behavior of Wistar rats. **International Journal of Development Research**, Marília, SP, v. 7, n. 9, p. 15012-15015, set. 2017.

ROCHA, D. I.; MONTE-BELLO, C. C.; DORNELAS, M. C. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Campinas, v. 120, n. 3, p. 1087-1098, jan. 2015.

ROCHA, G. **Quantificação de metabólitos primários, secundários e atividade antioxidante em frutos e folhas de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae)**. 2017. 68 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

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.

SOARES, T. L. et al. **Influência da Sacarose na Germinação de Pólen In vitro de Passifloras Silvestres**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42489/1/4218.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2019.

SOUSA, J. D.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: Espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, v. 3, 1997. 179 p.

SOUZA, J. C.; SOUZA, C. L. de; NUNEZ, C. V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 269-280, 2018.

SOZO, J. S. et al. *In vitro* culture and phytochemical analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). *Methods in Molecular Biology*, v. 1391. In: S. Mohan Jain (ed.), **Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants**. 2. ed., 2016.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 888 p.

ULBRICHT, C. et al. An evidence-based systematic review of passion flower (*Passiflora incarnata* L.) by the natural standard research collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 5, n. 3, p. 310-340, 2008.

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

VASIC, S. M. et al. Biological activities of extracts from cultivated granadilla *Passiflora alata*. **EXCLI Journal**, v. 11, n. 5, p. 208-218, maio 2012.

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

WALZER, S. M.; WEINMANN, D.; TOEGEL, S. Medical plant extracts for treating knee osteoarthritis: A snapshot of recent clinical trials and their biological background. **Current Rheumatology Reports**, Vienna, Austria, v. 17, n. 8, p. 54, ago. 2015.

WATERHOUSE, A. L. et al. Polyphenolics: Determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley, v. 10, 2003.

WOLFART, M. R. **Calos de passifloras silvestres: indução, caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural**. 2015. 119 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

WOSCH, L. et al. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 40-49, 2017.

ZACARIAS, A. et al. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: 30ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química, Águas de Lindóia, São Paulo. **Anais...**Santa Maria, RS, 2007.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: Um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Carlos, SP, v. 20, n. 3, p. 459-471, jun./ jul. 2010.