

Daiane Fiuza Montagner

**PERFIS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CALOS
CULTIVADOS *IN VITRO*, FOLHAS, PERICARPOS E
SEMENTES DE *Passiflora tenuifila* Killip. E *Passiflora setacea* BRS
PÉROLA DO CERRADO (PASSIFLORACEAE).**

Tese submetido ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Viana

Florianópolis
2018

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

Fiuza Montagner, Daiane

Perfis de metabólitos secundários, atividade antioxidante e atividade biológica de calos cultivados in vitro, folhas, pericarpos e sementes de *Passiflora tenuifila* Killip. e *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado (Passifloraceae). / Daiane Fiuza Montagner ; orientador, Ana Maria Viana , 2018.

256 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

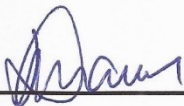
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Cultura in vitro. metabólitos secundários. Atividade antioxidante. Atividade biológica. I. , Ana Maria Viana. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Perfis de metabólitos secundários, atividade antioxidante e atividade biológica de calos cultivados *in vitro*, folhas, pericarpos e sementes de *Passiflora tenuiflora* Killip. e *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado (Passifloraceae)”

Por

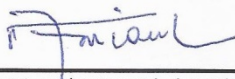
Daiane Fiuzza Montagner

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (026/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

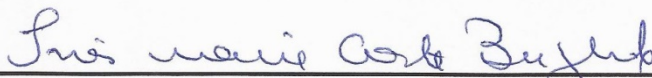
P/ 

Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



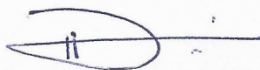
Dr.(a) Ana Maria Viana (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



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



Dr.(a) José Bonomi Barufi (Universidade Federal de Santa Catarina)



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

Florianópolis, 11 de outubro de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e para toda a minha família.

AGRADECIMENTOS

“ DEUS, quero te agradecer por você ter gostado de mim do jeito que sou. Por ter me aceitado com meus defeitos e por saber também elogiar minhas virtudes. Por me ensinar que a cada dia podemos recomeçar. Por me fazer sentir um alguém diferente e por eu saber que sempre contigo poderei contar.” Autor desconhecido

À minha família, por acreditar em mim, pelo incentivo e principalmente pelo amor e carinho, e por terem feito de mim o que sou hoje. Aos meus amados pais, Cleidir e Darcy, irmão Darci Junior e irmã Marta, aos meus primos (as) Fernando, Álvaro, Carlos, Carolaine e Elenice, às minhas tias Neli e Cleci, ao Raimundo Neto e à princesa da dinda, Anna Carolina. Aos que não foram citados acima, mas que tenho profundo carinho e respeito.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Viana, pela orientação, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e pelos ensinamentos ao longo destes anos de doutorado;

À Prof^a. Dr^a. Ines Maria Costa Brighente, do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN, QMC, UFSC), pela orientação, pelos conselhos, pela confiança.

À Dr^a. Ana Maria Costa, pesquisadora da Embrapa Cerrados e Coordenadora da Rede Passitec, pelo fornecimento de sementes, frutos e mudas das espécies estudadas e pelo apoio, em todas as fases desse estudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (CCA, UFSC), por estar sempre aberto a colaborações com nosso grupo de pesquisa e ao grupo de pesquisa do mesmo pela atenção dada a mim, especialmente à Dr^a. Fernanda Ramlov e a Dr^a. Eva Regina Oliveira, pela iniciação nas análises bioquímicas, pelo aprendizado e incentivo. Também a todas as gurias do laboratório pelos momentos de descontração e aprendizagem.

À Dr^a. Simone Mazzutti por ter realizado as extrações supercríticas do material deste trabalho, também pelos ensinamentos. À Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira do Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica – LATESC do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, por permitir que fizéssemos as extrações supercríticas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Carasek e a Franciele do Laboratório de cromatografia e espectrometria atômica (QMC, UFSC), pelas análises de compostos voláteis deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Steindel e a Dr^a. Milene do Laboratório de Protozoologia (MIP, UFSC), pela disponibilidade e parceria para realização dos testes de atividade biológica contra agentes etiológicos.

À Prof^a. Dr^a. Susana Johann da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, pela realização do ensaio de atividade antifúngica.

À Prof^a. Dr^a. Michelle Debiasi da FURB e às alunas Bruna Veiga e Camila Paganelli, pela realização do ensaio de atividade antibacteriana.

Aos Prof. Dr. Luciano Vitali e Gustavo Amadeu Micke aos Doutorandos (as) Ana Paula Ruani e Diogo Siebert do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) pelas análises e ajuda na interpretação dos dados LC-MS/MS, deste trabalho. Ao Prof. Dr. Faruk Jose Nome Aguilera (*in memoriam*) Laboratório Catálise e Fenômenos Interficiais (LACFI) do Departamento de Química da UFSC, pela disponibilização do equipamento para realização das análises.

À Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Rodrigues e à Prof^a. Dr^a Makeli Gariboti Lusa do Laboratório de Anatomia Vegetal (BOT, UFSC), pelo ensinamento da técnica de histoquímica dos calos.

Ao pesquisador Antonio Gomes Soares da Embrapa Agroindústria de Alimentos do Rio de Janeiro, por ajudar nas diversas dúvidas referentes aos compostos voláteis.

Agradeço aos meus companheiros do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Fábio, Letícia e Gustavo. Ao pessoal da Química, Marcos (Birante), Chico, Luiz Felipe, Leandro (Leko), Laís, Baiano e Maranhã, foi um prazer conviver com todos vocês.

Agradeço à Ana Paula Ruani, Dalila Venzke (mamis), Larissa Sens (mana), Eva Regina, Tiago Tizziani, Valdelucia Grinevicus, Isadora, Carolina, Igor, Débora e Daniela por ser minha família, pelo incentivo, companheirismo, aprendizado e pelas boas risadas.

À Joana e à Kamila, pela amizade que germinou na graduação e ainda permanece na lavoura da amizade, também à Daiana, Andressa e aos demais amigos pelo carinho e companheirismo.

E por fim, agradeço à Embrapa Cerrados, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC e ao CNPq e CAPES, por fomentarem essa pesquisa.

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

“Para termos uma noção do pouco que valemos, basta subtrair ao que somos o que aprendemos, o que lemos, o que vivemos com os outros. É só ver o que fica. Coisa pouca. Sozinho quase ninguém é quase nada. É somente juntos que podemos ser alguma coisa.”

Miguel Esteves Cardoso

Muito obrigada!

Daiane

“Eu me lembrei de que o mundo real era amplo e que uma infinidade de esperanças e temores, sensações e empolgações aguardavam os que tinham coragem de adentrar sua vastidão, buscar o verdadeiro conhecimento da vida, em meio aos seus perigos.”

Charlotte Brontë, Jane Eyre

RESUMO

Passiflora tenuifila Killip. e *Passiflora setacea* DC são espécies nativas predominantes nos biomas brasileiros Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga, selecionadas para o programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados, por apresentarem características importantes como produção de frutos de qualidade, genes de resistência a doenças (*Xanthomonas axonopodis* e *Cladosporium herbarum*) e propriedades toxicológicas, medicinais e bioquímicas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, terpenos e as atividades antioxidante e biológica de culturas *in vitro* de calos, em diferentes condições de cultivo e comparar com os extratos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*. Os calos de segmentos de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédone, nó foliar e epicótilo de *P. setacea* foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose; 2,5 μM de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. Os calos de sementes imaturas e de segmentos de caules de *P. tenuifila* foram cultivados, respectivamente, em 88,5 mM de sacarose; 2,5 μM de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel ou em 88,5 mM de sacarose ou frutose; 2,5 μM de ANA e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. A elicitação dos calos foi realizada com a adição de 500 μl de solução aquosa de 145 μM de ácido salicílico às culturas. Após os ciclos de cultivo os calos foram submetidos à extração e analisados pelos métodos colorimétricos de Folin Ciocalteu (fenólicos totais) e cloreto de alumínio (flavonoides). A identificação dos compostos fenólicos, carotenoides e terpenos presentes nos extratos foi realizada através de LC-ESI/MS/MS, CLAE e HS-SPME/GC/MS, respectivamente. A atividade antioxidante foi avaliada através da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH) e poder redutor (redução do íon férrico). A atividade antimicrobiana dos extratos de calos, pericarpos, sementes e folhas foi avaliada contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, atividade antifúngica contra cepas de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*; *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *Paracoccidioides brasiliensis*-Pb18 e atividade antiprotozoária, nas forma promastigota, da espécie de *Leishmania amazonenses* e na forma tripomastigota da espécie *Trypanosoma cruzi*. Os calos de sementes imaturas *P. tenuifila*, em sacarose apresentaram os maiores níveis de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, mas a produção de luteína foi maior nas culturas de calos de segmentos de caule. Os calos de segmentos caulinares, em frutose e elicitados exibiram os maiores teores de fenólicos totais e a

maior atividade antioxidante. Em sacarose, os calos elicitados de cotilédone de *P. setacea* apresentaram os maiores conteúdos de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante e os calos elicitados de nó cotiledonar, o maior conteúdo de luteína. Os extratos das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* apresentaram maiores teores de fenólicos e maior potencial antioxidante e os extratos de folhas os maiores níveis de flavonoides. Os extratos de pericarpo, sementes e folhas de ambas as espécies apresentaram 17 compostos fenólicos, sendo 12 ácidos fenólicos e 5 flavonoides. No extrato hidroalcoólico de calos elicitados de nó cotiledonar de *P. setacea*, em frutose foram detectados 9 compostos fenólicos, incluindo a vitexina, presente nos extratos de pericarpos e folhas de ambas as espécies e a isoorientina, presente apenas em extrato de folhas de *P. tenuifila*. A isoquercetina foi detectada nos extratos de calos de cotilédone de *P. setacea*, em sacarose, submetidos à extração por líquido pressurizado. Os ácidos salicílico (detectado pela primeira vez no gênero *Passiflora*), protocatecuico e p-cumárico ocorreram em todos os extratos vegetais. Foram detectados 5 monoterpenos e 1 sesquiterpeno, nas culturas de calos de *P. tenuifila*, e de 3 monoterpenos e 5 sesquiterpenos, nos calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*. Os extratos de sementes e de calos de epicótilo de *P. setacea* demonstraram atividade moderada antibacteriana e os extratos de sementes e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea* atividade antifúngica. Os extratos de calos elicitados de cotilédone e hipocótilo de *P. setacea*, cultivados por 45 dias apresentaram atividade leishmanicida moderada e os calos de nó foliar e raiz, cultivados por 45 dias, atividade tripanocida moderada. Esses resultados indicam o potencial promissor das sementes, folhas e calos de ambas as espécies, como fontes de compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica e de alimentos.

Palavras-chave: Cultura *in vitro*. Calos. Tipo de explante. Fontes de carbono. Ácido salicílico. Fenólicos. Flavonoides. Carotenoides. Terpenos. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Atividade antiprotozoário.

ABSTRACT

Passiflora tenuiflora Killip. e *Passiflora setacea* DC are native species from the Brazilian biomas Cerrado, Atlantic Forest and Caatinga and were selected by the Embrapa Cerrados genetic breeding program as both species produce high quality fruits, disease resistant genes (*Xanthomonas axonopodis* e *Cladosporium herbarum*) and important toxicological, medicinal and biochemical characteristics. The aims of the work reported here were to evaluate the production of total phenolics, flavonoids, lutein, terpenes and the antioxidant and biological activities of *in vitro* cultured calluses, grown in different culture conditions and to compare with pericarp, seed and leaf extracts of *P. tenuiflora* and *P. setacea*. Calluses obtained from root, hypocotyl, cotyledonary node, cotyledon, leaf node and epicotyl segments of *P. setacea* were cultured on Murashige & Skoog basal medium supplemented with 88.5 mM of either sucrose or fructose, 2.5 μ M 2,4-D and 2 g.L⁻¹ Phytagel. Calluses derived from immature seeds and from microplant stem segments of *P. tenuiflora* were cultured, respectively, on MS basal medium supplemented with 88.5 mM sucrose, 2.5 μ M 2,4-D and 2 g.L⁻¹ Phytagel and on 88.5 mM of either sucrose or fructose, 2.5 μ M ANA and 2 g.L⁻¹ Phytagel. Calluses elicitation was carried by adding 500 μ l of an aqueous solution of salicylic acid at 145 μ M to the calluses cultures. Once established calluses were extracted and analysed by Folin Ciocalteu (total phenolics) and aluminium chloride (flavonoids) colorimetric methods. The identification of phenolic compounds, carotenoids and terpenes in the extracts was carried out by the LC-ESI/MS/MS, CLAE e HS-SPME/GC/MS methods, respectively. The antioxidant activity was measured by the DPPH free radical scavenging capacity and by the reduction power (ferric ion reduction). The antimicrobial activity of the extracts were assessed against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and the antiprotozoal activity against the *Leishmania amazonenses* promastigote and the *Trypanosoma cruzi* tripomastigote forms. The seed-derived calluses of *P. tenuiflora* cultured on sucrose showed high levels of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity but lutein production was higher in stem-derived calluses cultured in sucrose. The highest total phenolics content and antioxidant activity occurred on elicited stem-derived calluses cultured on fructose. The *P. setacea* cotyledon-derived calluses cultured on sucrose and elicited showed the highest levels of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity and the elicited cotyledonary node-

derived calluses had the highest lutein content. Seed extracts of *P. tenuifila* e *P. setacea* showed the highest levels of total phenolics and antioxidant activity but the highest flavonoid content occurred in leaf extracts of both species. Seventeen phenolic compounds were detected in pericarp, seed and leaf extracts of both species comprising twelve phenolic acids and five flavonoids. The hydroalcoholic extract of the *P. setacea* elicited cotyledonary node-derived calluses cultured in fructose had nine phenolic compounds, including vitexin, present in the leaf extracts of both species and isoorientin, detected only in leaf extracts of *P. tenuifila*. Isoquercetin was detected only in *P. setacea* cotyledon-derived calluses grown on sucrose after the pressurized liquid extraction method. Salicylic acid (detected for the first time in *Passiflora* genus), protocatechuic and *p*-cumarinic acids occurred in all extracts. Five monoterpenes and one sesquiterpene were detected in the *P. tenuifila* calluses cultures and three monoterpenes and five sesquiterpenes in the *P. setacea* calluses derived from different explant type. The seed and epicotyl-derived callus extracts of *P. setacea* had moderate antibacterial activity and antifungal activity was detected in the seed and leaf extracts of *P. tenuifila* and *P. setacea*. The elicited *P. setacea* cotyledon-derived and hypocotyl-derived calluses, cultured for 45 days showed the highest leishmanicidal activity and the leaf node-derived and root-derived calluses cultured for 45 days had the highest tripanocidal activity. These results indicate the promising potential of seeds, leaves and calluses of both species as sources of bioactive compounds of interest for the pharmaceutical and food industries.

Key words: Callus. Explant type. Carbon source. Salicylic acid. Total phenolics. Flavonoids. Lutein. Terpenes. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Antiprotozoal activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido diclorofenoxiacético
°C – Graus Celsius
AA – Ácido ascórbico
AG – Ácido gálico
AIB – Ácido indolbutírico
AlCl₃ – Cloreto de alumínio
ANA – Ácido α -naftalenoacético
AgNO₃ – Nitrato de prata
BHA – Butilhidroxianisol
BHT – Butilhidroxitolueno
CE₅₀ – Concentração efetiva 50%
cm – Centímetro
Cot – Cotilédone
CuSO₄ – Sulfato de cobre
DPPH – 2,2 difenil-1, picrilhidrazil
Eq – Equivalentes em
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FeCl₃ – Cloreto férrico
Fru – Frutose
g – Grama
g.L – Gramas por litro
H – Hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
Hipoc – Hipocótilo
L – Litro
LC-ESI/MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray (do inglês “liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization”)
 μ g – Micrograma
 μ L – Microlitro
 μ M – Micromolar
MeOH – metanol
M – Molar
MF – Massa Fresca
mM – Milimolar
mm – Milímetro
MS – Massa Seca

m/v – Massa por volume
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
Nc – Nó cotiledonar
Nf – Nó foliar
nm – Nanômetro
PAL – Fenilalanina amônia-liase
PEP – Ácido fosfoenolpiruvato
pH – Potencial hidrogeniônico
Phe – Fenilalanina
Q – Quercetina
Sac – Sacarose
SI – Semente imatura
Trp – Triptofano
Tyr – Tirosina
UV – Ultravioleta
UV-A – Ultravioleta A (400-320 nm)
UV-B – Ultravioleta B (320-280 nm)
UV-C – Ultravioleta C (280-100 nm)
R² – Coeficiente de determinação
r – Coeficiente de correlação linear
ELP – Extração por líquido pressurizado
ESC – Extração por fluido supercrítico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo geral.....	21
1.1.2 Objetivos específicos.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Gênero <i>Passiflora</i> Linnaeu: aspectos botânicos e importância econômica.....	23
2.1.1 <i>Passiflora setacea</i> Decaloba.....	25
2.1.2 <i>Passiflora tenuifila</i> Killip.	26
2.2 Estudos fitoquímicos com espécies do gênero <i>Passifloras</i>	27
2.3 Importância farmacológica e medicinal das <i>Passifloras</i>	31
2.4 Abordagens biotecnológicas utilizadas na produção de metabólitos secundários de plantas.	35
2.4.1 Incremento da produção de metabólitos secundários in vitro de plantas através do uso de elicitores.	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Material vegetal.....	46
3.2 Métodos.....	47
3.2.1 Frutos e folhas de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	47
3.2.2 Condições de cultivo das culturas in vitro das espécies de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	47
3.2.3 Estabelecimento e manutenção das culturas in vitro de calos	48
3.2.4 <i>Passiflora tenuifila</i>	48
3.2.4.1 Calos oriundos de semente imatura	49
3.2.4.2 Calos oriundos de segmento caulinar	49
3.2.5 <i>Passiflora setacea</i>	50
3.2.6 Tratamento dos calos com ácido salicílico	52
3.2.7 Determinação da biomassa fresca e biomassa seca dos calos produzidos in vitro.....	53
3.3 Preparo das amostras e das análises químicas qualitativas e quantitativas de metabólitos primários e secundários.	53
3.4 Preparo das amostras e análises químicas qualitativas e quantitativas realizadas para os experimentos sobre o efeito de fontes de carbono e elicitação com ácido salicílico (tempo de exposição, concentrações)...	54
3.4.1 Fenólicos totais.....	55

3.4.2	Flavonoides	56
3.4.3	Açúcares solúveis totais	56
3.4.4	Quantificação de luteína.....	57
3.4.5	Determinação da atividade antioxidante pela captura dos radicais livres utilizando o DPPH.....	58
3.5	Preparo das amostras e análises químicas qualitativas e quantitativas realizadas nos experimentos sobre o estudo comparativo de sementes, pericarpo, folhas e calos quanto aos níveis de metabólitos secundários, atividade antioxidante, atividades biológicas e identificação dos tipos de moléculas.	58
3.5.1	Fenólicos totais	67
3.5.2	Flavonoides	67
3.5.3	Determinação da atividade antioxidante	68
3.5.3.1	Captura dos radicais livres utilizando o método DPPH	68
3.6	Extração com Fluido Supercrítico (ESC) e Extração com Líquido Pressurizado (PLE).	69
3.7	Extração e análise dos compostos voláteis das culturas de calos <i>in vitro</i>	63
3.8	Extração e análise dos compostos do extrato hidroalcoólico por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS).....	64
3.9	Determinação da atividade antimicrobiana e antiprotozoária.	65
3.9.1	Atividade Antibacteriana	65
3.9.2	Atividade Antifúngica.....	66
3.9.3	Determinação da atividade antiprotozoária.....	68
3.9.3.1	<i>Leishmania amazonensis</i>	68
3.9.3.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	69
3.10	Análise estatística.....	70
4	RESULTADOS	70
4.1	Aspectos dos calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> utilizados nas análises fitoquímicas e de atividade antioxidante e biológica	70
4.2	Efeito do tempo de cultivo, tipo de explante, fonte de carbono e ácido salicílico nos níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante e açúcares solúveis totais em calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	75
4.2.1	<i>P. tenuifila</i>	75
4.2.2	Efeito do tipo de explante e do ácido salicílico em calos originados de sementes imaturas e de segmentos caulinares.	75

4.2.3	Efeito de sacarose, frutose e do tempo de cultivo em calos originados de segmentos caulinares.	78
4.2.3.1	Efeito do tempo de exposição ao ácido salicílico em calos originados de segmentos caulinares cultivados em frutose ou sacarose.	89
4.2.3.2	Correlação entre os níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína e atividade antioxidante dos calos originados de segmentos caulinares.	85
4.2.4	<i>P. setacea</i>	86
4.2.5	Efeito da elicitação com ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes cultivados em sacarose.	86
4.2.5.1	Efeito de concentrações de ácido salicílico em calos oriundos de segmentos cotiledonares.	90
4.2.5.2	Efeito de concentrações de ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes.	92
4.2.5.3	Efeito de sacarose, frutose e do tempo de cultivo em calos originados de diferentes tipos de explantes.	94
4.2.6	Efeito de sacarose, frutose e ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes.	96
4.2.7	Correlação entre os níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína e atividade antioxidante dos calos originados de diferentes tipos de explantes.	99
4.3	Avaliação dos conteúdos de metabólitos secundários das folhas, pericarpos, sementes e culturas de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> . .	109
4.3.1	Avaliação dos metabólitos de sementes, pericarpos e folhas <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	109
4.3.2	Avaliação do conteúdo de metabólitos secundários das culturas de calos de <i>P. tenuifila</i>	112
4.3.2.1	Efeito do tempo de cultivo sobre as culturas de calos oriundos de sementes imaturas de <i>P. tenuifila</i>	113
4.3.2.2	Efeito da idade das culturas de calos oriundos de sementes imaturas de <i>P. tenuifila</i> , no momento da elicitação com ácido salicílico.	11408
4.3.2.3	Efeito das fontes de carbono sobre as culturas de calos originadas de segmento caulinar de <i>P. tenuifila</i>	117
4.3.2.4	Comparação entre a cultura de calos de sementes imaturas com cultura de calos de caules de <i>P. tenuifila</i> na presença e ausência do elicitor.	119
4.3.3	Avaliação do conteúdo de metabólitos secundários das culturas de calos <i>P. setacea</i>	122

4.3.3.1 Efeito do ácido salicílico sobre as culturas de calos de diferentes tipos de explantes de <i>P. setacea</i>	122
4.3.3.2 Efeito das fontes de carbono e elicitação sobre as culturas de calos de diferentes tipos de explantes de <i>P. setacea</i>	124
4.3.3.3 Efeito da idade das culturas no momento da elicitação em culturas de calos de diferentes tipos de explantes de <i>P. setacea</i>	127
4.3.4 Comparação da quantificação dos metabolitos secundários e atividade antioxidante das sementes, folhas e pericarpos e das culturas de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	129
4.3.4.1 <i>P. tenuifila</i>	129
4.3.4.2 <i>P. setacea</i>	133
4.4 Comparação entre os métodos de extração hidroalcoólica, extração com fluidos supercríticos (ESC) e extração com líquido pressurizado (ELP) de sementes de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i> e de calos de cotilédone de <i>P. setacea</i>	137
4.5 Perfis de compostos fenólicos, detectados por LC-ESI-MS/MS, em extratos de pericarpos, sementes, folhas de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> e em calos de <i>P. setacea</i>	141
4.6 Perfis de terpenos detectados por HS-SPME/CG-MS de diferentes tipos de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i>	150
4.6.1 Análise da diversidade de terpenos produzidos pelos calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i>	150
4.6.2 Análise da quantidade de terpenos produzidos pelos calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i>	156
4.7 Avaliação da atividade biológica dos extratos das folhas, pericarpos, sementes e de calos de <i>P. setacea</i> e <i>P. tenuifila</i>	172
4.7.1 Atividade antibacteriana.....	172
4.7.2 Atividade antifúngica.....	173
4.7.3 Atividade antiprotozoário.....	174
4.7.3.1 Atividade leishmanicida.....	174
4.7.3.2 Atividade tripanocida.....	178
5 DISCUSSÃO.....	181
5.1 Perfis quantitativos de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, açúcares solúveis totais e atividade antioxidante de extratos de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> , em diferentes condições de cultivo <i>in vitro</i> ..	181
5.1.1 Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.....	181
5.1.2 Carotenoides.....	186
5.1.3 Açúcares solúveis totais.....	188

5.2 Perfis qualitativos de compostos fenólicos de extratos de pericarpos, sementes e folhas de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> e de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>P. setacea</i>	192
5.3 Perfis de terpenos de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> , em diferentes condições de cultivo <i>in vitro</i>	196
5.4 Atividades biológicas dos extratos de pericarpos, sementes, folhas e calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> , em diferentes condições de cultivo <i>in vitro</i>	199
5.5 Tempo de cultivo de calos de <i>P. tenuifila</i> e <i>P. setacea</i> e metabólitos secundários, atividade antioxidante e biológica.	200
6 CONCLUSÃO.....	200
REFERÊNCIAS	206
ANEXO.....	247

1 INTRODUÇÃO

No momento atual, tem sido crescente a procura por novos produtos alimentares que apresentem características nutricionais com propriedades funcionais, proporcionando uma fonte adicional de compostos para terapias complementares e alternativas. A família Passifloraceae apresenta diversos benefícios à saúde, importantes do ponto de vista químico, biológico e farmacológico. O gênero *Passiflora* é um dos maiores desta família com cerca de 530 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004), no qual estão inseridas as espécies utilizadas na realização deste trabalho. Tais espécies podem ser consideradas como relevantes devido às suas propriedades nutracêuticas.

Os fitoconstituintes das espécies do gênero *Passiflora* são descritos como flavonoides, alcaloides β -carbolínicos, triterpenos de esqueleto cicloartano, glicosídeos esteroidais, glicosídeos cianogênicos, saponinas triterpenoídicas, cumarinas e derivados, ácidos graxos (linoleico e linolênico), maltol e etilmaltol, fitosteróis (estigmasterol) e óleos voláteis (DHAWAN *et al.*, 2004; PEREIRA; VILEGAS, 2000), sendo os principais flavonoides chaftosídeo, iso chaftosídeo, isovitexina, orientina e vitexina (FARAG *et al.*, 2016).

Existem diversos relatos na literatura sobre o potencial terapêutico e os compostos já descritos para as espécies do gênero *Passiflora* (DHAWAN *et al.*, 2004). Porém, poucas são as pesquisas referentes às espécies de *Passiflora* silvestres, tal como *Passiflora setacea* e *P. tenuiflora*, as quais são encontrados nos biomas Cerrado e Mata Atlântica. Essas espécies, por meio dos estudos conduzidos pela Embrapa Cerrados, têm se destacado pela produtividade, qualidade físico-química dos frutos, maior nível de resistência à bacteriose e virose e, em especial, no uso funcional e medicinal (EMBRAPA CERRADOS, 2015).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais têm sido alternativas de conservação de germoplasma para a multiplicação e de produção em larga escala de compostos bioativos de interesse para indústria farmacêutica e alimentícia. Tratam-se de técnicas que permitem a produção de biomassa de plantas, em condições controladas, livres da vulnerabilidade aos vários fatores ambientais. As espécies de *Coptis japonica*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Coffea arabica*, *Artemisia annua* e *Coleus forskohlii*, são alguns exemplos de fontes promissoras de produção de metabólitos secundários por culturas celulares para fins industriais (SHARMA *et al.*, 1991; JAIN *et al.*, 1996; PLETSCHE 1998).

Estudos recentes de otimização da produção de metabólitos secundários, em especial de compostos fenólicos e flavonoides, por culturas *in vitro*, têm sido relatados para várias espécies de plantas, utilizando-se os elicitores para promover o incremento de compostos com potencial biológico e antioxidante (ALI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016). Entretanto, poucos foram os estudos conduzidos para avaliar o potencial de produção de metabólitos secundários por sistemas de cultura *in vitro* de células de espécies de maracujá. Neste contexto, as culturas *in vitro* têm sido estudadas apenas para avaliar a produção dos flavonoides C-glicosídeos, compostos aromáticos, alcaloides, compostos fenólicos e atividade antioxidante (ANTOGNONI *et al.*, 2007; FRACCAROLI *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010; LUGATO *et al.*, 2014). Também não há na literatura referências sobre o potencial das culturas *in vitro* dessas espécies para a produção de outros tipos de moléculas como luteína, terpenos e sobre a avaliação de atividades biológicas, assim como são raros os estudos utilizando-se elicitores. Tais estudos poderiam contribuir para a otimização desses sistemas e para viabilizar os processos de produção, em condições controladas, contribuindo para a conservação de germoplasma e para amenizar a possível pressão extrativista sobre essas espécies.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de metabólitos secundários bem como avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoária de extratos de culturas *in vitro* de calos, em diferentes condições de cultivo, e comparar com os estudos em extratos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuiflora* e *P. setacea*.

1.1.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar o efeito do tempo de cultivo, dos tipos de explantes, da fonte de carbono e tempo de exposição ao ácido salicílico nos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides das culturas de calos de *P. tenuiflora* e *P. setacea*;

- ❖ Avaliar o efeito do tempo de cultivo, dos tipos de explantes, da fonte de carbono e tempo de exposição ao ácido salicílico na atividade antioxidante, avaliado pelo ensaio de captura de radicais livres pelo DPPH e pelo ensaio do poder redutor, das culturas de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*;
- ❖ Quantificar os compostos fenólicos e flavonoides e avaliar o potencial antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de folhas, pericarpos e sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila*, para comparar com os teores produzidos pelas culturas de calos.
- ❖ Avaliar a eficiência da metodologia da extração supercrítica e extração por líquido pressurizado nos níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* e de calos de cotilédone de *P. setacea*.
- ❖ Identificar e quantificar os carotenoides produzidos pelas culturas de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ❖ Identificar os compostos fenólicos presentes em extratos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* e em calos cultivados *in vitro* de *P. setacea*, através de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS-MS);
- ❖ Identificar os terpenóides produzidos por culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, em função do tempo de cultivo, através de Microextração por Fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS);
- ❖ Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, leishmanicida e tripanocida dos extratos brutos de calos, folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *PASSIFLORA* LINNAEU: ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A família Passifloraceae é composta por, aproximadamente, 700 espécies organizadas em 18 gêneros (FEUILLET, 2004), predominantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (SOUZA; MELETTI, 1997). O maior representante da família é o gênero *Passiflora* L. com cerca de 530 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004), e com, aproximadamente, 400 híbridos produzidos artificialmente (ABREU *et al.*, 2009; PEIXOTO, 2005). As espécies deste gênero tem ampla distribuição na América Central e do Sul, e menor ocorrência nos países como Índia, China, sudoeste da Ásia, Austrália e algumas regiões do Pacífico (BERNACCI *et al.*, 2005). A maior diversidade de espécies do gênero *Passiflora* está localizada no Brasil e na Colômbia, com 150 e 170 espécies, respectivamente (FAJARDO *et al.*, 1998; OCAMPO *et al.*, 2010).

As espécies do gênero *Passiflora* pertencem à classe Magnoliopsida, ordem Violales e filo Magnoliophyta. As características botânicas das *Passifloras* são variadas, podendo ser encontradas na forma de planta herbácea, lenhosa ou trepadeira de hábito perene. Os frutos são bagas com distintas formas – globosas, ovoides e elipsoides e tamanhos variados (CERVI, 1997). As folhas são simples, lobadas ou digitadas, com bordas lisas ou serradas, alternadas e glandulosas (CASTRO; KLUGE, 1998). As flores são de notável beleza, em virtude da heterogenidade de cores que o cálice e a corola apresentam, bem como pela intensa fragrância produzida (CASTRO; KLUGE, 1998). Algumas espécies de *Passifloras* são ricas em notas cítricas e frutais, devido a presença de composto linalol em *P. alata* e geraniol em *P. quadrangularis*, assim como notas balsâmicas e florais, como 1,4-dimetoxi-benzeno em *P. edulis* e benzaldeído em *P. cincinnata* (MONTERO *et al.*, 2016).

No Brasil, as espécies do gênero *Passiflora* são popularmente conhecidas como “maracujá” (MELETTI, 1995; SOUZA; MELETTI, 1997). Cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis (BERNACCI *et al.*, 2005; OCAMPO *et al.*, 2010), enquanto que as demais são cultivadas para fins ornamentais (ABREU *et al.*, 2009). O país é conhecido, mundialmente, como o maior produtor de maracujá, sendo detentor da maior coleção de germoplasma, a qual está localizada na

Embrapa Cerrados, Planaltina/DF, possuindo mais de 200 acessos entre espécies e variedades. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2012, a produção chegou ao patamar de aproximadamente, 776 mil toneladas do fruto, em uma área plantada de cerca de 59 mil hectares. O cultivo do maracujá ocorre em quase todas as regiões do Brasil, mas é na região nordeste que se concentra a maior produção do fruto: Bahia (65,3%), Ceará (24,7%), Sergipe (5,3%) e Pernambuco (2%).

Apesar de o país ser considerado o maior produtor de maracujá, apenas três espécies são comercializadas e cultivadas: *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg (maracujá amarelo), *Passiflora alata* curtis (maracujá doce) e *Passiflora incarnata* (flor-da-paixão) (DHAWAN *et al.*, 2004). Estudos realizados definem as espécies do gênero *Passiflora* como alimento funcional (ZERAİK *et al.*, 2010), e isso se deve à riqueza de compostos naturais presentes em folhas, flores, frutos e sementes (DHAWAN *et al.*, 2004).

Dados disponibilizados pelo World Intellectual Property Organization - WIPO (2016) mostram o crescente interesse em explorar os compostos naturais presentes em espécies de maracujás. Este fato é confirmado devido ao número de patentes já registradas nas áreas de alimentos, suplementos alimentares, farmacêuticos e cosméticos, que tem por base a utilização do maracujá (EPO, 2018; INPI, 2018). Sendo assim, considerando-se a importância de se conhecer e conservar as espécies de maracujás, em especial as espécies silvestres, a Rede Passitec Etapa II - CNPq 404847/2012-9: Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das Passifloras silvestres, coordenado pela Dr^a. Ana Maria Costa da Embrapa Cerrados, Brasília-DF vem desenvolvendo pesquisas na área de melhoramento genético e em relação à validação de propriedades biológicas, para que esses produtos possam ser consumidos pela população. As espécies selecionadas foram: *P. setacea* (maracujá-do-sono), *P. tenuifila* (maracujá alho), *P. nitida* (maracujá suspiro), *P. alata* (maracujina) e *P. edulis* (maracujá-amarelo), sendo as duas primeiras espécies o foco do presente trabalho.

Devido à exploração da biodiversidade e à crescente expansão agrícola nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, inúmeras espécies de plantas e animais encontram-se vulneráveis à extinção. Segundo o Centro Nacional de Conservação da Flora – CNCFLORA, as Passifloras silvestres estão classificadas na categoria “em perigo” ou “criticamente em perigo”. Outra peculiaridade dos maracujás silvestres é referente à dificuldade de produção destas espécies, decorrente da dormência das sementes e da dificuldade de enraizamento de estacas. Contudo, têm

sido empregados recursos biotecnológicos, a fim de viabilizar a produção comercial de espécies de maracujá, sendo uma das alternativas a cultura de tecido vegetal *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2010). Essa técnica permite desenvolver sistemas de micropropagação, conservação e produção de metabólitos secundários de interesse (GHORPADE *et al.*, 2011), visto que as espécies de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* são excelentes fontes de genes de resistência a doenças e possuem potencial de uso dos frutos como alimento funcional.

2.1.1 *Passiflora setacea* DECALOBA

Passiflora setacea é uma espécie nativa do Brasil, predominante nos biomas Cerrado e Caatinga (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005). Distribui-se geograficamente pela região nordeste (Alagoas e Bahia), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) (MILWARD-DE-AZEVEDO, 2007). Foi descrita em 1828 por Decaloba (DC.), é conhecida, popularmente, como maracujá sururuca e/ou maracujá-do-sono. O seu nome “*setacea*” origina-se do latim, cujo significado remete-se à "forma de seta" de suas folhas (**Figura 1**). Essa espécie tem hábito escandente, produz frutos globosos e de formatos ovoides com textura aveludada e sabor acidulado, as sementes são obovadas e foveoladas e sua floração é de coloração branca (CERVI, 1997). A espécie possui um número de cromossomos equivalente a $n=9$ ou $2n=18$ (SOUZA *et al.*, 2008).

Pesquisas relatam que *P. setacea* é resistente à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae* (FUHRMANN *et al.*, 2014). Além disso, é resistente à lagarta *Dione junio junio* (BOIÇA Jr *et al.*, 1999). Acessos da espécie têm sido apontados por Junqueira *et al.* (2005) como resistentes a algumas doenças e pragas, como viroses ocorrentes na parte aérea da planta e antracnoses em frutos e folhas. Devido ao potencial agregado à espécie, em relação a fatores de resistência, a Embrapa Cerrados desenvolveu o primeiro cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado (registro RNC Nº 21714), por meio de policruzamentos entre espécies de *P. setacea* selecionadas durante vinte anos, visando aumentar a produtividade, qualidade físico-química e funcional do fruto (EMBRAPA CERRADOS, 2015). De acordo com Guimarães *et al.* (2013) a produção anual da variedade *P. setacea* BRS-PC chega a 25 toneladas por hectare por ano.



Figura 1. Característica botânica da folha e fruto de *Passiflora setacea*.
Fonte: Ana Maria Costa/ Embrapa Cerrados, Brasília-DF

2.1.2 *Passiflora tenuifila* KILLIP.

A espécie *P. tenuifila* é conhecida como maracujá-alho, devido ao característico aroma do fruto (DEGINANI; ESCOBAR, 2002). É uma espécie nativa do Brasil, podendo ser encontrada nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e no Distrito Federal. Ademais, pode ser encontrada em países como Argentina, Bolívia e Paraguai (DEGINANI; ESCOBAR, 2002; BRAGA *et al.*, 2005; CERVI, 1997). Os frutos são subglobosos de coloração verde quando imaturos e amarelos na maturidade (**Figura 2**), as sementes são obovates e alveoladas. São plantas de hábito escandente com folhas trilobadas e, apresentam ainda, gavinhas axilares (CERVI, 1997). Essa espécie possui um número equivalente de cromossomos igual a $n=9$ (DEGINANI; ESCOBAR, 2002). Além disso, segundo Braga *et al.* (2005), a espécie é resistente a *Xantomonas axonopodis* PV. *Passiflorae* (bacteriose) e *Cladosporium herbarum* Verrugose).



Figura 2. Característica botânica da folha e fruto de *Passiflora tenuiflora*.
Fonte: Ana Maria Costa/ Embrapa Cerrados, Brasília-DF

2.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS COM ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORAS*

As espécies de *Passifloras* têm sido estudadas devido às suas propriedades farmacológicas (DHAWAN *et al.*, 2001a; DHAWAN *et al.*, 2001b; DHAWAN *et al.*, 2001c; DHAWAN; SHARMA, 2002; DHAWAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2011), em virtude de produzirem compostos naturais, em sua grande maioria, pertencentes ao grupo dos flavonoides glicosilados, tais como: isovitexina [1], vitexina [2], orientina [3], isoorientina [4], schaftosídeo [5], isoschaftosídeo [6], rutina [7], hiperosídeo [8] e hesperidina [9] (Tabela 1). Estudo realizado com extrato de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, evidenciou a presença de vitexina [2], orientina [3] e rutina [7] (MOARES *et al.*, 1997). Já Pereira *et al.* (2004) identificaram no extrato metanólico das folhas de *P. alata*, *P. edulis*, *P. caerulea* e *P. incarnata* os flavonoides C-glicosilados [1] a [4] em todas as espécies estudadas, porém o constituinte flavonoide 2"-O-ramnosil-vitexina [10] foi identificado somente em *P. alata* (Tabela 1).

Pesquisa conduzida por Gomes (2013) indicou a presença de flavonoides C-glicosilados em *P. setacea* e *P. tenuiflora*. Os flavonoides isovitexina [1], vitexina [2] e orientina [3] são os compostos majoritários

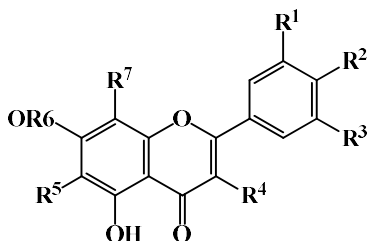
nos extratos de folhas de *P. setacea*. Na espécie *P. tenuifila*, isovitexina [1], orientina [3] e isorientina [4] foram identificadas em concentrações menores. Vieira (2013), a partir de extratos de frutos e folhas de quatro espécies de Passifloras, incluindo *P. setacea* e *P. tenuifila*, demonstrou que os extratos das folhas de ambas as espécies apresentaram maior teor de flavonoides quando em comparação aos extratos dos frutos e das sementes, sendo os compostos majoritários, respectivamente, isorientina [4] e isovitexina [1], enquanto que os de menor teor foram vitexina [2] e orientina [3].

Os extratos de folhas de *P. incarnata* apresentaram os flavonoides isovitexina [1], vitexina [2], orientina [3], isorientina [4], isoschaftosídeo [5], chaftosídeo [6], 2"-*O*- β -glicopiranosilisorientina [10], 2"-*O*- β -glicopiranosil-isovitexina [11], swertisina [12], e vicenina-2 [13] (RAFFAELLI *et al.*, 1997). Já Masteikova *et al.* (2008) identificaram nos extratos hidroetanólico e aquoso de *P. incarnata*, a presença de vitexina [2], hiperosídeo [8] e vicenina [13]. Em estudo com extrato hidrometanólico das folhas de *P. edulis*, foram obtidas novas flavonas glicosiladas, mostrando a presença de 15 flavonoides derivados da apigenina e luteolina (FERRERES *et al.*, 2007). Os flavonoides quercetina 3-*O*-glicosídeo [14], canferol 3-*O*-glicosídeo [15] e luteolina 8-*C*-digitoxosídeo [16], foram identificados no extrato aquoso de cascas de *P. edulis* f. *edulis* (ZIBADI *et al.*, 2007), vitexina [2] na espécie de *P. foetida* (KITE *et al.*, 2006) e isovitexina [1], isorientina [4] em extrato da polpa dos frutos de *P. edulis* f. *flavicarpa* (ZERAİK *et al.*, 2010). As estruturas destes compostos podem ser observadas na **Tabela 1**.

Sakalem *et al.* (2012) estudaram a composição química dos extratos hidroetanólicos de cinco espécies do gênero *Passiflora*, mostrando que o principal constituinte das espécies de *P. vitifolia*, *P. coccinea*, *P. bahiensis*, *P. quadrangulares* e *P. sidifolia*, são as flavonas C-glicosídeos. Zucolotto *et al.* (2012) também encontraram esses mesmos constituintes em extratos das folhas e pericarpo das espécies de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *edulis*, *Passiflora alata*, *Passiflora tripartita* var. *mollissima*, *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora manicata* e *Passiflora ligularis*. Isovitexina [1], vicenina-2 [13] e 6,8-di-*C*-glicosil crisina [17] foram identificados como componentes majoritários dos extratos aquosos de folhas de *P. edulis* fo. *flavicarpa*. Já para os extratos aquosos de folhas de *P. edulis* fo. *edulis*, detectou-se vitexina-2"-*O*-ramnosídeo [18] e luteolina-7-*O*-glucosídeo [19] (AYRES *et al.*, 2015), **Tabela 3**. Os compostos rutina [7], hiperina [20], ácido clorogênico [24] e ácido cafeico [25] foram identificados no extrato acetônico das folhas de *P. leschenaultii* usando HPLC-DAD-

MS (SHANMUGAM *et al.*, 2016). Recentemente, Araujo *et al.* (2017) isolaram os compostos isoorientina [4] e o triterpeno β -amirina [26], a partir do extrato das folhas de *P. mucronata*.

Os ácidos fenólicos, ácido cafeico [25], siríngico [27], *p*-cumárico [28], sináptico [29] e ferúlico [30], (**Figura 3**), foram reconhecidos como constituintes da polpa de *Passiflora setacea* (SOARES, 2011). Medina *et al.* (2017) verificaram por meio de cromatografia líquida de ultra alta eficiência com Detector de Arranjo de Diodos - UPLC-DAD a presença de luteolina-8-*C*-(2''-*O*-ramnosil) glicosídeo [21] e ácido quercetina-3-*O*-(6''-acetil) glucosil-2-sináptico [22] no extrato da casca de *P. edulis* Sims f. *edulis* (gulupa) não descrito anteriormente para a espécie. Também foram identificados, no extrato e nas frações dos frutos de *P. tarminiana*, as classes de compostos procianidinas e flavonoides glicosilados (BRAVO *et al.*, 2017). Shanmugam *et al.* (2018) detectaram 15 compostos polifenólicos no extrato metanólico da polpa da fruta de *P. subpeltata* incluindo quercetina-3-glicosídeo [23], ácido *p*-coumárico [28], ácido ferúlico [30], ácido cinâmico [31], ácido protocatecuico [32], ácido vanílico [33], epicatequina [34] e eriodictiol [35]. Farag *et al.* (2016) avaliaram o perfilamento metabólico das folhas de 17 espécies do gênero *Passiflora*, no qual detectaram 97 metabólitos e identificaram um total de 74 metabólitos, sendo 20 *C*-flavonoides, 8 *O*-flavonoides, 21 *C/O*-flavonoides, dois glicosídeos cianogénicos e 23 ácidos graxos conjugados. Alguns flavonoides conjugados são relatados pela primeira vez em *Passifloras*. A abordagem metabolômica comparativa das 17 espécies estudadas aponta que os *C*-flavonoides são os marcadores quimiotaxonômicos do gênero.

Tabela 1. Estrutura dos flavonoides glicosilados presente nas espécies do gênero *Passiflora*.

Flavonoides	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
1	H	OH	H	H	glu	H	H
2	H	OH	H	H	H	H	glu
3	H	OH	OH	H	H	H	glu
4	H	OH	OH	H	glu	H	H
5	H	OH	H	H	ara	H	glu
6	H	OH	H	H	glu	H	ara
7	OH	OH	H	<i>O</i> -rut	H	H	H
8	OH	OH	H	<i>O</i> -gal	H	H	H
9	OH	OCH ₃	H	H	H	-rut	H
10	H	OH	OH	H	(2''-O-glu)glu	H	H
11	H	OH	H	H	(2''-O-glu)glu	H	H
12	H	OH	H	H	glu	CH ₃	H
13	H	OH	H	H	glu	H	glu
14	H	OH	OH	<i>O</i> -glu	H	H	H
15	H	H	OH	<i>O</i> -glu	H	H	H
16	H	OH	OH	H	H	H	dig
17	OH	OH	H	<i>O</i> -rham-glu	H	OH	glu
18	H	OH	H	H	H	H	glu- <i>O</i> -rham
19	H	OH	OH	H	H	<i>O</i> -glu	H
20	OH	OH	H	<i>O</i> -gal	H	H	H
21	H	OH	OH	H	H	H	(2''- <i>O</i> -rham)glu
22	OH	OH	H	(2''-sinp-6''-Ac)	H	H	H
23	H	OH	OH	glu	H	H	H

glu=glucose; ara=arabinose; rut=rutinase; gal=galactose; rham=ramnose; Ac=acetil; Sinp= sinaptoil dig=digitoxosídeo.

2.2 IMPORTÂNCIA FARMACOLÓGICA E MEDICINAL DAS PASSIFLORAS

Estudos envolvendo investigações sobre a identificação de metabólitos secundários presentes em plantas do gênero *Passiflora* têm sido desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa, posto que muitos desses metabólitos exibem atividades biológicas e farmacológicas. A exemplo disso, tem-se que, os extratos das espécies de *P. alata* (PETRY *et al.*, 2001), *P. edulis* (PETRY *et al.*, 2001; DE-PARIS *et al.*, 2002; COLETA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011), *P. coerulea* (WOLFMAN *et al.*, 1994), *P. actinica* (SANTOS *et al.*, 2006), *P. incarnata* (ZANOLI *et al.*, 2000; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2002), são usados para tratar a ansiedade e o extrato das folhas de *P. edulis* demonstrou ser eficiente no tratamento de vários distúrbios, tais como: alcoolismo, ansiedade, enxaqueca, insônia, nervosismo e antidepressivo (BENIGNI *et al.*, 1964; LI *et al.*, 2011; AYRES *et al.*, 2015).

As Passifloras possuem atividade antitumoral, a qual foi observada em extratos de *P. edulis* (PURICELLI *et al.*, 2003; ZUCOLOTTI *et al.*, 2009) e *P. alata* (GOMES, 2013), bem como no extrato hidroetanólico das folhas de *P. setacea* e *P. tenuiflora*, que demonstrou um pequeno potencial citotóxico, inibindo o crescimento celular de linhagens de células do ovário-humano, carcinoma do cólon e glioblastoma (GOMES, 2013). O mesmo autor verificou que os extratos de frutos e folhas de *P. tenuiflora* e de *P. setacea* apresentaram capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Shanmaugam *et al.* (2018) avaliaram a atividade enzimática dos extratos da polpa fresca de *P. subpeltata*, obtendo-se a inibição máxima da α -amilase e da α -glicosidase CI_{50} de 18,69 e 32,63 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Ozarowski *et al.* (2013) demonstraram que a concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do extrato das folhas de *Passiflora alata* inibiu 60% do crescimento de linhagens celulares leucêmicas, num período de 72 horas de tratamento. O extrato da polpa, casca e semente de *P. edulis* apresentou atividade contra o tipo HT-29 (células humanas de câncer de cólon) (LI *et al.*, 2013).

Os extratos das plantas de Passifloras vêm demonstrando um forte atividade anti-inflamatório comprovado por Borrelli *et al.* (1996), em que a dosagem de 125-500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ do extrato etanólico de *Passiflora incarnata* apresentou alta atividade anti-inflamatória em ratos. Esta mesma atividade foi observada em extrato etanólico das folhas de *P. foetida* (dose 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), inibindo o edema de pata induzido por carragenina em ratos (SASIKALA *et al.*, 2011). A

aplicação do extrato aquoso das folhas de *P. alata* (100 mg.kg⁻¹) e *P. edulis* (250 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal, apresentou atividade anti-inflamatória na pleurística induzida por carragenina em camundongos (VARGAS *et al.*, 2007). Bezerra *et al.* (2006) verificaram que a dose única de 250 mg.kg⁻¹ do extrato hidroalcoólico de folhas de *P. edulis* possui ação na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos até o 3º dia do pós-operatório.

Diversos estudos têm indicado a atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, dos extratos das espécies do gênero *Passiflora* (ZERAİK *et al.*, 2011; COLOMEU *et al.*, 2013, SILVA *et al.*, 2013; SHANMUGAM *et al.*, 2016). Os extratos dos frutos e folhas de quatro espécies de Passifloras, incluindo *P. setacea* e *P. tenuifila*, mostraram que estas podem ser consideradas potenciais antioxidantes naturais, sobretudo, em se tratando das sementes de ambas as espécies, visto que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos dentre as quatro espécies estudadas, que são *P. edulis* Sims variedades BRS Sol do Cerrado, Ouro Vermelho e Gigante Amarelo; *P. alata* Curtis; *P. setacea* DC e *P. tenuifila* Killip (VIEIRA, 2013). Com as mesmas espécies de Passifloras, Gomes (2013) mostrou que os extratos das folhas de *P. tenuifila* apresentaram maior potencial antioxidante. Rudnicki *et al.* (2007) atribuíram a propriedade antioxidante dos extratos de *P. alata* e *P. edulis* à presença de polifenóis. O extrato da polpa da fruta fresca de *P. subpeltata* apresentou alto conteúdo de fenólicos totais e revelou atividades de sequestro de DPPH e ABTS⁺. Além disso, as atividades antioxidantes totais das amostras analisadas foram associadas ao efeito combinado de fitoquímicos (ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido vanílico e epicatequina) atuando por efeitos aditivos ou sinérgicos. (SHANMUGAM *et al.*, 2018). Os resultados obtidos por Shanmugam *et al.* (2016) revelaram que extrato em acetona das folhas de *P. leschenaultii* é rico em compostos fenólicos e flavonoides correlacionando com potencial antioxidante.

Estudos conduzidos por Lugato *et al.* (2014) indicaram forte potencial antioxidante dos extratos hidroalcoólicos das folhas de plantas da espécie *P. alata* crescidas *in vivo*, *in vitro* e aclimatadas, após a propagação *in vitro*, quando submetidos ao teste de redução do radical livre DPPH. Também tem sido confirmado como antioxidante o extrato da folha de *P. edulis* (SUNITHA; DEVAKI, 2009; Da SILVA *et al.*, 2013). A atividade antioxidante do extrato das folhas de *P. nitida* e do extrato do caule de *P. palmeri* é atribuída à presença de compostos fenólicos, principalmente, catequinas, que são flavonoides desprovidos

da carbonila na posição 4 do anel pirano e compostos contendo anéis catecólicos ou *o*-difenol (BENDINI *et al.*, 2006).

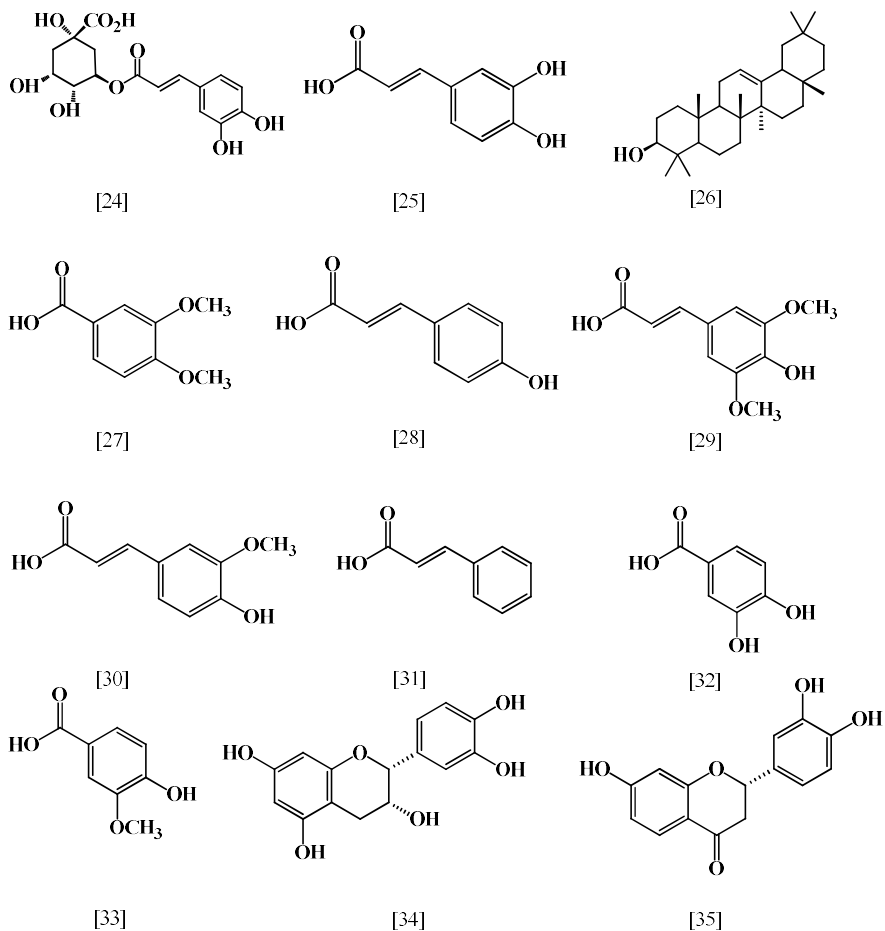


Figura 3. Estruturas de compostos fenólicos e triterpeno β -amirina presentes nas espécies do gênero *Passiflora*.

A administração via oral do extrato aquoso de folhas de *P. edulis* (1100 $\mu\text{m.L}^{-1}$) demonstrou uma significativa atividade antioxidante endógena, diminuindo a peroxidação lipídica no soro, fígado e cólon. No tecido do cólon foi possível observar a inibição na expressão de interleucinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α (CAZARIN *et al.*, 2015). A atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. alata* foi confirmada por Figueiredo *et al.* (2016), contribuindo para a proteção de células β das ilhotas pancreáticas em camundongos diabéticos não-obesos, apresentando potencial no tratamento de diabetes tipo 1.

Vários são os exemplos de atividade antimicrobiana apresentada por diferentes espécies de Passifloras. O extrato metanólico das folhas de *P. nitida* e o extrato do pecíolo de *P. palmeri* exerceram atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*. Esses resultados estão correlacionados à presença do composto isoschaftosídeo (6) no extrato (BENDINI *et al.*, 2006). Siebra *et al.* (2016) verificaram que o uso de fármacos convencionais associados aos extratos hidroalcoólicos de Passifloras potencializou o efeito inibitório no crescimento de duas cepas de bactérias. O extrato hidroalcoólico de folhas de *P. cincinnata* com antibiótico gentamicina diminuiu o crescimento das bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, e o antibiótico amicacina em combinação ao extrato das folhas, inibiu a proliferação das bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*. Observou-se, também, o efeito positivo do antibiótico amicacina associado ao extrato da polpa de *P. cincinnata*, na redução significativa do crescimento da bactéria *Escherichia coli*. Além disso, o extrato em acetona da polpa da fruta de *P. ligularis* mostrou efeito inibitório contra as bactérias Gram-negativas, *Salmonella paratyphi*, *S. typhi*, *S. typhi* B e *Klebsiella pneumoniae* (SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014). Kannan *et al.* (2011) observaram promissora atividade antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *P. edulis* frente as bactérias gram (+), *Bacillus subtilis* e gram (-), *E. coli*, quando comparada ao antibiótico Ciprofloxacina.

As doenças tropicais negligenciadas como leishmaniose e doença de Chagas são responsáveis, de um modo geral, por mais de um milhão de mortes humanas em todo o mundo por ano, estimativas apontam que cerca de 600.000-100.000 de novos casos são de leishmaniose cutânea e 50.000-90.000 novos casos de leishmaniose visceral (WHO, 2018). Essa observação acima destaca a importância de explorar o potencial medicinal das espécies do gênero *Passiflora*, posto que, até o presente momento apenas dois trabalhos foram reportados utilizando extratos das

folhas de *Passiflora edulis* (BEZERRA *et al.*, 2006) e material vegetal de *P. cincinnata* (DELMONDES *et al.*, 2014) contra essas parasitoses. De acordo com relatos disponíveis na literatura, os produtos naturais vêm sendo investigado como alternativa no combate a espécies de protozoários (MUZITANO *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2012, 2015; SILVA *et al.*, 2014; JÚNIOR *et al.*, 2016; OGBOLE *et al.*, 2018).

2.3 ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS.

Matkowski (2008); Murthy *et al.* (2014) e Giri; Zaheer (2016) reportaram a produção de antioxidantes como polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, taninos, estilbenos e xantonas), isoprenoides (terpenoides, carotenoides e esteroides) e outras moléculas como os tocoferóis e betalainas por sistemas de cultura *in vitro* de plantas. Esses autores afirmam que os sistemas de cultura *in vitro* mais frequentemente utilizados são as culturas de calos, as suspensões celulares, as culturas de ramos e de raízes e, em menor número de casos, as culturas de embriões somáticos. As estratégias mais utilizadas para aumentar a produção de antioxidantes por culturas *in vitro* são a otimização da biossíntese, pela manipulação do meio de cultura (tipos de auxinas e citocininas) e das condições de cultivo; do nível de diferenciação das culturas celulares; a seleção de linhagens celulares com alta produção; o fornecimento de precursores e biotransformação; a elicitação e o estresse induzido; a transformação com a *Agrobacterium rhizogenes* de cultura de raízes.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são empregadas visando o estabelecimento *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas sendo amplamente utilizadas na produção de culturas axênicas, para fins de conservação de germoplasma, melhoramento genético, micropropagação e produção de compostos naturais (RAO; RAVISHANKAR, 2002; TERMIGNONI, 2005). Essas técnicas podem ser aplicadas visando obter as duas vias morfogênicas de regeneração de plantas, organogênese e embriogênese somática ou a simples proliferação celular, para o desenvolvimento de culturas celulares.

O calo é formado por um grupo de células parenquimáticas que se multiplicam desordenadamente e que podem apresentar algum estágio de diferenciação (DODDS; ROBERTS, 1995; GEORGE *et al.*, 2008). O desenvolvimento de um calo compreende três etapas: indução, divisão

celular e diferenciação. A etapa de indução do calo depende das condições fisiológicas do tipo de explante removido da planta-mãe e dos componentes do meio de cultivo. Passando pela fase de indução, inicia-se o processo de divisão celular, no qual as células do explante original voltam a ter natureza meristemática, quando já diferenciadas ou entram diretamente em divisão celular, quando encontram-se na fase meristemática, no próprio explante. Após a fase de intensa proliferação celular, as células do tecido meristemático se preparam para diferenciação celular e/ou bioquímica. Nessa etapa, as células ficam maiores e vacuoladas e também ocorre a expressão de certas vias metabólicas (DODDS; ROBERTS, 1995).

De acordo com Matkowski (2008) o nível de diferenciação celular dos sistemas de cultura *in vitro* pode influenciar o nível de produção das moléculas antioxidantes. Assim, por exemplo, em algumas espécies os níveis detectados em calos são inferiores aos detectados em culturas de ramos e um determinado tipo de molécula pode estar presente nos sistemas de culturas de ramos, mas ausente nas culturas de calos, raízes ou suspensões celulares da mesma espécie de planta.

A origem do explante e da planta mãe doadora também podem influenciar a produção de metabólitos secundários. Matkowski (2008) afirma que, mesmo quando as culturas *in vitro* são estabelecidas a partir da desdiferenciação das células do explante original, proveniente de um determinado órgão da planta, o potencial de biossíntese típico daquele órgão pode ser mantido, como comprovado para os diferentes tipos de culturas de calos estabelecidos para *Pueraria lobata*, em que o nível de isoflavonoides produzidos pelos calos, dependeu do órgão de origem do explante, indicando que a escolha da planta e do órgão doador dos explantes são fatores a serem considerados, quando da iniciação das culturas.

O uso de auxinas e/ou citocininas em cultura de tecido *in vitro* modificam as vias fenilpropanóide/chiquímico sintetizando ácidos fenólicos, possivelmente regulando a atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase - PAL e da chalcona sintase (MOYO *et al.*, 2014). Entre as auxinas mais eficientes utilizadas nos sistemas de cultura *in vitro*, para estimular a produção de antioxidantes, estão o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA), e entre as citocininas a 6-benzilaminopurina (BAP), sendo que a eficiência dos diferentes tipos de reguladores de crescimento em ativar as vias biossintéticas de moléculas antioxidantes depende da espécie vegetal (MATKOWSKI, 2008).

Conforme descrevem Thiruvengadam; Chung (2015), os reguladores de crescimento e poliaminas estimularam a regeneração *in vitro* de *Cucumis anguria* (Cucurbitaceae), auxiliando no acúmulo de flavonóis, ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. A multiplicação *in vitro* de culturas de calos de *Passiflora setacea* com 2,4-D e sacarose (0,2%) induziu o aumento da produção de compostos fenólicos em calos de nó cotiledonar aos 30 dias de cultivo (SOZO, 2014). Estudos conduzidos por Thiruvengadam *et al.* (2014), em suspensões celulares de raízes de *Polygonum multiflorum* (Polygonaceae) indicaram incremento da produção de antraquinonas (emodina e physcion), com suplementação de sacarose.

As fontes de carbono são essenciais para manter o metabolismo celular, o crescimento e o desenvolvimento das células e plantas cultivadas *in vitro*, sendo a sacarose e glicose as mais comumente utilizadas (CHAWLA, 2002). Os açúcares solúveis, como sacarose, frutose e glicose atuam nas células vegetais, como fontes de energia e de esqueletos de carbono e, além disso, assim como os hormônios vegetais, podem atuar como mensageiros primários e como sinais, que controlam a expressão de diferentes genes e atividades das enzimas. Assim, podem ativar rotas de transdução de sinais e modular a expressão gênica do metabolismo vegetal, resistência ao estresse, crescimento e desenvolvimento (ROSA *et al.*, 2009). Desempenham, papel central no sequestro das espécies reativas de oxigênio (EROs), através de processos antioxidantes, como a via das pentoses-fosfato e biossíntese de carotenoides (COUÉE *et al.*, 2006). Podem, também, agir diretamente, como moléculas antioxidantes sequestradoras de EROs, como as frutanas e os oligossacarídeos da família da rafinose e, especialmente, aqueles que interagem com as membranas (VAN DEN ENDE, 2013; PESHEV *et al.*, 2013; KEUNEM *et al.*, 2013). Contudo, pouco são os estudos sobre como os diferentes tipos de açúcares solúveis podem afetar o metabolismo secundário e os mecanismos antioxidantes em sistemas de cultura *in vitro*.

A aplicação das técnicas de cultura *in vitro* vegetal tem sido alternativa sustentável para produção de bioativos com potencial para indústria farmacêutica e também para multiplicação de espécies ameaçadas de extinção (SARASAN *et al.*, 2006). Exemplos de sucesso na produção de compostos de interesse por culturas de células vegetais tem sido relatados para o alcaloide isoquinolínico berberina, oriundo da cultura de células de *Coptis japonica* (Ranunculaceae); sanguinarina, de *Papaver somniferum* (Papaveraceae); ajmalicina, de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) e para a naftoquinona shikonina, produzida por

cultura de células de *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae), além do ácido rosmarínico, de *Coleus blumei* (Lamiaceae); saponina, de *Panax ginseng* (Araliaceae); cafeína, de *Coffea arábica* (Rubiaceae); diosgenina, de *Dioscorea deltoidea* (Dioscoreaceae) e capsaicina de *Capsicum frutescens* (Solanaceae) (PLETSCH, 1998).

A produção *in vitro* de vários tipos de metabólitos secundários, em larga escala, em biorreatores tem sido viabilizada para várias espécies de plantas como *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Borojoa patinoi* (Rubiaceae) e *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) (ALVAREZ-YELA *et al.*, 2016); de fenólicos por culturas de células de *Polygonum multiflorum* (Polygonaceae) (HO *et al.*, 2017); culturas de raízes adventícias para a produção de fenólicos e flavonoides em *Oplopanax elatus* (Araliaceae) (JIANG *et al.*, 2015); produção de polifenóis por culturas de células de *Scrophularia striata* (Scrophulariaceae) (AHMADI-SAKHA *et al.*, 2016); produção de ginsenosídeos por cultura de células de *Panax ginseng* (THANH *et al.*, 2014); suspensões celulares de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae) (WANG *et al.*, 2015); de polifenóis por cultura de células de *Vitis vinifera* x *Vitis berlandier* (Vitaceae) (DONNEZ *et al.*, 2011).

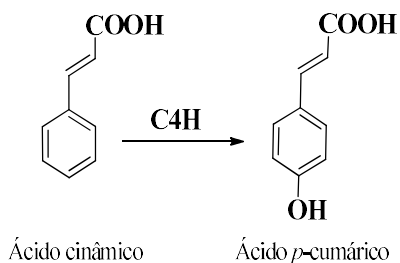
Entretanto, poucos foram os estudos sobre o potencial de produção de metabólitos secundários, por sistemas de cultura *in vitro* de células de espécies de maracujá. Antognoni *et al* (2007) observaram o aumento da produção de orientina [nº 3, Tabela 1] em culturas de calos de *P. quadrangularis*, quando exposto ao indutor físico UV-B. Foi estudado também, o aumento na produção de compostos aromáticos derivados de *E*-feruloil e *E*-cumaroil, em suspensões celulares de *P. garkei* (FRACCAROLI *et al.*, 2008); de alcaloides, em cultura de células em suspensão de *P. alata* (MACHADO *et al.*, 2010) e de compostos fenólicos, em cultura de calos de *P. alata* (LUGATO *et al.*, 2014).

Estudos conduzidos recentemente por Sozo *et al.* (2016) descrevem o protocolo de otimização *in vitro* das culturas de calos das espécies de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, também investigando a produção de compostos fenólicos e potencial antioxidante, em que verificaram um notável potencial antioxidante e a presença de compostos fenólicos nos extratos de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* e de calos de nó foliar e de nó cotiledonar de *P. setacea*. Contudo, as estratégias da utilização de elicitores e/ou fontes de carbono, para aumentar a produção de metabólitos secundários pelas culturas de calos destas duas espécies silvestres não foram ainda aplicadas.

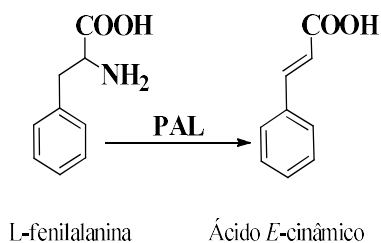
2.3.1 INCREMENTO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS *IN VITRO* DE PLANTAS ATRAVÉS DO USO DE ELICITORES.

Os elicitores são definidos como qualquer agente indutor capaz de desencadear respostas a estímulos de estresse, através de compostos de sinalização, que ativam mecanismos de defesa das plantas (REA *et al.*, 2011). O processo de reconhecimento acontece na membrana plasmática ou no citoplasma das células vegetais (ZHAO *et al.*, 2005). Os indutores são classificados em bióticos e abióticos: o primeiro tipo de indutor é de origem biológica (extratos de fungos, bactérias, vírus, polissacarídeo e carboidratos) e o segundo é oriundo de componentes químicos (metais pesados e sais inorgânicos), hormônios vegetais (etileno e ácido salicílico) e fatores físicos (radiação ultravioleta, temperatura, potencial osmótico, nutrição mineral e pH) (PATEL; KRISHNAMURTHY, 2013).

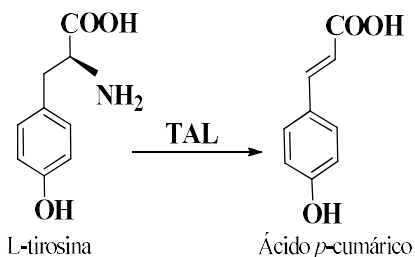
A produção de antocianinas, flavonoides e ácido cinâmico em cultura de células é altamente influenciada por indutores físicos (radiação vermelha e ultravioleta, temperatura e pH) e químicos. Assim, o incremento de compostos fenólicos nas plantas e nas culturas de células *in vitro* é em consequência da ação dos elicitores sobre as enzimas envolvidas na biossíntese de fenilpropanóides (VOGT, 2010; BAENAS *et al.*, 2014), como a C4H (cinamato 4-hidroxilase) envolvida na catalise da conversão de ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico (**Equação 1**), a enzima também controla o fluxo de carbono para fitoalexinas que são sintetizadas quando as plantas são atacadas por agentes patogênicos (SMITH, 1996; TUAN *et al.*, 2010). A enzima PAL (fenilalanina amônia-liase) catalisa a conversão da fenilalanina em ácido *E*-cinâmico (**Equação 2**) e a TAL (tirosina 4-hidroxilase) catalisa a conversão da tirosina em ácido *p*-cumárico (**Equação 3**) (BOERJAN *et al.*, 2003).



Equação 1: Reação de desaminação pela enzima cinamato 4-hidroxilase



Equação 2: Reação de desaminação pela enzima fenilalanina amônia-liase



Equação 3: Reação de desaminação pela enzima tirosina 4-hidroxilase

Estudos demonstraram que as plantas produzem níveis elevados de compostos fenólicos em culturas *in vitro* na presença de luz. Em cultura de células de *Ruta graveolens* (Rutaceae), após elicitação com diferentes espectros de luz, foi observada a produção de ácidos fenólicos e ácido cinâmico (SZOPA *et al.*, 2012). Ahmad *et al.* (2016) também utilizaram a luz para favorecer a produção de compostos fenólicos nas culturas de calos de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). O mesmo efeito

promotor foi verificado com a radiação ultravioleta nas culturas de segmentos nodais de *Phyllanthus tenellus* (Euphorbiaceae), havendo aumento dos níveis de ácido elágico e geranina (VICTÓRIO *et al.*, 2011) e na produção de ácido rosmarínico, em culturas de ramos *in vitro* de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) (KWON *et al.*, 2009). Antognoni *et al.* (2007) demonstraram que a irradiação UV-B estimulou a produção de flavonoides C-glicosilados em culturas de calos de *P. quadrangularis*. Ghanati *et al.* (2013) observaram um aumento de malvidina e catequina em cultura de calos de explantes de folhas de *Malve neglecta* (Malvaceae), respectivamente, após 60 minutos de exposição a radiação UV-B e UV-C. Resultados semelhantes foram obtidos para as culturas de calos de explantes de hipocótilo de *Echinacea purpurea* na qual a radiação UV-B aumentou os teores de ácido cafeico e fenólicos totais (MANAF *et al.*, 2016).

Alguns autores apontam os indutores biológicos como fonte de produção de cumarinas e proantocianidinas, visto que estes compostos estão relacionados com a proteção do tecido vegetal contra ataque de patógenos. Em suspensões celulares de *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae), o elicitor ácido salicílico (AS) estimulou a produção de ácidos fenólicos, como o ácido salvianólico B e o ácido cafeico (DONG *et al.*, 2010). Conceição *et al.* (2006) observaram que aplicação da biomassa fúngica de *Colletotrichum gloeosporioides* nas culturas de suspensões celulares de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) estimulou o aumento da concentração das xantonas, bem como o aparecimento de novos derivados xantônicos, comparados ao controle. *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* induziu o aumento na produção de compostos derivados do ácido hidroxicinâmico em culturas de calos de *Phoenix dactylifera* (Arecaceae) (DAAYF *et al.*, 2003). Veerashree *et al.* (2012) trataram as culturas de suspensão celular de *Gymnema sylvestre* (Apocynaceae) com extrato de levedura e, observaram uma produção de cinco vezes mais de ácido gimnêmico. Na espécie de *Passiflora garkei*, Fraccaroli *et al.* (2008) observaram que o extrato de levedura potencializou o aumento de compostos aromáticos.

O ácido salicílico também induziu a biossíntese de antocianinas, pigmentos pertencentes ao grupo dos flavonoides, em cultura celular de *Vitis vinifera* (SAW *et al.*, 2010) e em culturas de calos de *Rosa hybrida* (Rosaceae) (RAM *et al.*, 2013), além de estimular a enzima hiosciamina 6- β -hidroxilase na produção de escopolamina em culturas de raízes de *Scopolia parviflora* (Solanaceae) (KANG *et al.*, 2004). Ademais, o ácido salicílico demonstrou potencial para produção de biomassa em suspensão celular de videira (MEWIS *et al.*, 2011). A sinergia entre o

jasmonato de metila e ácido salicílico promoveu o aumento de antraquinonas em culturas celulares de *Rubia cordifolia* (Rubiaceae) (BULGAKOV *et al.*, 2002). Estudos com outras classes de elicitores conduzidos por Guo *et al.* (2011) revelaram a eficiência da sacarose no acúmulo de antocianinas e glucosinolatos em *Brassica oleracea* var. *italica* (Brassicaceae).

Exemplos bem sucedidos da otimização da produção, em especial de compostos fenólicos e flavonoides por culturas *in vitro*, por meio da utilização de outros tipos de moléculas elicitoras, também são relatados. Utilizando jasmonato de metila, ácido jasmônico e ácido giberélico como elicitores, foi observado um aumento da quantidade de fenólicos em suspensões celulares de *Artemisia absinthium* (Asteraceae) (ALI *et al.*, 2015). O mesmo foi observado quando utilizou-se quitosana, jasmonato de metila, ácido salicílico e UV-C em suspensões celulares de *Vitis vinifera* (Vitaceae) (XU *et al.*, 2015a; XU *et al.*, 2015b). O uso de ácido salicílico em suspensões celulares oriundas de culturas de ramos e calos aumentou a produção de fenilpropanoides em *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) (GADZOVSKA *et al.*, 2013) e o uso de polissacarídeos como quitosana, pectina e alginato estimulou a produção de fenólicos em suspensões celulares de *Vitis vinifera* (CAI *et al.*, 2012a).

As culturas *in vitro* também tem sido utilizadas para otimizar a produção de outros compostos, como os carotenoides, para as indústrias farmacêutica e alimentícia, como demonstrado em cultura de células de *Tagetes erecta* (Asteraceae), por Benítez-García *et al.* (2014), com a vantagem da possibilidade de manipulação genética; para viabilizar a produção de isoprenoides, por suspensões celulares de *Artemisia annua* (Asteraceae) (RIZZELLO *et al.*, 2014), e de óleos essenciais, por meio da manipulação na composição nutricional do meio de cultura e da utilização de extratos de fungos, em culturas de ramos de *Thymus caespitosus* (Lamiaceae) (MENDES *et al.*, 2014) e em plantas micropropagadas de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) (MORONE-FORTUNATO; AVATO, 2008).

Na **Tabela 2** estão citados os trabalhos nos quais diferentes grupos de elicitores foram utilizados para incrementar a produção de metabólitos secundários em sistemas de cultura de tecidos de plantas. As culturas de células de *Orthosiphon stamineus* (Lamiaceae) foram estimuladas com a suplementação de quitosana a 150 mg.L⁻¹, havendo um aumento de fenólicos e da atividade antioxidante (LIM *et al.*, 2013). A aplicação de quitosana ou extrato de levedura (100 mg.L⁻¹) resultou em um aumento de 10,3 e 5,1 vezes do ácido *p*-cumárico,

respectivamente, em comparação ao controle das culturas de células *Malus x domestica* Borkh (CAI *et al.*, 2014). Sarkate *et al.* (2017) usaram extrato de levedura em cultura de calos oriundos de segmento foliar de *Malus domestica* observando aumento da concentração de ácidos fenólicos e flavonoides em relação ao controle.

A eficiência dos elicitores bióticos e abióticos em possibilitar a otimização da produção de várias classes de metabólitos secundários e atividade antioxidante indica o potencial de utilização de abordagens biotecnológicas na produção de metabólitos de interesse.

Tabela 2. Produção de metabólitos secundários por cultura de células de plantas.

Espécies	Tipo de explante	Sistema de cultura <i>in vitro</i>	Elicitor	Metabólitos secundários	Referências
<i>Orthosiphon stamineus</i>	Segmento foliar	Suspensão de células	Quitosana	Fenólicos	Lim <i>et al.</i> (2013)
<i>Malve neglecta</i>	Segmento foliar	Cultura de calos	UV-B UV-C	Malvidina Catequinas	Ghanati <i>et al.</i> (2013)
<i>Artemisia annua</i>	Segmento foliar	Suspensão de células	2,6-dimetil- β - ciclodextrinas	Carotenoides Quinonas	Rizzello <i>et al.</i> (2014)
<i>Thymus caespititius</i>	Segmento apical	Cultura de ramos	Nutrientes Extrato de fungos	Terpenos	Mendes <i>et al.</i> (2014)
<i>Malus x domestica</i>	*	Suspensão de células	Quitosana Extrato de Levedura	Ácido <i>p</i> -cumárico	Cai <i>et al.</i> (2014)
<i>Vitis vinifera</i>	Segmento foliar	Cultura de células	Extrato de <i>Phaeomonella chlamydospora</i>	Polifenóis	Sák <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnema sylvestre</i>		Cultura de raízes	Ácido linolênico	Ácido gimnêmico	Praveen <i>et al.</i> (2014)
<i>Artemisia absinthium</i>	Segmento foliar	Suspensão de células	Ácido Jasmônico Jasmonato de metila Ácido giberélico	Fenólicos Flavonoides	Ali <i>et al.</i> (2015)
<i>Vitis vinifera</i>	*	Cultura de calos/suspensão de células	UV-C Jasmonato de metila Ácido salicílico	Estilbeno	Xu <i>et al.</i> (2015b)
<i>Vitis vinifera</i>	Fragmento do fruto	Cultura de calos	Quitosana UV-C	Estilbeno β -1,3-glucanase	Xu <i>et al.</i> (2015a)

*não encontrado na literatura

Tabela 2. Produção de metabólitos secundários por cultura de células de plantas (continuação).

Espécies	Tipo de explante	Sistema de cultura <i>in vitro</i>	Elicitor	Metabólitos secundários	Referências
<i>Cleome rosea</i>	Explantos internodais de raízes	Cultura de calos	Jasmonato de metila	β -caroteno	Rocha <i>et al.</i> (2015)
<i>Perovskia abrotanoides</i>	Segmento de raízes adventícias	Cultura em suspensão de células	Extrato de levedura CuSO ₄ Sorbitol	Cryptotanshinone Transhinone IIA	Zaker <i>et al.</i> (2015)
<i>Erythrina lysistemon</i>	Segmento foliar	Suspensão de células	Jasmonato de metila	flavonas, isoflavonas, isoflavanonas, alcalóides, pterocarpanos, ácidos fenólicos	Farag <i>et al.</i> (2016)
<i>Celastrus paniculatus</i>	Segmento foliar	Cultura de calos	Ácido salicílico, AgNO ₃ e ácido jasmônico	Fenólicos totais	Anusha <i>et al.</i> (2016)
<i>Echinacea purpurea</i>	Explantos de hipocótilo	Suspensão células	UV-B	Fenólicos totais Ácido cafeico	Manaf <i>et al.</i> (2016)
<i>Malus domestica</i>	Segmento foliar	Cultura de células	Extrato de levedura	Ácido clorogênico Ácido 4-cumárico Ácido ferúlico Ácido benzoico Rutina	Sarkate <i>et al.</i> (2017)
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Segmento foliar	Cultura de calos	AlCl ₃	Reserpine	Zafar <i>et al.</i> (2017)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para o estabelecimento *in vitro* da espécie de *P. tenuifila* foram utilizadas sementes obtidas a partir de frutos produzidos em casa de vegetação na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis - SC, Brasil, por mudas do banco de germoplasma de Passifloras, cedidas pela Embrapa Cerrados / Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Planaltina - DF, Brasil. Já para o estabelecimento *in vitro* da espécie de *P. setacea* foram utilizadas sementes cedidas pela Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil. Os frutos das espécies *P. tenuifila* (Figura 4, A-B) e *P. setacea* (Figura 4, C-D) utilizadas nesse trabalho foram coletados e formecidos pela Embrapa Cerrados em agosto de 2016. As folhas foram coletadas de plantas cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brasil.



Figura 4. Frutos e sementes das espécies de *P. tenuifila* (A, B) e *P. setacea* (C, D).

3.2 Métodos

3.2.1 Frutos e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea*

Os frutos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram coletados e mantidos em bandejas de plástico em temperatura ambiente. Após duas semanas os frutos de ambas as espécies foram seccionados para a coleta dos pericarpos e sementes. As sementes foram separadas dos arilos em água corrente e com o auxílio de uma peneira. As folhas foram coletadas e secas a 60 °C por 24 horas em estufa. O mesmo processo de secagem foi realizado para os pericarpos e sementes de ambas as espécies.

3.2.2 Condições de cultivo das culturas *in vitro* das espécies de *P. tenuifila* e *P. setacea*

Em todos os experimentos, os diferentes tipos de explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura correspondente e foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm). Em todos os casos o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com 1 N NaOH antes da autoclavagem (121 °C, 1kgf/cm², 20 min). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas luz, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL (irradiância de 22,3 μmol.m⁻².s⁻¹) e umidade relativa de 70%. Essas condições foram utilizadas em todos os experimentos exceto quando especificado.

3.2.3 Estabelecimento e manutenção das culturas *in vitro* de calos

3.2.3.1 *Passiflora tenuiflora*

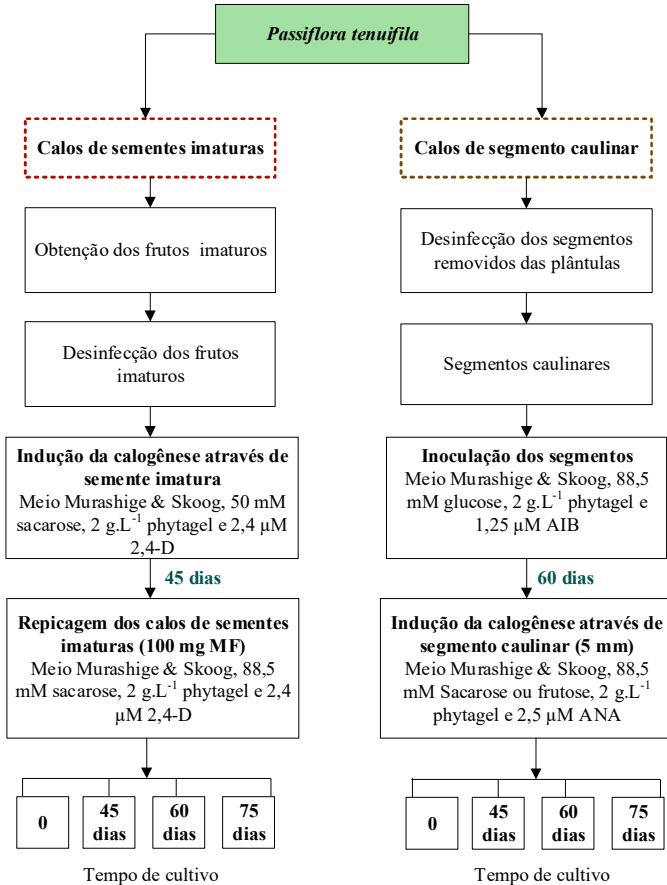


Figura 5. Fluxograma do estabelecimento *in vitro* das culturas de calos de *P. tenuiflora*.

3.2.3.1.1 Calos oriundos de semente imatura

Os calos de sementes imaturas foram estabelecidos através da metodologia descrita por Sozo *et al.* (2016). Conforme demonstrado na Figura 5, os frutos imaturos foram lavados com água da torneira contendo 2-3 gotas de detergente comercial, enxaguados e levados para o fluxo laminar, onde foram imersos, por 10 min em álcool 70%. Em seguida foram excisados o pericarpo e o endocarpo e as sementes, contidas no ovário, foram removidas e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (Sigma – Aldrich[®]), semi-sólido, suplementado com 50 mM de sacarose e 2 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma – Aldrich[®]) e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D).

Após 45 dias de cultivo, amostras de 100 mg dos calos obtidos foram transferidas para o meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS, Sigma – Aldrich[®]), semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma – Aldrich[®]), 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D). As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 4.2.2 e coletadas após 45, 60 e 75 dias de cultivo para as análises fitoquímicas e de atividade antioxidante.

3.2.3.1.2 Calos oriundos de segmento caulinar

As plantas de *P. tenuiflora* foram estabelecidas *in vitro* através da metodologia descrita em Sozo *et al.* (2016). Conforme demonstrado na Figura 5, os segmentos apicais de ramos (3-4 cm de comprimento), contendo a gema apical e duas gemas axilares, 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 auxílio de água (100 mL) e detergente neutro (1 mL). Após, enxaguados por cinco vezes 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 tubos de ensaio contendo meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS, Sigma – Aldrich[®]), semi-sólido suplementado com 88,5 mM de glucose (Sigma – Aldrich[®]), 1,25 µM de

ácido indolbutírico (AIB, Sigma – Aldrich[®]) e 2 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma – Aldrich[®]).

Após 8 semanas as plantas produzidas *in vitro* foram removidas dos tubos de ensaio e segmentos de caules (5 mm de comprimento) foram inoculados, em novos tubos de ensaio, na posição horizontal, em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose (Sigma – Aldrich[®]), 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,5 µM de ácido α-naftalenoacético (ANA, Sigma – Aldrich[®]), as condições de cultivo foram mantidas conforme o item 4.2.2. Após 45, 60 e 75 dias de cultivo, os calos foram coletados para as análises fitoquímicas e de atividade antioxidante.

3.2.3.2 *Passiflora setacea*

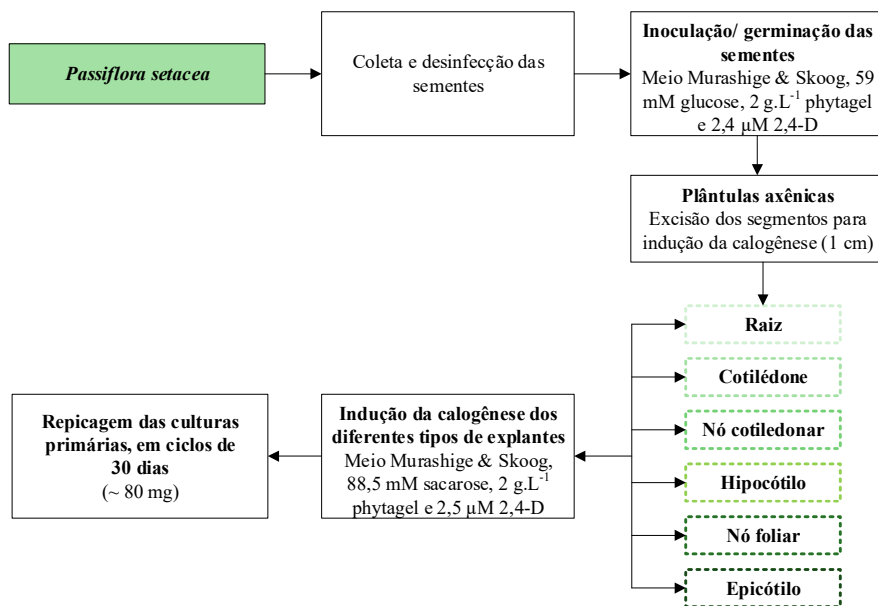


Figura 6. Fluxograma do estabelecimento *in vitro* das culturas de calos de *P. setacea*.

Para o estabelecimento *in vitro* de plântulas axênicas de *P. setacea* foram seguidos protocolos descritos por Sozo *et al.* (2016). Conforme demonstrado na Figura 6, 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 tubos de ensaio contendo meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS, Sigma – Aldrich[®]), semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose e 2 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma – Aldrich[®]).

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, nó foliar e epicótilo foram removidos e inoculados em novos tubos de ensaios contendo meio de cultura Murashige & Skoog (1962) semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D). A Figura 7A, ilustra os segmentos que foram excisados para indução da calogênese. Os calos produzidos foram mantidos, através de repicagens das culturas primárias, em ciclos de 30 dias, no mesmo meio de cultura utilizado para a indução dos calos, através da transferência de segmentos pesando em média 80 mg de biomassa fresca. Na Figura 7B, estão representadas as culturas de calos de diferentes tipos de explante.

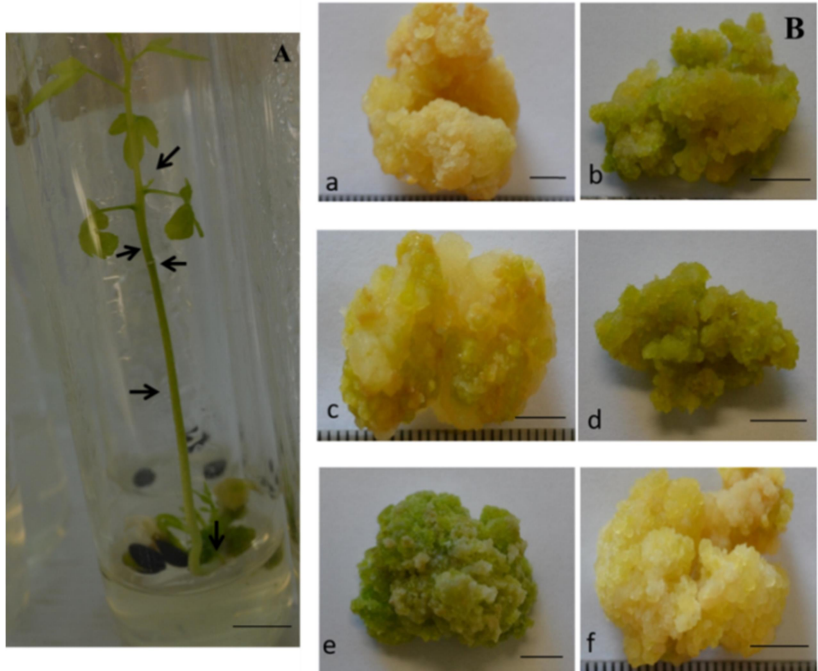


Figura 7. Plântula de *P. setacea* (A) de 8 semanas de idade cultivadas em meio de cultura MS semi-sólido, suplementado com 59 mM de sacarose e 2 g.L⁻¹ de Phytigel. As setas indicam, da base para o ápice: radícula pouco desenvolvida, hipocótilo, nó cotiledonar, epicótilo, nó foliar. Barra= 12,5 mm. Calos de *P. setacea* (B) originados a partir de segmentos de raiz (a), hipocótilo (b), epicótilo (c), nó cotiledonar (d), cotilédone (e) e nó foliar (f) de plântulas cultivados em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel, após 30 dias. Barras= 5 mm.

3.2.4 Tratamento dos calos com ácido salicílico

O preparo da solução de ácido salicílico seguiu Babel *et al.* (2014) com modificações. Inicialmente foi preparado uma solução de ácido salicílico (Sigma – Aldrich[®]) em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) líquido, com pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 °C e 1kgf/cm², 20 min. A seguir, foram adicionados alíquota de 500 μL de

solução contendo ácido salicílico sobre cada culturas de calos com 50 dias de cultivo para a espécie de *P. tenuifila* e com 35 dias de cultivo para a espécie de *P. setacea*. Já as culturas controle (não elicitado) de ambas as espécies receberam uma dosagem de 500 μL de meio de cultura Murashige & Skoog (1962), com pH ajustado para 5,8 e autoclavado.

As culturas de calos de *P. tenuifila* ficaram expostas por 14 e 21 dias ao ácido salicílico (concentração de 145 μM), totalizando 64 e 71 dias de cultivo, respectivamente. As culturas de calos de *P. setacea* permaneceram expostas por 21 dias ao ácido salicílico (concentrações de 145, 290, 500, 580, 1160 e 2320 μM), totalizando 56 dias de cultivo.

3.2.5 Determinação da biomassa fresca e biomassa seca dos calos produzidos *in vitro*.

Para a determinação da biomassa fresca, os calos foram pesados imediatamente após a remoção do meio de cultura. Para a determinação da biomassa seca, os calos foram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, mantidos em estufa, por 24 horas a 65 °C e pesados. A razão entre as biomassas seca e fresca foi calculada dividindo-se a biomassa seca pela biomassa fresca.

3.3 Preparo das amostras e das análises químicas qualitativas e quantitativas de metabólitos primários e secundários.

Duas metodologias de extração e análises quantitativas foram utilizadas no presente trabalho, dependendo do objetivo dos experimentos realizados. Essas metodologias diferiram quanto à quantidade de biomassa seca inicial de calos utilizada no preparo do extrato.

Nos experimentos para verificar o efeito de fontes de carbono, do tempo de exposição e da concentração de ácido salicílico, a biomassa fresca utilizada nas extrações foi de 300 mg a 2 g, dependendo da classe de composto analisada. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSC), sob a supervisão do professor Dr. Marcelo Maraschin. Devido à baixa quantidade de biomassa requerida para as análises e ao rápido método de

extração, optou-se por essa metodologia para otimizar alguns parâmetros, pois possibilitava a realização de um número maior de experimentos, com a biomassa de calos disponível, em menor espaço de tempo. Porém, a baixa quantidade de biomassa utilizada nos extratos não possibilitava as análises subsequentes de atividades biológicas e caracterização de metabólitos secundários.

Nos experimentos em que o objetivo foi obter extratos mais concentrados, que pudessem ser utilizados, tanto nas análises dos metabólitos secundários e atividade antioxidante, como também, nos estudos sobre atividades biológicas e identificação dos tipos de moléculas presentes nos extratos, foram utilizadas de 3-4 g de biomassa seca. Esses estudos, que foram realizados de forma comparativa entre sementes, pericarpos, folhas e calos, foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) sob a supervisão da professora Dr^a. Ines Maria Costa Brighente. Devido ao tempo de extração mais longo, essa metodologia era mais demorada, mas necessária para se conseguir extratos mais concentrados. Portanto, essas metodologias serão descritas a seguir, separadamente, para os dois grupos de experimentos realizados.

3.4 Preparo das amostras e análises químicas qualitativas e quantitativas realizadas para os experimentos sobre o efeito de fontes de carbono e elicitação com ácido salicílico (tempo de exposição, concentrações).

Conforme a Figura 8, os extratos metanólicos de *P. setacea* e *P. tenuifila* para quantificação de fenólicos totais foram preparados com 2 g de biomassa fresca macerada em 10 mL de metanol 80%. Para a quantificação dos flavonoides foram utilizadas 2 g de biomassa fresca macerada em 5 mL de metanol 80%. Os almofarizes contendo os extratos foram cobertos com plástico PVC e papel-alumínio e deixados em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por uma hora. Em seguida os extratos foram centrifugados à 4000 rpm, por 15 minutos a 25 °C. Após centrifugação foi recolhido o sobrenadante e armazenado no freezer -20 °C. O extrato utilizado para avaliar o potencial antioxidante foi o mesmo extrato usado na quantificação dos flavonoides.

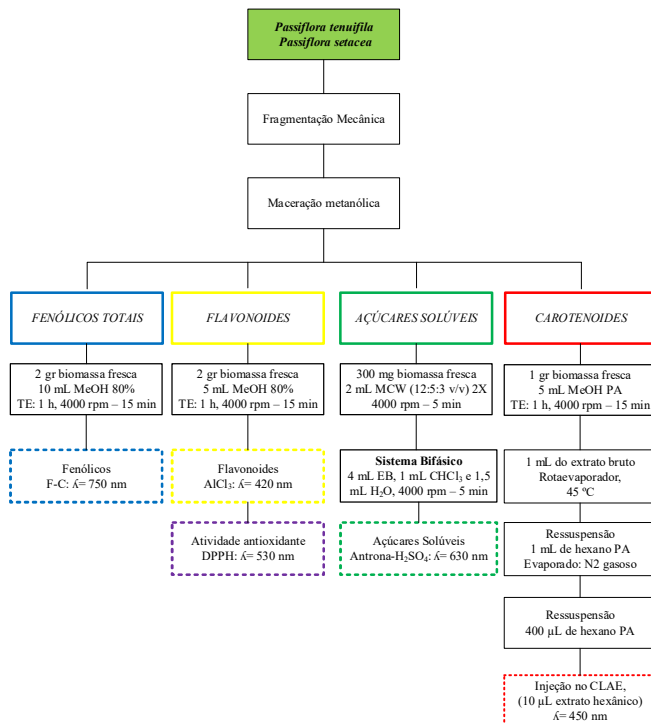


Figura 8. Fluxograma do processo de extração hidrometanólica e análises bioquímicas das culturas de calos das espécies de *P. tenuiflora* e *P. setacea*. TE= tempo de extração; EB= extrato bruto.

3.4.1 Fenólicos totais

Os conteúdos de fenólicos totais dos extratos de calos foram determinados pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Schiavon *et al.* (2012), com modificações. Aliquota de 300 µL de extrato metanólico (item 3.4) e 225 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma – Aldrich®) foram misturados. Após 3 minutos, adicionou-se 2,475 mL da solução de carbonato de sódio 2% (Vetec) e agitou-se em vortex. Para o branco, foi utilizada uma mistura conforme descrito acima, sendo no lugar da amostra o metanol 80%. As amostras foram deixadas em repouso por uma hora em temperatura ambiente, protegidas da luz. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 750 nm

utilizando-se um espectrofotômetro de UV-visível (UV-2000A, Instrutherm). A curva padrão foi preparada utilizando-se a solução de ácido gálico (Sigma[®] - G-7384) nas concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2= 0,995$). O teor de fenólicos totais das amostras foram expressos em mg de ácido gálico (AG) por g de biomassa seca, que é igual a equivalência de ácido gálico (EqAG). As leituras foram realizadas em quintuplicata.

3.4.2 Flavonoides

Os flavonoides totais dos extratos dos calos foram determinando a partir do método colorimétrico de cloreto de alumínio, desenvolvido por Zacarias *et al.* (2007). Em tubos de ensaio foram adicionados 500 μL de extrato metanólico (item 3.4, Figura 8), 2,5 mL de etanol P.A e 500 μL da solução de cloreto de alumínio 2% (Vetec), após agitados em vortex. Para o branco foi utilizado uma mistura conforme descrito acima, sendo no lugar da amostra o metanol 80%. A reação ficou em repouso por uma hora, em temperatura ambiente, protegidas da luz. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 420 nm, utilizando-se espectrofotômetro UV-visível (Spectro LGS53, BEL Photonics). Para a curva padrão foi utilizada a solução de quercetina (Sigma[®] - Q0125), nas concentrações 10 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2= 0,999$). O teor de flavonoides totais foi expresso em mg de quercetina (Q) por g de biomassa seca, que é igual a equivalência de quercetina (EqQ). As leituras foram realizadas em quintuplicata.

3.4.3 Açúcares solúveis totais

Para extração dos açúcares solúveis totais foi utilizado o protocolo proposto por Shannon (1968). Foram maceradas 300 mg de biomassa fresca de calos, de cada tratamento, em 2 mL da solução MCW (metanol: clorofórmio: água), na proporção de 12:5:3 v/v. Os extratos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. Após isso foi recolhido o sobrenadante, em seguida adicionado ao resíduo mais 2 mL da solução de MCW, centrifugado por 5 min, a 4000 rpm e, posteriormente o sobrenadante foi reunido ao da primeira extração, totalizando 4 mL de extrato. Para a diluição utilizou-se 1 mL do extrato em 9 mL de MCW. Na alíquota de 4 mL de extrato diluído foi

adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água, foi centrifugado formando duas fases sendo a fase aquosa (superior) recolhida e utilizada para reação de quantificação dos açúcares. Para o branco foi realizado o procedimento bifásico conforme descrito acima, sendo no lugar da amostra a solução de MCW.

A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit; Burris (1964). Aliquotas de 1 mL do extrato foram adicionadas a 2 mL de antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado). Em seguida, foram aquecidas em banho-maria, a 100 °C, por 3 min. Após, procedeu-se à leitura das amostras a 630 nm em espectrofotômetro (Bel Spectro LGS53). A quantificação dos açúcares solúveis totais foi realizada a partir da curva padrão de glucose com concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2= 0,996$). Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de biomassa seca. As leituras foram realizadas em quadruplicata.

3.4.4 Quantificação de luteína

Para determinação dos carotenoides foi utilizado o método descrito por Kuhnen *et al.* (2010), com modificações. Um grama de biomassa fresca foi macerado em 5 mL de metanol PA., após 1 hora de extração, na ausência de luz os extratos foram centrifugado a 4000 rpm, por 15 minutos a 25 °C. Em seguida foi recolhido sobrenadante e armazenado no freezer -20 °C. Para a quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, foi utilizado 1 mL do sobrenadante do extrato bruto, evaporado em rotavapor (Fisatom RPM), a 45 °C. Após a evaporação o extrato foi ressuspendido em 1 mL de hexano PA (Synth) e em seguida seco, em nitrogênio gasoso. As amostras secas foram ressuspendidas com hexano P.A (400 μL). Foi injetado 10 μL do extrato em hexano, para a quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (Shimzadu LC-10A), equipada com coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm) e pré-coluna (Vydac 218 GK54, 5 μm) com fase móvel, contendo metanol: acetonitrila (90:10 v/v), a uma vazão de 1.0 mL/min; o comprimento de onda e a temperatura do forno foram definidas para 450 nm e 25 °C. A identificação dos compostos de interesse foi realizada através da comparação com os tempos de retenção do composto padrão de luteína. Para o padrão de luteína foram usadas as concentrações de 2,5 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Consideraram-se as áreas dos picos de interesse para realizar

os cálculos de concentração. Os valores apresentados correspondem a 3 injeções por amostras. A concentração de carotenoides foi expressa em µg por g de biomassa seca.

3.4.5 Determinação da atividade antioxidante pela captura dos radicais livres utilizando o DPPH.

A atividade antioxidante foi mensurada em função da atividade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil – DPPH (Sigma – Aldrich®), de acordo com Kim *et al.* (2002), com modificações. A solução metanólica padrão de DPPH foi preparada a partir de 0,0079 mg de DPPH dissolvido em 2,5 mL de metanol PA. Alíquota de 500 µL de solução padrão de DPPH foi completada para 50 mL de metanol 80% em balão volumétrico. Após isso, a solução metanólica de DPPH foi ajustada até obter-se o valor absoluto de absorbância entre 0,500 e 0,600. A reação da atividade antioxidante foi realizada utilizando-se 100 µL do extrato de calos usado na quantificação dos flavonoides (item 3.4, Figura 8), aos quais foram adicionados 2,9 mL de solução metanólica de DPPH. As amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Para a leitura da absorbância, foi utilizado o espectrofotômetro UV-visível (UV-2000A, Instrutherm) a 530 nm. Os testes foram realizados em quintuplicata. A porcentagem da inibição do radical livre DPPH foi calculada através da seguinte equação: $DPPH (\%) = 100 \times [(A_0 - A_1)/A_0]$. Onde A_1 é a absorbância do extrato a 530 nm e A_0 é a absorbância da solução de DPPH sem extrato.

3.5 Preparo das amostras e análises químicas qualitativas e quantitativas realizadas nos experimentos sobre o estudo comparativo de sementes, pericarpo, folhas e calos quanto aos níveis de metabólitos secundários, atividade antioxidante, atividades biológicas e identificação dos tipos de moléculas.

Conforme demonstrado na Figura 9, os calos, folhas, pericarpos e sementes foram secos em estufa a 60 °C por 24h. Na extração hidroalcoólica realizada foram utilizadas, aproximadamente, 4 g de biomassa seca triturada manualmente, com 20 mL de álcool etílico 96%. As amostras permaneceram durante sete dias em imersão em álcool etílico. Após, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor à

45 °C. O procedimento citado acima foi realizado por 3 vezes, totalizando 21 dias de extração. Para os testes químicos de determinação dos fenólicos, flavonoides, assim como para a avaliação da atividade antioxidante, foi preparada uma solução etanólica na concentração de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

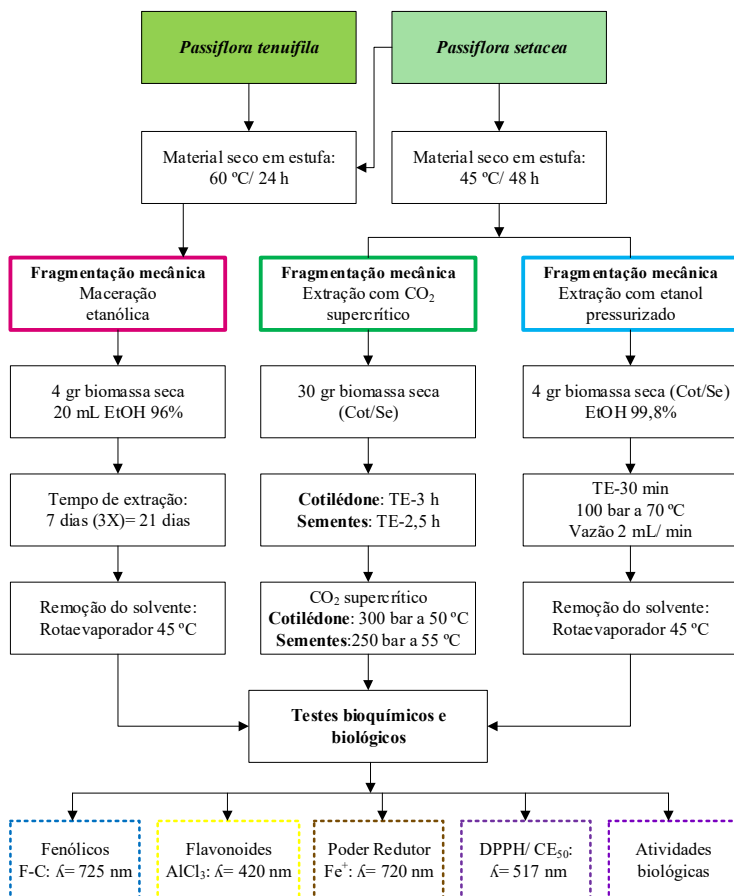


Figura 9. Fluxograma do processo de extração hidroetanólica, extração por fluido supercrítico, líquido pressurizado, análises bioquímicas e atividades biológicas do material vegetal das espécies de *P. tenuiflora* e *P. setacea*. Cot= cotilédone, Se= sementes. TE= tempo de extração.

3.5.1 Fenólicos totais

A metodologia seguida para a determinação de fenólicos totais nos extratos foi a descrita por Moresco *et al.* (2014). Uma solução etanólica de 500 μL de extrato bruto ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada em tubo de ensaio, contendo 5,0 mL de água destilada e 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu (Vetec). Após 3 minutos, foi adicionado 1 mL de uma solução de carbonato de sódio saturado, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por uma hora em temperatura ambiente, protegidas da luz. Para o branco da amostra foi utilizado uma mistura conforme descrito acima, sendo no lugar da amostra o álcool etílico. A leitura da absorbância das amostras foi realizada a 725 nm utilizando-se um espectrofotômetro de UV-visível (Perkin Elmer modelo Lambda 2S). A curva padrão foi preparada utilizando-se a solução de ácido gálico nas concentrações de 25 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2= 0,980$ a $0,998$). O teor de fenólicos totais das amostras foi expresso em mg de ácido gálico (AG) por g de extrato seco, que é igual a equivalência de ácido gálico (EqAG). Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.2 Flavonoides

A determinação de flavonoides nos extratos foi realizada em microplacas seguindo-se o método colorimétrico de cloreto de alumínio, descrito por Moresco *et al.* (2014). Em cada micropoço foram adicionados 50 μL de extrato bruto, na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 200 μL de álcool etílico P.A e 50 μL da solução etanólica de cloreto de alumínio 2%. Para o branco da amostra foram utilizados 50 μL de extrato bruto e 250 μL de álcool etílico. A placa foi incubada por 60 minutos a 25 °C. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas Bio Tek® Instruments, Winooski, USA (Biosystems modelo Synergy 2), pelo programa Gen5™ (versão 2,04), com a absorbância de 420 nm. Para a curva padrão foi utilizada a solução de quercetina (Sigma® - Q0125), nas concentrações 2,5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2= 0,977$ a $0,999$). O teor de flavonoides totais foi expresso em mg de quercetina (Q) por g de extrato seco, que é igual a equivalência de quercetina (EqQ). Os testes foram realizados em triplicata.

3.5.3 Determinação da atividade antioxidante

3.5.3.1 Captura dos radicais livres utilizando o método DPPH

A outra determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH foi realizado no CFM - UFSC, em leitora de microplacas baseando-se no método descrito por Moresco *et al.* (2012). O extrato foi confeccionado conforme o item 3.5, Figura 9. A mistura da reação usada consiste em 60 μL da solução do extrato vegetal ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em uma solução etanólica (100 μL) contendo o radical DPPH (4×10^{-3} g%), e 140 μL de álcool etílico. Para o controle da amostra ($\text{Abs}_{\text{branco}}$) foi utilizado 240 μL de álcool etílico e 60 μL da amostra vegetal. Já para o controle positivo ($\text{Abs}_{\text{controle}}$) foi utilizado uma solução contendo 100 μL de DPPH e 200 μL de álcool etílico. A mistura ficou incubada à 25 °C no escuro durante 30 minutos em espectrofotômetro de microplacas Bio Tek® Instruments, Winooski, USA (Biosystems modelo Synergy 2) pelo programa Gen5™ (versão 2,04) a 517 nm foi determinada a redução do radical DPPH. Todas as amostras, assim como o controle, foram avaliadas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação: $\text{AA}\% = 100 - [(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) / \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100$.

As amostras que atingiram a porcentagem de atividade acima de 50 foram submetidas ao cálculo da concentração do antioxidante necessário para reduzir o DPPH em 50% (CE_{50}). Os extratos que não atingiram 50% dá atividade antioxidante foram mencionados nas tabelas com sinal do hífen (-). Para o cálculo de CE_{50} foi realizado o mesmo teste descrito acima, porém utilizando-se de diferentes concentrações (2 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de extrato vegetal. Foram realizados 3 experimentos independentes de cada amostra selecionada e em triplicata, obtendo 3 equações da reta para obter o CE_{50} . O resultado foi expresso em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.5.3.2 Determinação do potencial redutor

A determinação do potencial redutor foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química (CFM), utilizando a metodologia de Moresco *et al.* (2012). Em placas contendo 96 poços, misturou-se 5 μL de extrato vegetal ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 195 μL de água deionizada e 50 μL de FeCl_3 (Vetec/Sigma-

Aldrich[®]) 0,1 M em HCl 0,1 M, a mistura foi agitada por 3 minutos, após os quais adicionou 50 µL de ferricianeto de potássio - 8×10^{-3} (Vetec/Sigma-Aldrich[®]). A reação foi incubada por 15 minutos, e em seguida realizada a leitura da absorbância da solução, a 720 nm. Esta determinação foi realizada em espectrofotômetro Bio Tek[®] Instruments, Winooski, USA (Biosystems modelo Synergy 2) pelo programa Gen5TM (versão 2,04) a 720 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para calcular o potencial redutor foi realizada uma curva padrão, utilizando-se soluções de ácido ascórbico nas concentrações de 100 a 800 µg.mL⁻¹ ($R^2 = 0,984$ a $0,998$). Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico (AA) por g de extrato seco, que é igual a equivalência de ácido ascórbico (EqAA).

3.6 Extração com Fluido Supercrítico (ESC) e Extração com Líquido Pressurizado (PLE).

Esse experimento foi realizado no sentido de avaliar a eficiência do método da extração supercrítica e por líquido pressurizado na extração dos metabólitos secundários. Os calos de cotilédone foram escolhidos por produzirem biomassa mais rapidamente, em quantidade suficiente à requerida para as análises, em menor espaço de tempo.

As extrações foram realizadas pela Dr^a. Simone Mazzutti e Dr. Luiz Gustavo Gonçalves Rodrigues no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica – LATESC do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, sob a coordenação da professora Dr^a. Sandra Regina Salvador Ferreira.

Para a extração supercrítica foi utilizado o procedimento dinâmico de extração, no qual ocorre a passagem contínua do solvente supercrítico, pela matriz sólida. O procedimento de extração se deu da seguinte maneira: o cilindro de CO₂ foi utilizado para alimentar a linha de extração, a linha de solvente foi imersa no banho termostático de maneira a manter a temperatura inferior a 0 °C, mantendo o CO₂ no estado líquido, antes de entrar na bomba. A bomba carregou o CO₂ pressurizado, até a linha de extração, passando pelo extrator. No vaso extrator foram misturadas esferas de vidro com aproximadamente 15 g de biomassa seca de calos de cotilédone de *P. setacea*. Para as sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila*, foram utilizadas aproximadamente 30 g de biomassa seca triturada. Utilizou-se para a extração 99,9% de dióxido de carbono puro, mantido à pressão de 300 bar, temperatura de 50 °C e

vazão de 0,7 kg por hora, sendo que as condições empregadas na operação de extração foram baseadas em estudos preliminares realizados por Oliveira *et al.* (2017). Cada extração foi conduzida num período de 3 horas (180 min), sendo os experimentos realizados em duplicata.

A extração com líquido pressurizado foi realizada utilizando a biomassa seca de calos oriundos de cotilédone e sementes das duas espécies de maracujás silvestres estudadas. Além disso, submetem-se as amostras extraídas com CO₂ supercrítico (resíduo) a uma nova extração como líquido pressurizado, integrando os processos e visando o completo aproveitamento dessas matérias primas. Alíquotas de 4 g de biomassa foram misturadas com esferas de vidro e, em seguida extraído com álcool etílico 99,8% (NEON, São Paulo, Brazil), nas condições de 70 °C com pressão de 100 bar, vazão de 2 mL por minutos, totalizando 30 minutos. Após a extração, os extratos resultantes da extração com líquido pressurizado foram mantidos em rotaevaporador, à 45 °C, e seco completamente com nitrogênio gasoso. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foram obtidos os seguintes tipos de extratos de calos de cotilédone: extrato resultante da extração supercrítica (ESC); extrato do resíduo da extração supercrítica, submetido à extração com líquido pressurizado (RESC) e extrato resultante da extração com líquido pressurizado (ELP).

3.7 Extração e análise dos compostos voláteis das culturas de calos *in vitro*.

A extração dos compostos voláteis das culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* cultivados *in vitro* e a posterior análise, por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, foi realizada no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica do Departamento de Química da UFSC (CFM) sob a supervisão do Professor Dr. Eduardo Carasek. A identificação dos compostos voláteis das amostras foi realizada sob supervisão da Dr^a. Dalila Venzke, deste mesmo departamento.

Os compostos voláteis foram extraídos, através da técnica de microextração em fase sólida (SPME), no modo *headspace*. A extração foi realizada com exposição da fibra (DVB/Car/PDMS 50/30 µm) ao *headspace* do frasco, aquecido a 25 °C, por 40 minutos. As extrações

foram realizadas em duplicata. O branco da amostra foi realizado somente com o meio de cultura.

Após esse período, os componentes voláteis extraídos pela fibra de SPME foram introduzidos no injetor do cromatógrafo gasoso, para dessorção térmica a 250 °C durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido semanalmente, durante 6 semanas do ciclo de cultura dos calos. Foram utilizadas duas repetições para cada tipo de calo.

A separação dos componentes voláteis dos diferentes tipos de calo da *P. setacea* e *P. tenuifila* foi realizada utilizando-se um instrumento Shimadzu QP2010 Plus, equipado com uma coluna DB5 (30m × 0,25 mm × 0,25 µm). A temperatura do forno foi programada de 40 °C a 240 °C a 5 °C / minuto com um período isotérmico inicial de 1 minuto. O hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL/min e o modo sem divisão foi usado, respectivamente. As temperaturas da fonte de íons e a interface foram 270 °C e 260 °C. Todas as análises foram realizadas em duplicata em cromatografia gasosa. A fonte de ionização foi mantida a 70 eV.

Os componentes foram identificados pela comparação de seus espectros de massa obtidos por CG-MS e com os da biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 05) e Adams (2007) e comparação dos valores de índices de retenção (IR), obtidos por injeção de mistura de séries de n-alcenos (C₆-C₁₇) e usando a equação relatada por Van den Dool-Kratz (1963). A porcentagem relativa foi calculada usando-se as áreas de pico individuais, para cada substância. Os picos para os componentes do meio de cultura e a fibra foram subtraídos das amostras de culturas de calos.

3.8 Extração e análise dos compostos do extrato hidroalcoólico por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS).

As análises de LC-ESI-MS/MS foram realizadas no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais (LACFI) do Departamento de Química da UFSC, com auxílio da Doutoranda Ana Paula Ruani e os Professores Dr. Luciano Vitali e Dr. Gustavo Amadeu Micke do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC).

A identificação dos componentes presentes nos extratos hidroetanólicos de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram mensurados de acordo com Schulz *et al.* (2017), por meio dos íons precursores, fragmentação e

tempo de retenção dos compostos fenólicos. Os extratos hidroalcoólicos (20 mg) foram dissolvidos em 200 μL de uma solução de ácido clorídrico (a pH 2,0), mantidos sob ultrassom, durante 15 min e submetidos à extração com 200 μL de éter etílico (três extrações sucessivas). Após centrifugação, a fase orgânica foi recolhida e evaporada com posterior ressuspensão da fração fenólica, em 100 μL de metanol 30% em água. As extrações foram realizadas em duplicata.

3.9 Determinação da atividade antimicrobiana e antiprotozoária.

Para determinação das atividades biológicas foram utilizados os extratos hidroalcoólicos preparados no CFM/UFSC, conforme o item 3.5.:

3.9.1 Atividade Antibacteriana

Este ensaio foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau - FURB, sob supervisão da professora Dr^a. Michele Debiasi.

A atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos dos pericarpos, sementes e folhas de *P. setacea* e *P. tenuifila* e das culturas de calos, de diferentes tipos de explante de *P. setacea*, foram testadas utilizando-se o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a última concentração de extrato capaz de inibir a presença de turbidez no micropoço. O teste foi realizado utilizando-se a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), através da técnica de microdiluição em caldo, em placas contendo 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012).

Os extratos hidroalcoólicos foram diluídos a 2 mg.mL^{-1} , em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e colocados nos primeiros poços da microplaca e em seguida transferidos para os micropoços adjacentes, os quais já continham caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações de amostra variando de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para viabilizar o crescimento das espécies, os microorganismos foram adicionados ao

caldo BHI durante 24 h a 37 °C e posteriormente semeados em ágar sangue (24 h a 37 °C), para a reativação das cepas bacterianas. O inóculo bacteriano, foi preparado na escala 0,5 de McFarland (5×10^5 UFC.mL⁻¹) e adicionado (5 µL) a cada micropoço. Alguns poços de cada microplaca foram reservados, para a realização do controle negativo (caldo (MH) + H₂O/DMSO 10% + bactéria em estudo) e para o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, em concentrações variando de 40 a 0,31 µg.mL⁻¹. Todo o procedimento foi realizado em triplicata e em capela de fluxo laminar.

As microplacas foram incubadas aerobicamente a 37 °C ± 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 µL de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (5 mg.mL⁻¹) em cada micropoço. Após duas horas foi observada a mudança de coloração do meio de cultura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a última concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano. As atividades antibacterianas observadas foram categorizadas, por Machado *et al.* (2005), da seguinte forma: (a) excelente atividade (CIMs < 10 µg.mL⁻¹); (b) boa atividade (10-100 µg.mL⁻¹); (c) moderada atividade (100-500 µg.mL⁻¹); (d) fraca atividade (500-1000 µg.mL⁻¹); e (e) inativo (> 1000 µg.mL⁻¹).

3.9.2 Atividade Antifúngica

O ensaio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, sob supervisão da professora Dr^a. Susana Johann.

A atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos dos pericarpos, sementes e folhas de *P. setacea* e *P. tenuiflora* e das culturas de calos, de diferentes tipos de explante, de *P. setacea* foi testada utilizando-se o método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a última concentração de extrato capaz de inibir a presença de turbidez no micropoço. O teste foi realizado utilizando-se os fungos: *Cryptococcus gattii* (ATCC 24065) (isolado referência da coleção da Universidade da Geórgia, Atlanta, GA); e *C. neoformans* (ATCC 24067); *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. krusei* (ATCC 20298), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e

Paracoccidioides brasiliensis - Pb18 (Coleção de Cultura da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose a 4 °C. Para os testes *in vitro*, foram realizados repiques sucessivos de cada um dos isolados em tubos contendo ágar Sabouraud Dextrose, os quais foram incubados a 37 °C durante 48 horas. Estes micro-organismos foram mantidos em freezer a -80 °C.

Para os ensaios *in vitro* foram coletadas colônias dos isolados cultivados e, então, ressuspendidas em tubos contendo solução salina (0,85%) estéril. A transmitância da amostra foi ajustada para 85% sob o comprimento de onda de 530 nm. Logo, foi realizada a diluição em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ajustando-se à concentração de leveduras a $1-5 \times 10^3$ células/mL, de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008).

Os ensaios foram realizados com os extratos que não apresentaram toxicidade no teste de PBMC, além do fluconazol e anfotericina. Os testes de CIM foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). Assim, os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640. Posteriormente 100 µL de cada diluição foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). O controle de crescimento e esterilidade foi constituído de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e como controle de toxicidade do solvente foi utilizado o meio RPMI, acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração correspondente, em cada experimento. O fluconazol foi incluído como controle positivo do antifúngico. O controle negativo foi composto por 200 µL de meio de cultura. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µL do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. As placas foram incubadas a 35 °C durante 72 horas e a leitura foi realizada visualmente, sendo que a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento, quando comparado ao crescimento do controle.

3.9.3 Determinação da atividade antiprotozoária

O ensaio para determinação da atividade antiprotozoária foi realizado no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, sob supervisão do Professor Dr. Mario Steindel e da Dr^a. Milene H. de Moraes.

3.9.3.1 *Leishmania amazonensis*

Para a avaliação da atividade leishmanicida foi utilizada cultura celular da forma promastigota de *L. amazonenses*, expressando a atividade como percentual de inibição da enzima β -galactosidase. A atividade leishmanicida foi testada com protocolo desenvolvido e validado por Tonini (2013). As culturas celulares da forma promastigota de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foram obtidas em meio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 5% (v/v) de soro bovino fetal inativado – SBF, 2% (v/v) de urina humana, 10 U.mL⁻¹ de penicilina e 10 μ g.mL⁻¹ estreptomicina. A cultura foi mantida a 26 °C em garrafas de cultura celular através de repiques semanais. Após diferenciação das células THP-1, as mesmas foram infectadas com clones de promastigotas de *L. amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase e incubadas por 24 horas, assim permitindo a transformação dos promastigotas em amastigotas. As células foram tratadas com 20 μ L dos extratos hidroalcoólicos, diluídos em meio de cultura, na concentração de 50 mg.mL⁻¹, as células foram incubadas por 48 horas a 34 °C e 5% de CO₂. Coletou-se o sobrenadante da cultura e foram acrescentados 250 μ L de PBS contendo o substrato Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) (100 μ M) e Nonidet P-40 (NP-40) 0,1% (v/v). Após 16 horas de reação a 37 °C, as leituras foram realizadas a 570 nm, com referência em 630 nm, em equipamento Tecan® Modelo Infinite M200. Como controle positivo foram utilizados a anfotericina B e como controle negativo foi utilizado o Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v).

O percentual de inibição (P.I.), para cada extrato testado, foi determinado de acordo com a seguinte equação: $P.I. = 1 - [(Abs_e - Abs_{be}) / (Abs_{cn} - Abs_{bcn})] \times 100$. Onde Abs_e é absorbância do extrato, Abs_{be} absorbância do branco do extrato, Abs_{cn} absorbância do controle negativo e Abs_{bcn} absorbância do branco do controle negativo. A concentração

inibitória do parasita (CI_{50}), foi realizada somente com os extratos que atingiram inibição superior a 50%.

3.9.3.2 *Trypanosoma cruzi*

A linhagem celular de leucemia monocítica aguda THP-1 (ATCC TIB202) foi mantida através de repiques, no 3º ou 4º dia de crescimento, sendo assim cultivada em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI-1640, na ausência de vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, EUA) e suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies, EUA), 12,5 mM de tampão HEPES, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina e 2 mM de Glutamax®, em temperatura de 33 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, essa cultura de células (4,0x10⁶ células/poço) foi acrescida de 100 ng.mL⁻¹ de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), durante 72 horas, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, a fim induzir a sua diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos (SCHWENDE *et al.*, 1996).

As formas tripomastigotas, derivadas de cultura de células de fibroblastos L929 infectadas, foram utilizadas para infectar as células de macrófagos THP-1 diferenciadas (4,0 x 10⁴ células/poço) em microplacas de 96 poços, numa proporção de parasitas/célula 3:1; e incubadas *overnight* a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. O meio contendo os parasitas não internalizados foi removido e substituído por 180 µL de meio de cultura fresco (BUCKNER *et al.*, 1996). O benzonidazol foi utilizado como controle positivo e DMSO como controle negativo. As culturas contendo parasitas foram tratadas com os extratos de calos, após 48 horas foram adicionados 50 µL de solução de MTT (10 mg.mL⁻¹) nos poços e incubação, a 26 °C por 6 horas. O sobrenadante foi removido e solubilizado com DMSO. A densidade óptica foi medida a 540 nm, em uma leitora de placas TECAN® Infinite M200. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata. O percentual de inibição (P.I.) foi calculado conforme equação citada acima.

3.10 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 a separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 95%. Foram também realizadas as análises de regressão linear e de correlação linear simples, para a determinação das equações das retas e dos valores de coeficientes de correlação linear (r) e dos coeficientes de determinação [$R^2 = (100) \cdot (r^2)$] (Gomez; Gomez, 1976). As análises estatísticas foram realizadas com os programas de estatística do EXCEL (Microsoft) e PAST – PALEontological STatistics, versão 3.21 (HAMMER *et al.* 2001).

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS DOS CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea* UTILIZADOS NAS ANÁLISES FITOQUÍMICAS E DE ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICA

A Figura 9 mostra que os calos originados de segmentos de caule de *P. tenuifila*, cultivados, tanto em frutose como em sacarose eram friáveis, mas apresentavam colorações diferentes. Os calos cultivados em frutose eram de coloração verde-claro e apresentaram leve perda da coloração, mostrando seções com tons bege, principalmente após 21 dias de exposição ao ácido salicílico. Em sacarose os calos de segmentos de caule de *P. tenuifila* não elicitados não diferiram na coloração e nem na textura, em relação aos calos elicitados, apresentando coloração bege, em todos os tratamentos. A exposição ao ácido salicílico não alterou as textura dos calos em frutose ou em sacarose.

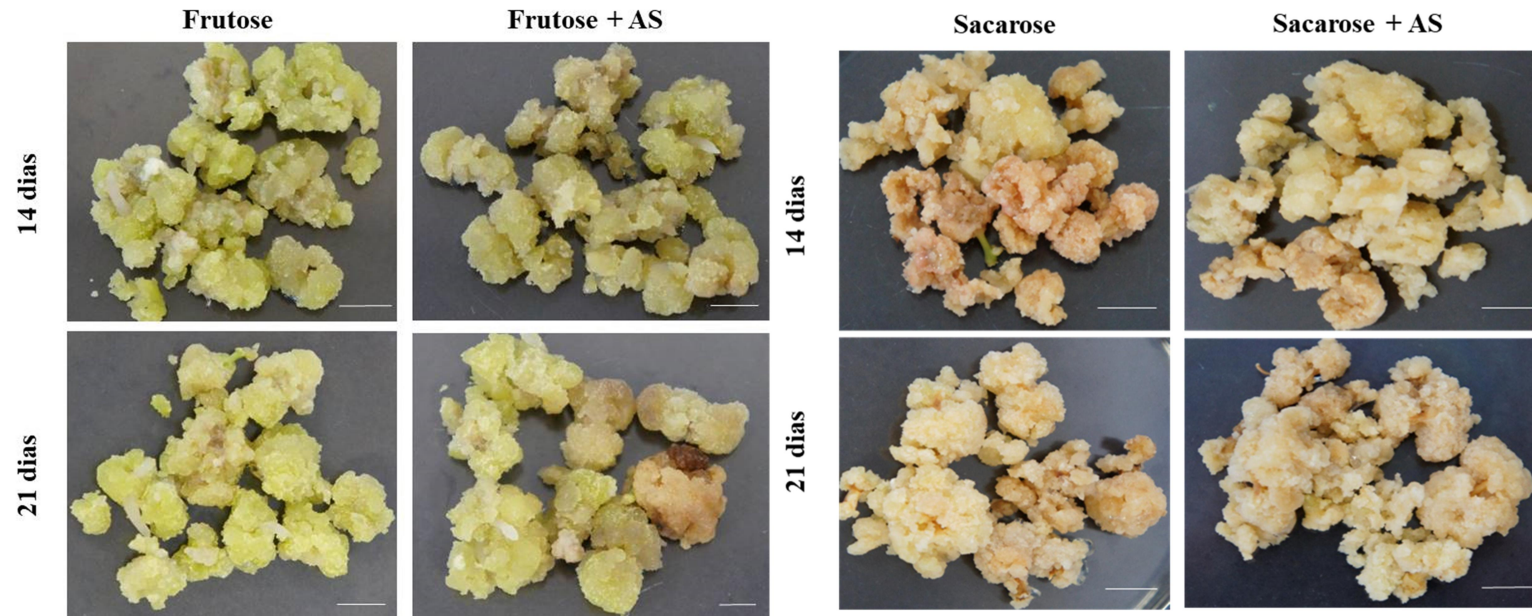


Figura 9. Calos de *Passiflora tenuiflora*, originados de segmentos de caule, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2,5 μM de ANA e 0,2 g. L⁻¹ de Phytigel, não elicitados (Frutose, Sacarose) ou elicitados com ácido salicílico (Frutose+AS; Sacarose+AS). Frutose: Barras= 1,0 cm e Sacarose: Barras= 0,5 cm.

A figura 10 mostra o aspecto dos calos originados a partir do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *P. tenuifila*. Os calos eram friáveis e apresentavam características embriogênicas e de regeneração de plantas e tiveram a cor alterada com o decorrer do tempo de cultivo.

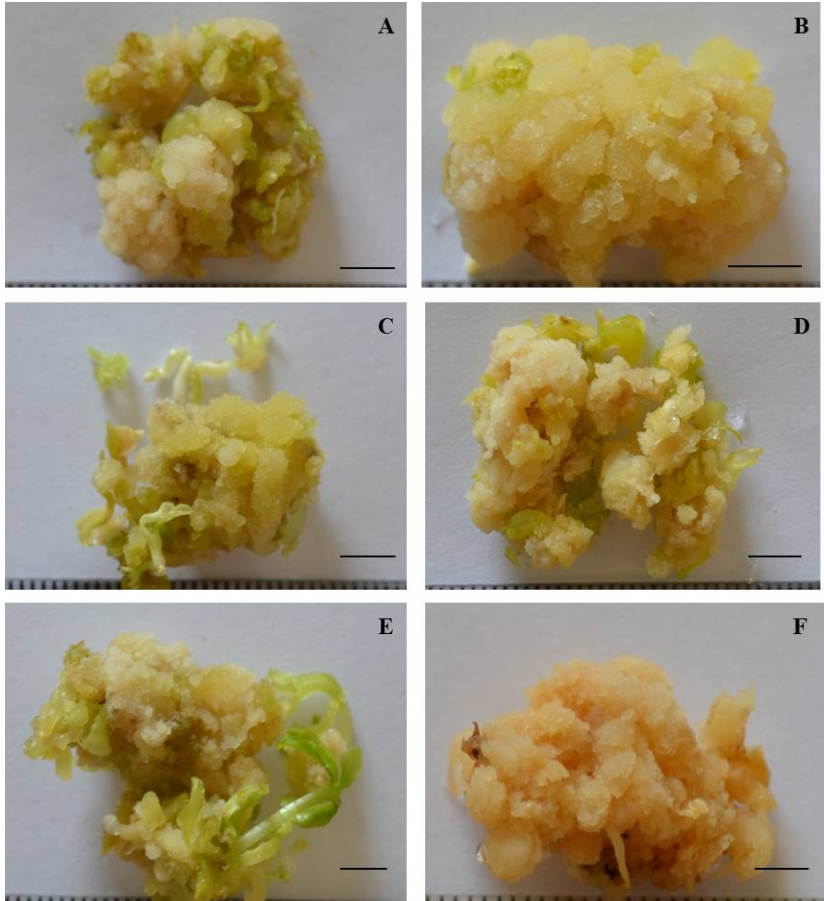


Figura 10. Calos originados a partir do cultivo de sementes imaturas, de frutos em desenvolvimento, de *P. tenuifila* em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel, com 45 dias (A-E) de cultivo e 90 dias (F) de cultivo. Barras= 5 mm.

Os tipos de calos produzidos a partir dos diferentes tipos de explantes de *P. setacea* estão representados nas figuras 11. Observa-se que os calos de nó foliar, cotilédone e nó cotiledonar, não elicitados, apresentavam coloração mais esverdeada, sendo que calos de cotilédone eram de coloração verde mais intensa, que os demais. Os calos de nó foliar, epicótilo e hipocótilo apresentavam setores verde-claro e bege e os calos de raiz eram totalmente amarelos. Quanto à textura, os calos de cotilédone eram os mais compactos e duros, enquanto que os demais calos tendiam a ser mais friáveis. Após 21 dias de elicitação, não foram observadas diferenças nas colorações dos calos, como pode ser observado nas figuras 11. Os calos de raiz e cotilédone eram mais compactos e duros, enquanto que os demais apresentavam características de calos friáveis. Não foram observados sinais de diferenciação de raízes ou ramos em nenhum dos tipos de calos de *P. setacea*. Não foram observadas alterações nas texturas dos calos entre os tratamentos, e nem em relação às texturas originais observadas no início do experimento.

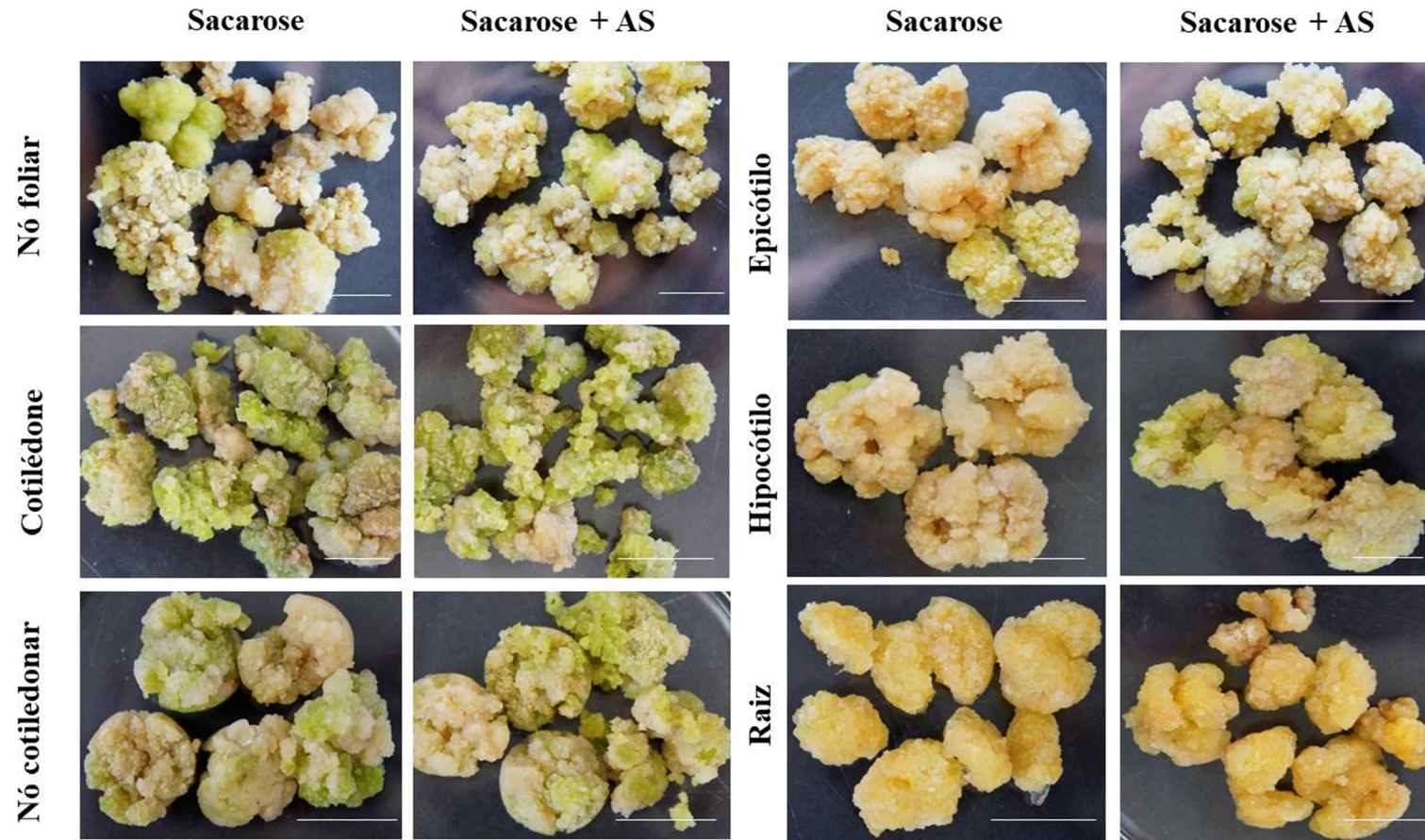


Figura 11. Calos de *Passiflora setacea*, originados de diferentes tipos de explantes de plântulas, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2 g.L^{-1} de Phytigel, não elicitados ou elicitados com ácido salicílico por 21 dias. Barras = 0,5 cm.

4.2 EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO, TIPO DE EXPLANTE, FONTE DE CARBONO E ÁCIDO SALICÍLICO NOS NÍVEIS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, LUTEÍNA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS EM CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea*.

4.2.1 *P. tenuifila*

Os resultados descritos a seguir foram obtidos através dos experimentos que visaram estabelecer os efeitos de tipos de explantes utilizados para a indução dos calos, tempo de cultivo, fontes de carbono e do tempo de exposição dos calos ao ácido salicílico, nos níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante e açúcares solúveis totais em calos de *P. tenuifila*.

4.2.2 Efeito do tipo de explante e do ácido salicílico em calos originados de sementes imaturas e de segmentos caulinares.

Os resultados na Figura 12 mostram os efeitos dos diferentes tipos de explante e da elicitação com ácido salicílico na produção de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante, açúcares solúveis totais e razão flavonoides/fenólicos pelas culturas de calos de *P. tenuifila*.

O tratamento com sacarose, sem elicitação, induziu o aumento da concentração de fenólicos totais nas culturas de calos oriundos de sementes imaturas ($1,7 \pm 0,2$ mg AG/g MS), em relação aos calos oriundos de segmentos de caule ($1,3 \pm 0,04$ mg AG/g MS) e aos demais tratamentos elicitados. Nos tratamentos com ácido salicílico, as culturas de calos oriundos de caule apresentaram maior teor de fenólicos totais ($0,8 \pm 0,11$ mg AG/g MS) quando comparadas aos calos originários de sementes imaturas ($0,6 \pm 0,02$ mg AG/g MS) (Figura 12A).

Os resultados obtidos a partir de diferentes tipos de calos, indicaram teor superior de flavonoides nas culturas de calos oriundas de sementes imaturas ($0,14 \pm 0,07$ mg Q/g MS), não elicitadas. Entre os tratamentos com ácido salicílico, os calos de sementes imaturas apresentaram concentração superior de flavonoides ($0,09 \pm 0,01$ mg Q/g MS), quando comparados aos calos de caule não elicitados ($0,06 \pm 0,005$

mg Q/g MS) e elicitados ($0,04 \pm 0,07$ mg Q/g MS). As culturas de calos de sementes elicitadas com ácido salicílico apresentaram um teor de flavonoides duas vezes maior àquele obtido pelas culturas de calos de caule (Figura 12B).

O maior teor de luteína foi observado nas culturas de calos de segmento caulinar ($271,1 \mu\text{g/g MS}$), em comparação aos calos de sementes imaturas ($155,2 \mu\text{g/g MS}$). Na presença de ácido salicílico, o conteúdo de luteína foi maior nos calos de caule ($51,4 \mu\text{g/g MS}$), em relação aos calos de sementes imaturas ($39,61 \mu\text{g/g MS}$). Ao se comparar os tipos de explantes, na ausência e presença de ácido salicílico, observa-se que, as culturas de calos de caule, na ausência de ácido salicílico foram superiores aos demais tratamentos (Figura 12C).

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos calos cultivados apenas em sacarose foi 4,5%, para os calos de caule e para sementes imaturas 26,9%. Não houve diferença entre as atividades antioxidantes dos extratos dos calos de sementes imaturas e de caule tratados com ácido salicílico, apesar de terem apresentado valores de 8,0% e 6,5%, respectivamente (Figura 12D).

Em sacarose, o maior teor de flavonoides por mg de fenólicos ocorreu nos calos de sementes imaturas (8,6%) em relação aos calos de caule (4,3%). Os calos de sementes imaturas elicitados com ácido salicílico atingiram 35,1% do conteúdo de flavonoides/fenólicos, sendo superior aos calos oriundos de segmentos de caule (5,6%), (Figura 12E).

As concentrações de açúcares solúveis totais, nas culturas de calos não elicitados com ácido salicílico, foram de $16,4 \pm 1,0$ mg/g MS nos calos de caule e $8,7 \pm 0,3$ mg/g MS nos calos de sementes imaturas. Contudo, foram os extratos de calos oriundos de caule cultivados apenas em sacarose que apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis (Figura 12F).

As análises de variância fatoriais 2×2 revelaram interação significativa entre tipo de explante e elicitação, para fenólicos ($F=30,28^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=57,84^{***}$, $p<0,001$), luteína ($F=14,25^{**}$, $p<0,01$), atividade antioxidante ($F=71,83^{***}$, $p<0,001$) e açúcares solúveis totais ($F=118,98^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 45 ANEXO A).

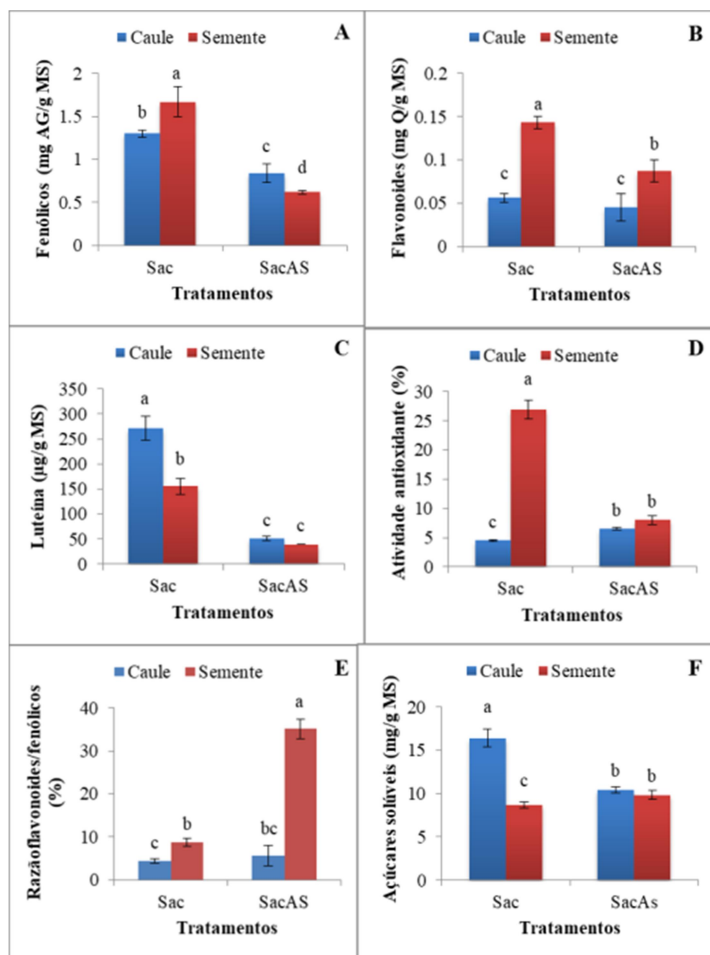


Figura 12. Efeito do tipo de explante e ácido salicílico nos conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), luteína (C), atividade antioxidante (D) razão flavonoides/fenólicos (E) e açúcares solúveis (F) de calos de *P. tenuiflora*. Os calos foram originados de segmentos de caules ou sementes e foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido naftalenoacético (caule) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (sementes), não elicitados (Sac) ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico (SacAS), por 21 dias. Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n= 5), exceto luteína (n= 3) e açúcares solúveis (n= 4). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,01).

4.2.3 Efeito de sacarose, frutose e do tempo de cultivo em calos originados de segmentos caulinares.

Como observado nos resultados do experimento descrito acima, os calos derivados da cultura de segmentos de caules apresentaram resultados inferiores de teores de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em relação aos calos de sementes imaturas. Entretanto, devido à maior disponibilidade de explantes de caule, para iniciar as culturas e à rapidez do processo de indução e produção de biomassa, esse tipo de calo foi escolhido para a realização dos experimentos posteriores, visando verificar a influência da sacarose e frutose na produção de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante e açúcares solúveis totais, em função do tempo de cultivo.

Nesse experimento foi monitorado o incremento em biomassa seca dos calos derivados de segmentos de caules, cultivados em meio de cultura contendo frutose ou sacarose, com o objetivo de se obter as curvas de crescimento, para a determinação do período de cultivo em que seria realizada a elicitação posterior com ácido salicílico (Figura 13).

A curva de crescimento, considerando os gráficos de biomassa seca e da razão biomassa seca e biomassa fresca em função do tempo de cultivo dos calos de *P. tenuifila* originados de segmentos de caules pode ser observada nas figuras 13A e 13B. Os valores de biomassa seca (Figura 13A) e a razão entre a biomassa seca/ biomassa fresca (Figura 13B), dos calos cultivados em sacarose, foram superiores, em todos os tempos de cultivo analisados (45, 60 e 75 dias), aos valores obtidos para os calos crescidos em frutose. Contudo, o acúmulo de biomassa seca pelos calos ocorreu de forma muito lenta, tanto em sacarose como em frutose.

Em ambas as fontes de carbono, os calos acumularam o máximo de biomassa seca (41 ± 4 mg /calo em frutose e 77 ± 4 mg /calo, em sacarose), ao redor de 45 dias, período em que foram utilizados para a realização dos experimentos de elicitação (Figura 13). Os experimentos, portanto não foram iniciados antes desse período devido à pequena biomassa produzida.

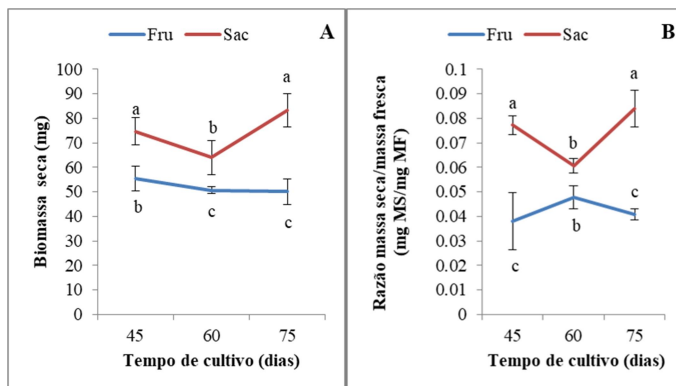


Figura 13. Variação em biomassa seca (A) e da razão entre massa seca e massa fresca (B), em função do tempo de cultivo de calos de *P. tenuifila* originados de segmentos de caules cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac) ou frutose (Fru), 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,5 μM de ácido naftalenoacético. Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n= 5). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os gráficos da Figura 14 ilustram as variações de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante e açúcares solúveis totais, com os tempos de cultivo de 50, 64 e 71 dias, de calos derivados de segmentos de caule cultivados em frutose ou sacarose. Verifica-se que, no tempo de 50 e 64 dias de cultivo, com frutose, o conteúdo de fenólicos cresceu de $7,2 \pm 0,3$ para $6,9 \pm 0,2$ mg AG/g MS, respectivamente. Após esse período, houve uma queda significativa nos teores de fenólicos das amostras testadas ($3,6 \pm 0,1$ mg AG/g MS), enquanto que, em sacarose, a maior concentração de fenólicos deu-se aos 50 dias cultivo ($2,7 \pm 0,08$ mg AG/g MS), diminuindo gradativamente no tempo de cultivo seguinte e estabilizando aos 71 dias (Figura 14A).

Aos 50 dias de cultivo, em sacarose ou frutose, obteve-se valores médios similares de flavonoides de $0,6 \pm 0,01$ e $0,7 \pm 0,05$ mg Q/g MS, respectivamente (Figura 14B). Porém, aos 64 e 71 dias de cultivo, as concentrações de flavonoides permaneceram maiores nos calos em frutose. Assim, após 50 dias de cultivo, os teores de flavonoides apresentaram decréscimo gradativo, atingindo o valor

superior de $0,6 \pm 0,005$ mg Q/ g MS, em frutose e $0,2 \pm 0,02$ mg Q/g MS, em sacarose (Figura 14B).

Os níveis de luteína nos calos cultivados nas fontes de carbono frutose ou sacarose, nos tempos de 50 e 64 dias de cultivo, não variaram, sendo de $88,7 \pm 12,6$ $\mu\text{g/g}$ MS e $81,9 \pm 5,8$ $\mu\text{g/g}$ MS, para sacarose e $84,5 \pm 2,8$ $\mu\text{g/g}$ MS e $84,9 \pm 3,0$ $\mu\text{g/g}$ MS, para frutose, respectivamente. Após 71 dias de cultivo, observou-se um aumento no conteúdo de luteína tanto nas culturas com frutose ($371,6 \pm 36,1$ $\mu\text{g/g}$ MS) como em sacarose ($271,1 \pm 23,7$ $\mu\text{g/g}$ MS), sendo o valor obtido para frutose superior (Figura 14C).

Os resultados obtidos em relação à atividade antioxidante, em função do tempo de cultivo de calos originados de segmentos de caules suplementados com frutose, foram maiores do que em sacarose, sendo o maior valor de potencial antioxidante detectado de 58,6 %, não havendo variação significativa no decorrer do tempo de cultivo. Já para sacarose, os tempos de 50 e 64 dias de cultivo foram os que apresentaram atividade antioxidante moderada com 17,4% e 25,2 %, respectivamente, sendo que as culturas reduziram drasticamente a sua capacidade de capturar o radical livre DPPH, aos 71 dias de cultivo (4,53%) (Figura 14D).

A proporção de flavonoides/fenólicos nas culturas de calos de caule foi de 27% em sacarose, nos tempos de 50 e 64 dias. Após esse período, a razão decaiu atingindo 6%. Para frutose, os valores ficaram em torno de 8% nos níveis de flavonoides/fenólicos, caindo para 5,8% (Figura 14E).

As concentrações de açúcares solúveis totais presentes em calos crescidos em sacarose foram maiores, em relação à frutose, em todos os tempos de cultivo, variando em ordem decrescente, em relação ao tempo de cultivo e, sendo de $32,7 \pm 3,8$ mg /g MS (aos 50 dias), $27,0 \pm 2,4$ mg /g MS (aos 64 dias) e $16,4 \pm 1,0$ mg /g MS (aos 71 dias). Em frutose, observou-se que, os níveis de açúcares solúveis nos calos foram menores, mas não diferiram significativamente entre si, apesar de variarem em ordem crescente de produção aos 50, 64 e 71 dias ($7,9 \pm 0,9$ mg /g MS, $8,5 \pm 0,4$ mg /g MS e $9,3 \pm 0,9$ mg /g MS respectivamente) (Figura 14F).

As análises de variância fatoriais 2x2 revelaram interação significativa entre os fatores fonte de carbono e tempo de cultivo, para fenólicos ($F=199,15^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=5,37^*$, $p<0,05$), luteína ($F=5,99^*$, $p<0,05$), atividade antioxidante ($F=105,33^{***}$,

$p < 0,001$), açúcares solúveis totais ($F = 13,66^{***}$, $p < 0,001$) (Tabela 46 ANEXO A).

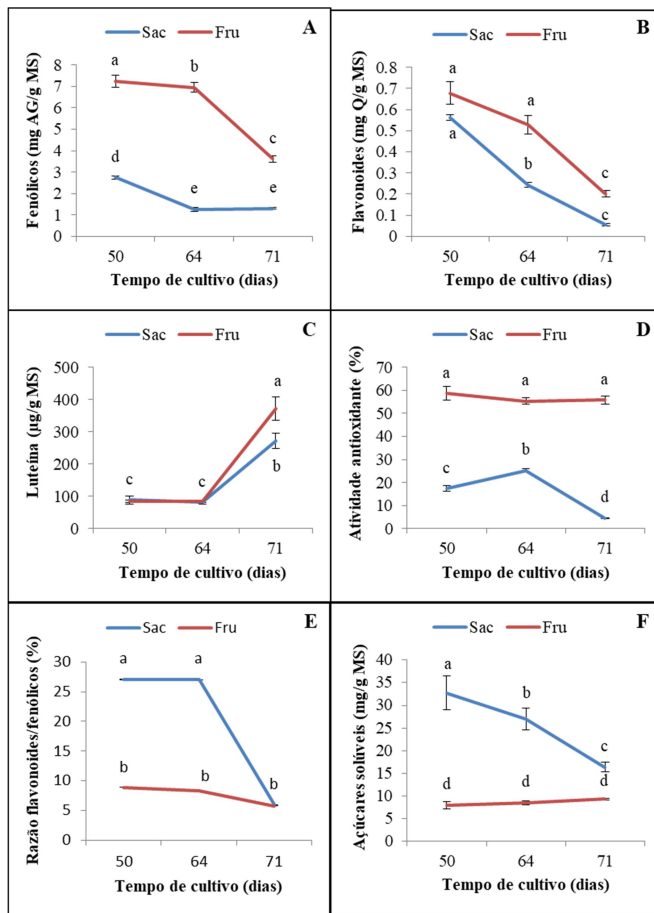


Figura 14. Efeito do tempo de cultivo e fontes de carbono nos conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), luteína (C), atividade antioxidante (D), razão flavonoides/fenólicos (E) e açúcares solúveis (F) de calos de *P. tenuifila* originados de segmentos de caules cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac) ou frutose (Fru), 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,5 µM de ácido naftalenoacético. Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n= 5), exceto para luteína (n= 3) e açúcares solúveis (n= 4). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.3.1 Efeito do tempo de exposição ao ácido salicílico em calos originados de segmentos caulinares cultivados em frutose ou sacarose.

Os resultados apresentados na Figura 15 mostram o efeito dos tempos de exposição dos calos, cultivados em sacarose ou frutose, ao ácido salicílico, por 14 e 21 dias. Observa-se que, em frutose, o tempo de 21 dias de exposição dos calos ao ácido salicílico aumentou, significativamente, o teor de fenólicos totais ($9,3 \pm 0,37$ mg AG/g MS), quando comparado ao controle em frutose, não elicitado ($3,6 \pm 0,16$ mg AG/g MS) e aos demais tratamentos (Figura 15A).

As maiores concentrações de flavonoides ocorreram nos calos cultivados em frutose, tanto no tratamento de exposição ao ácido salicílico, por 14 dias ($0,5 \pm 0,03$ mg Q/g MS) quanto no controle correspondente, não elicitado ($0,5 \pm 0,04$ mg Q/g MS), não havendo diferença estatística entre os tratamentos. O tempo de exposição ao ácido salicílico em calos suplementados com sacarose promoveu redução de flavonoides (Figura 15B).

Os resultados da Figura 15C indicam que os teores de luteína, dos calos em sacarose ou frutose, após 21 dias, aumentaram quando não exposto ao ácido salicílico.

A maior atividade antioxidante foi observada em extratos de calos cultivados com frutose e expostos ao ácido salicílico por 21 dias (74,17%), enquanto que no controle correspondente, não elicitado, foi de 55,75%, coincidindo com a maior concentração de fenólicos totais nos calos (Figura 15A). Em sacarose a maior atividade antioxidante foi observada no controle não elicitado do tratamento de 14 dias de exposição (25,23%). Os calos tratados com ácido salicílico, aos 14 e 21 dias, não apresentaram potencial antioxidante. A comparação entre os efeitos da frutose e sacarose, na atividade antioxidante dos extratos de calos, indica que, tanto nos calos não elicitados como nos elicitados com ácido salicílico, independente do tempo de exposição, a atividade antioxidante, em frutose, foi superior à observada em sacarose, em todos os tratamentos ($p < 0,01$).

O maior valor de razão flavonoides/fenólicos de 19,4% foi observado nos calos cultivados em sacarose, no controle do tratamento de 14 dias de exposição ao ácido salicílico. Em frutose, a exposição dos calos por 14 dias ao ácido salicílico apresentou maior razão de flavonoides/fenólicos totais foi de 8,2% e não diferiu do controle correspondente (7,6%). Aos 21 dias de cultivo, as proporções de

flavonoides presentes nos extratos permaneceram constantes nos calos cultivados em sacarose (4,3%), frutose (5,5%), do controle e tratados com ácido salicílico (6,4%), exceto nos calos cultivados em frutose, com ácido salicílico, que apresentaram o menor valor 1,5% (Figura 15E).

A figura 15F mostra que os maiores níveis de açúcares solúveis totais foram observados nos calos cultivados em sacarose, controle do tratamento de 14 dias ($27,01 \pm 2,4$ mg /g MS) e 21 dias sem exposição ao ácido salicílico. A presença do ácido salicílico inibiu a síntese de açúcares solúveis totais nos demais tratamentos avaliados.

A frutose em combinação com a exposição dos calos, por 21 dias, ao ácido salicílico promoveu significativamente os níveis de fenólicos totais e atividade antioxidante, em relação à sacarose e em relação aos calos de sementes imaturas. O ácido salicílico teve efeito inibitório sobre a produção de luteína, nos calos expostos por 21 dias.

As análises de variância fatoriais 2x2, para os tratamentos do controle não elicitados, revelaram interação significativa entre tipo de fonte de carbono e tempo de exposição ao ácido salicílico, para fenólicos ($F=496,45^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=33,29^{***}$, $p<0,001$), para luteína ($F=5,73^*$, $p<0,05$), para atividade antioxidante ($F=368,21^{***}$, $p<0,001$) e para açúcares solúveis totais ($F=46,79^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 47, ANEXO A).

Para os tratamentos elicitados, as análises fatoriais mostraram interação significativa entre o tipo de fonte de carbono e tempo de exposição ao ácido salicílico para fenólicos ($F=281,68^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=220,58^{***}$, $p<0,001$) e atividade antioxidante ($F=12,56^{**}$, $p<0,01$) (Tabela 48, ANEXO A). Para luteína e açúcares solúveis totais as interações não foram significativas, havendo, para luteína, apenas o efeito isolado do fator fonte de carbono ($F=38,04^{***}$, $p<0,001$) e para açúcares solúveis, apenas o efeito dos fatores isolados, fonte de carbono ($F=373,81^{***}$, $p<0,001$) e tempo de exposição ao ácido salicílico ($F=149,50^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 48, ANEXO A).

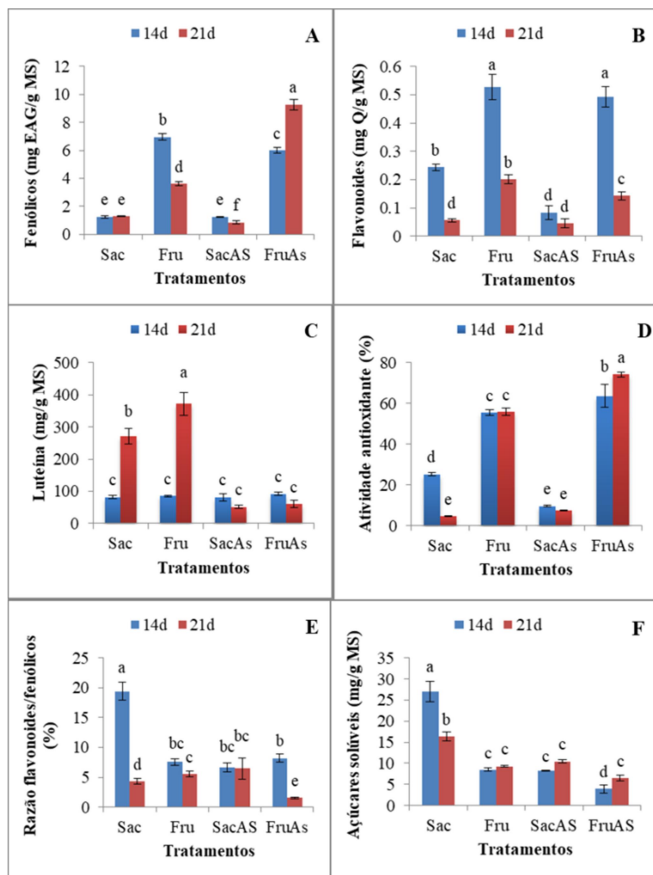


Figura 15. Efeito do tempo de exposição ao ácido salicílico e fontes de carbono nos conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), luteína (C), atividade antioxidante (D), razão flavonoides/fenólicos (E) e açúcares solúveis (F) de calos de *P. tenuifolia* originados de segmentos de caules cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac) ou frutose (Fru), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 μM de ácido naftalenoacético, não elicitados (Sac, Fru) ou elicitados com 145 μM de ácido salicílico (SacAS, FruAS), por 14 dias (14d) ou 21 dias (21d). Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n= 5), exceto luteína (n= 3) e açúcares solúveis totais (n= 4). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.2.3.2 Correlação entre os níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína e atividade antioxidante dos calos originados de segmentos caulinares.

A análise de correlação linear entre a atividade antioxidante e fenólicos totais dos extratos metanólicos dos calos de *P. tenuifila*, cultivados em meio de cultura contendo frutose e elicitados com ácido salicílico foi moderada ($r= 0,674$; $p<0,05$), (Tabela 3). Entretanto, as correlações entre a atividade antioxidante e flavonoides e luteína foram altas, mas negativas ($r= -0,736$ e $r= -0,705$; $p<0,05$, respectivamente). Estas correlações demonstram que a atividade antioxidante dos calos mantidos na presença de frutose, variaram em relação inversa com o aumento nas concentrações de flavonoides e luteína.

Tabela 3. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre atividade antioxidante e fenólicos totais, flavonoides e luteína de extratos de calos de *P. tenuifila*, originados de segmentos de caules cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido naftalenoacético, não elicitados ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Parâmetro	Tratamento	Coeficiente de correlação linear (r) ^x	
		Frutose	Sacarose
AA x fenólicos totais	Controle	0,194	0,116
	AS	0,674*	0,906**
AA x flavonoides	Controle	0,399	0,448
	AS	-0,736*	0,857**
AA x luteína	Controle	-0,493	0,371
	AS	-0,705*	0,984**

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 10 amostras (n= 10, n-2 = 8 g.l.) para os tratamentos com ácido salicílico e para 15 amostras (n= 15, n-2= 13 g.l.), para os tratamentos de controle. (*)= $p<0,05$; (**) = $p<0,01$. AA= atividade antioxidante. AS= ácido salicílico.

Em sacarose, nas culturas de calos elicitadas com ácido salicílico, as correlações lineares entre a atividade antioxidante e as concentrações de fenólicos totais, flavonoides e luteína foram altas e positivas ($r= 0,906$; $r= 0,857$ e $r= 0,984$; $p<0,01$, respectivamente).

4.2.4 *P. setacea*

Os resultados descritos abaixo foram obtidos a partir dos experimentos para determinar os efeitos de diferentes tipos de explantes, concentrações de ácido salicílico e de fontes de carbono nos níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína e atividade antioxidante em calos de *P. setacea*.

4.2.5 Efeito da elicitação com ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes cultivados em sacarose.

Os gráficos da Figura 16 mostram como variaram os níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína, atividade antioxidante e açúcares solúveis totais em calos de *P. setacea* originados de diferentes tipos de explantes, não elicitados ou elicitados, por 21 dias com ácido salicílico e cultivados em sacarose.

A Figura 16A mostra que o maior teor de fenólicos totais foi detectado na presença de ácido salicílico, em culturas de calos originados de segmentos de cotilédone ($3,7 \pm 0,06$ mg AG/g MS), valor 1,13 vezes maior do que o observado na ausência do elicitor. Os calos de cotilédone, tanto elicitados como não elicitados apresentaram concentrações de fenólicos totais superiores em relação aos demais tipos de calos analisados. O ácido salicílico promoveu a biossíntese de fenólicos totais, em relação ao controle, não elicitado, em todos os tipos de calos, exceto em calos de raiz, em que inibiu a biossíntese, uma vez que no controle foram produzidos $2,7 \pm 0,11$ mg AG/g MS e, na presença de ácido salicílico, apenas $1,7 \pm 0,03$ mg AG/g MS. Em calos de epicótilo, o ácido salicílico aumentou 5,2 vezes a concentração de fenólicos totais, enquanto que nos calos hipocótilo, nó cotiledonar e nó foliar os aumentos foram de 1,84; 2,18 e 1,15 vezes o valor observado nos controles, não elicitados.

As concentrações de flavonoides nos calos não elicitados variaram entre $0,1 \pm 0,006$ mg Q/g MS, para hipocótilo e $0,3 \pm 0,04$ mg Q/g MS, para nó foliar. Já os calos elicitados apresentaram teores de flavonoides que variaram entre $0,1 \pm 0,03$ mg Q/g MS (calos de hipocótilo) e $0,1 \pm 0,02$ mg Q/g MS (calos de epicótilo) e $0,3 \pm 0,02$ mg Q/g MS (calos de cotilédone) (Figura 16B). A maior concentração de flavonoides ocorreu no tratamento com ácido salicílico, em calos oriundos de cotilédone ($0,3 \pm 0,02$ mg/g MS), havendo diferença

estatística significativa ($p < 0,01$), em relação ao controle correspondente, não elicitado e em relação aos demais tipos de calos, elicitados ou não (Figura 16B). Nos demais tipos de calos, a adição do ácido salicílico não teve efeito sobre a produção dos flavonoides, sendo os resultados obtidos para os tratamentos elicitados similares ao controle, como observado na cultura de calos de segmentos de raiz (0,2 e 0,2 mg Q/g MS), hipocótilo (0,1 e 0,1 mg Q/g MS), nó cotiledonar (0,1 e 0,2 mg Q/g MS) e epicótilo (0,1 e 0,1 mg Q/g MS).

As concentrações de luteína, carotenoide majoritário detectado nos extratos dos calos, variaram entre 16,61 e 705,36 $\mu\text{g/g MS}$, respectivamente, em calos de hipocótilo e de cotilédone, não elicitados (Figura 16C). Porém, entre os calos elicitados, os teores de luteína variaram entre 25,92 e 1453,41 $\mu\text{g/g MS}$, respectivamente, em calos de hipocótilo e de nó cotiledonar. O maior teor de luteína ocorreu em cultura de calos de nó cotiledonar, na presença do ácido salicílico, valor 39,5 vezes maior que o controle correspondente, não elicitado. O ácido salicílico promoveu a produção de luteína apenas em calos de nó cotiledonar (1453,4 $\mu\text{g/g MS}$), cotilédone (1111,4 $\mu\text{g/g MS}$) e epicótilo (379,8 $\mu\text{g/g MS}$), porém reduziu os teores de luteína nos calos de raiz (228,2 $\mu\text{g/g MS}$) e nó foliar (46,4 $\mu\text{g/g MS}$) e não alterou os níveis de luteína, nos calos de hipocótilo (25,9 $\mu\text{g/g MS}$).

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos calos não elicitados variou entre 12,97% (calos de epicótilo) e 29,52% (calos de nó foliar). Entre os calos elicitados esses valores variaram entre 15,62% (calos de epicótilo) e 43,51% (calos de cotilédone) (Figura 16D). Os calos elicitados de cotilédone apresentaram o maior valor de atividade antioxidante, (43,51%), coincidindo com as maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides. O tratamento com o ácido salicílico promoveu a atividade antioxidante em todos os tipos de calos. Os maiores aumentos na atividade antioxidante, com a elicitação, foram observados em calos raiz, 2,42 vezes em relação ao controle, seguidos pelos calos de hipocótilo, 1,76 vezes; nó cotiledonar, 1,6 vezes; cotilédone, 1,5 vezes; nó foliar, 1,19 vezes e epicótilo, 1,2 vezes. As porcentagens de inibição do DPPH, abaixo de 30 %, entre os calos elicitados, foram observadas nas culturas de calos de epicótilo (15,62%), hipocótilo (28,61%), nó cotiledonar (25,54%) e na cultura de calos de caule elicitados (15,62%).

A média da razão flavonoides/fenólicos nas culturas de calos de diferentes tipos de explantes foi maior nos calos não elicitados de epicótilo ($32,0 \pm 5,5 \text{ mg/g MS}$) (Figura 16E). Os calos não elicitados

apresentaram os maiores valores de razão flavononoides/fenólicos totais em relação aos calos elicitados, com exceção dos calos de raiz e cotilédone tratados com ácido salicílico.

Os maiores teores de açúcares solúveis totais ocorreram em calos oriundos de segmentos de cotilédones e epicótilo, na presença de ácido salicílico, sendo o dobro do valor apresentado na ausência do elicitador (Figura 16F). Dentre as culturas analisadas, o ácido salicílico promoveu o acúmulo de açúcares solúveis totais, exceto nos calos de raiz e de nó foliar.

As análises de variância fatoriais 2x2 revelaram interação significativa entre os fatores tipo de explante e elicitação para fenólicos ($F=600,51^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=9,64^{***}$, $p<0,001$) , luteína ($F=81,56^{***}$, $p<0,001$) , atividade antioxidante ($F=88,87^{***}$, $p<0,001$) , açúcares solúveis totais ($F=433,78^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 49, ANEXO A).

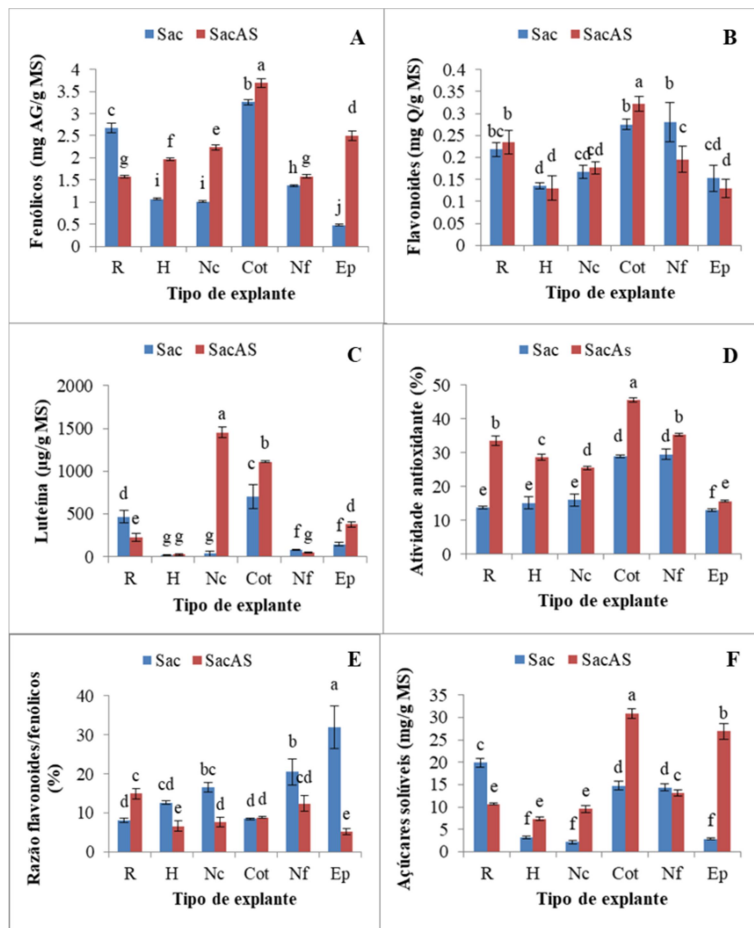


Figura 16. Conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), luteína (C), atividade antioxidante (D), razão flavonoides e fenólicos (E) e açúcares solúveis (F) de calos de *P. setacea* originados de diferentes explantes cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicitados (Sac) ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico (SacAS), por 21 dias. Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n= 5), exceto luteína (n= 3) e açúcares solúveis totais (n= 4). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05). R= raiz, H= hipocótilo, Nc= nó cotiledonar, Cot= cotilédone, Nf= nó foliar, Ep= epicótilo. MS= massa seca.

4.2.2.3 Efeito de concentrações de ácido salicílico em calos oriundos de segmentos cotiledonares.

Os calos de cotilédone foram selecionados para testar se as concentrações de ácido salicílico maiores do que 145 μM , poderiam ter efeito promotor ainda maior na produção de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos calos crescidos em sacarose. As concentrações de ácido salicílico testadas nesses experimentos variaram entre 0 e 2320 μM e os resultados obtidos estão representados na figura 14. A análise de variância com um fator indicou diferença significativa entre as concentrações de ácido salicílico para fenólicos ($F=153,98^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=63,14^{***}$, $p<0,001$), atividade antioxidante ($F=271,25^{***}$, $p<0,001$).

O maior teor de fenólicos totais foi produzido pelos calos de cotilédone elicitados com 145 μM de ácido salicílico ($6,7 \pm 0,45$ mg AG/g MS), que foi cerca de 1,5 vezes maior comparado ao controle (Figura 17A). Nas demais concentrações 290, 580, 1160 e 2320 μM de ácido salicílico, as concentrações de compostos fenólicos decresceram progressivamente.

Quando as células foram estimuladas com 145 μM de ácido salicílico, o maior teor de flavonoides foi de $0,3 \pm 0,03$ mg Q/g MS, havendo um aumento de 1,3 vezes em relação ao controle não elicitado. A quantidade de flavonoides produzida pelas culturas de calos, sem adição do ácido salicílico, foi igual a dos calos tratados com 2320 μM de ácido salicílico ($0,2 \pm 0,06$ mg Q/g MS). As concentrações de 290, 580 e 1160 μM de ácido salicílico reduziram os níveis de flavonoides nas culturas (Figura 17B).

Usando o ensaio DPPH, o extrato metanólico das culturas de calos tratadas com 145 μM de ácido salicílico elevou a capacidade de captação de radicais livres, com $43 \pm 1,8\%$, enquanto que as menores capacidades antioxidantes foram encontradas nas culturas não tratadas com ácido salicílico ($29 \pm 2,5\%$) ou tratadas com 290 μM ($20 \pm 0,4\%$), 580 μM ($17 \pm 1,7\%$), 1160 μM ($3 \pm 0,0\%$) e 2320 μM ($27 \pm 4,8\%$). (Figura 17C).

Ao relacionar os resultados de atividade antioxidante com a quantidade de fenólicos totais e flavonoides observa-se que, em calos de cotilédone, a concentração de 145 μM de ácido salicílico promoveu os maiores valores de atividade sequestradora de radicais livres DPPH e as maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides.

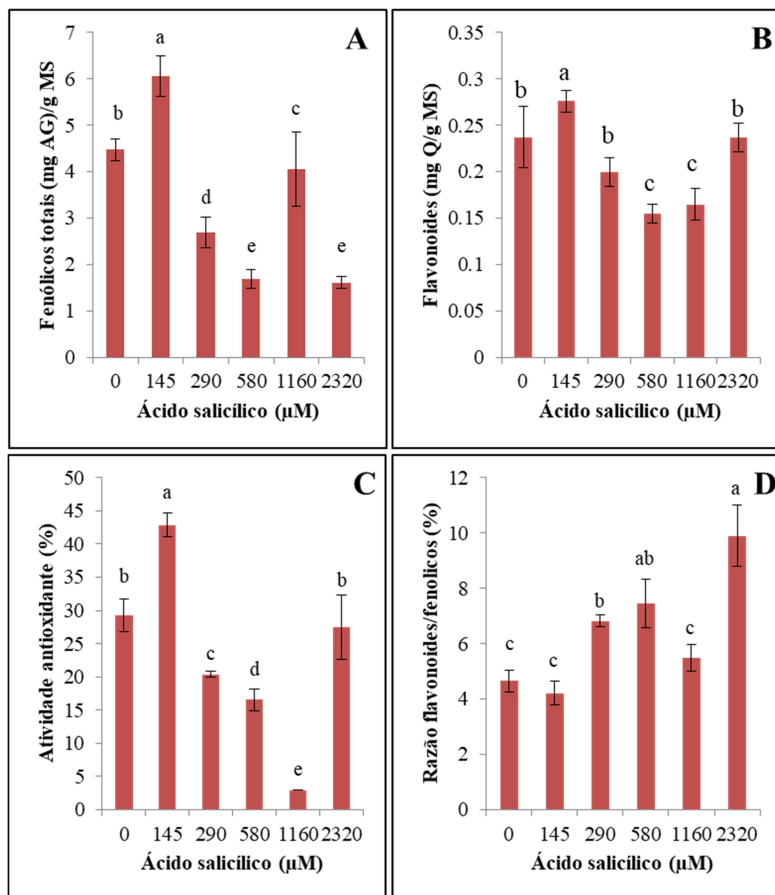


Figura 17. Efeito do ácido salicílico na razão entre os conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), atividade antioxidante (C) e razão entre flavonoides e fenólicos totais (D) de calos de *P. setacea* originados de segmentos de cotilédones cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac), g.L^{-1} de Phytigel, 2,5 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, elicitados com diferentes concentrações de ácido salicílico, por 21 dias. Valores são médias \pm desvio padrão de dez repetições por tratamento (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05). MS= massa seca.

A Figura 17D mostra que o maior valor de razão entre os teores de flavonoides e fenólicos totais ocorreu quando os calos de cotilédone foram tratados com ácido salicílico nas concentrações de 2320 μM ($9,9 \pm 2,54\%$), 580 μM ($7,5 \pm 0,86\%$) e 290 μM ($6,8 \pm 0,90\%$), ao mesmo tempo em que as menores razões foram $5,5 \pm 2,64\%$ (na concentração 1160 μM), $3,6 \pm 0,90\%$ (na concentração de 145 μM) e $4,6 \pm 0,40\%$ (sem adição de ácido salicílico).

4.2.2.4 Efeito de concentrações de ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes.

Observa-se que, para as culturas de calos oriundas de hipocótilo e cotilédone, o máximo de fenólicos produzidos foi na concentração de 145 μM de ácido salicílico, $3,3 \pm 0,25$ mg AG/g MS e $5,9 \pm 0,50$ mg AG/g MS, respectivamente (Figura 18A). Os calos de nó cotiledonar apresentaram maior teor de fenólicos totais, na ausência de ácido salicílico, que foi de $3,7 \pm 0,31$ mg AG/g MS. Quando comparados os valores de fenólicos totais dos controles com seus respectivos tratamentos verifica-se que nos calos de nó cotiledonar o ácido salicílico inibiu a produção de fenólicos totais, nas concentrações de 580 μM . Já nos calos de cotilédone houve um aumento do teor de fenólicos totais, até 145 μM e depois um declínio na medida em que as concentrações de ácido salicílico foram aumentando.

A produção de flavonoides nos calos de hipocótilo aumentou com a adição de 290 μM de ácido salicílico ($0,2 \pm 0,01$ mg Q/g MS) (Figura 18B). Nos calos de nó cotiledonar o teor de flavonoides foi maior com o tratamento de 580 μM ($0,2 \pm 0,02$ mg Q/g MS), mas esse valor não diferiu estatisticamente do obtido com 290 μM de ácido salicílico e nos calos de cotilédone, com 145 μM ($0,3 \pm 0,01$ mg Q/g MS) de ácido salicílico, quando comparados aos respectivos controles

Como mostra a Figura 18C, nos calos de hipocótilo houve um aumento da atividade antioxidante quando submetidos à concentração de 290 μM e 580 μM ($22 \pm 0,60\%$). Já para os calos de nó cotiledonar a maior atividade antioxidante foi detectada no tratamento com 290 μM de ácido salicílico ($21 \pm 0,42\%$) e nos calos de cotilédone o foi observado na concentração de 145 μM ácido salicílico ($43 \pm 1,85\%$), quando as culturas foram expostas a maiores concentrações de ácido salicílico houve um decréscimo no potencial antioxidante.

As análises de variância fatoriais 2x2 entre os fatores concentração de ácido salicílico e tipo de explante indicaram interação significativa para fenólicos ($F=194,05^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=99,02^{***}$, $p<0,001$), atividade antioxidante ($F=435,34^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 50, ANEXO A).

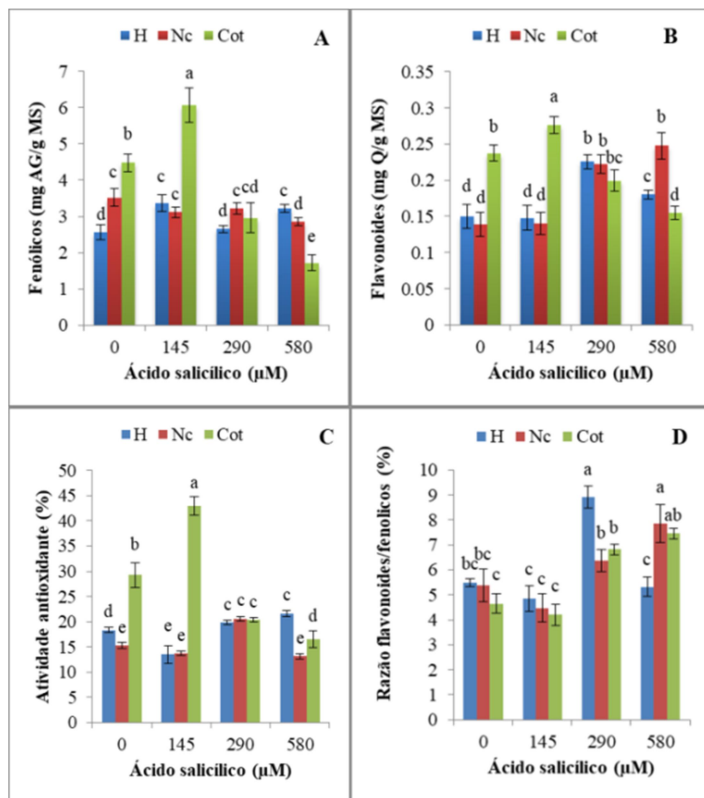


Figura 18. Efeito do ácido salicílico nos conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), atividade antioxidante (C) e razão entre flavonoides e fenólicos (C) de extratos de calos de *P. setacea* originados de segmentos de hipocótilo (H), nó cotiledonar (Nc), cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, elicitados com diferentes concentrações de ácido salicílico, por 21 dias. Valores são médias ± desvio padrão de 10 repetições por tratamento (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ($p<0,05$). MS= massa seca.

Os maiores valores de razão entre os teores de flavonoides e fenólicos totais foram observados, para os calos de hipocótilo ($8,9 \pm 0,45\%$), na concentração de $290 \mu\text{M}$ de ácido salicílico; para calos de nó cotiledonar ($7,0 \pm 0,91\%$), na concentração de $580 \mu\text{M}$ e para calos de cotilédone ($6,8 \pm 0,21\%$ e $7,5 \pm 0,86\%$), nas concentrações de $290 \mu\text{M}$ e $580 \mu\text{M}$ de ácido salicílico (Figura 18D).

4.2.2.5 Efeito de sacarose, frutose e do tempo de cultivo em calos originados de diferentes tipos de explantes.

O maior conteúdo de fenólicos totais foi observado nos calos de hipocótilo cultivados por 30 dias, em frutose ($8,8 \pm 0,7 \text{ mg AG/g MS}$), seguido pelos calos de cotilédone ($7,8 \pm 0,3 \text{ mg AG/g MS}$) e nó cotiledonar ($5,3 \pm 0,3 \text{ mg AG/g MS}$) cultivados em sacarose (Figura 19A). Enquanto aos 51 dias de cultivo, somente os calos de cotilédone, suplementados com frutose, apresentaram o maior teor de fenólicos totais ($3,6 \pm 0,2 \text{ mg AG/g MS}$).

Como mostra a Figura 19B, os maiores teores de flavonoides foram produzidos aos 30 dias de cultivo pelos calos de nó cotiledonar, tratados com sacarose. Os calos cultivados por 51 dias, tanto em sacarose como em frutose, exibiram valores inferiores aos observados nos calos cultivados aos 30 dias. Entretanto, os tempos de cultivos testados não influenciaram significativamente a produção de flavonoides em calos de cotilédone cultivado em sacarose e calos de hipocótilo em frutose.

Os resultados da Figura 19C demonstram que, tanto em sacarose como em frutose, a ação antioxidante dos calos foram maiores aos 30 dias de cultivo. Foi possível verificar que, os extratos obtidos dos calos de cotilédone e nó cotiledonar, suplementados com sacarose, reduziram $68 \pm 1,3\%$ e $47,3 \pm 1,7\%$ do DPPH e, em frutose, os calos de cotilédone reduziram $51,3 \pm 0,3\%$ o radical livre DPPH.

Os resultados da análise da razão flavonoides e fenólicos totais (Figura 19D) indicaram que, aos 30 dias de cultivo, os calos de hipocótilo, cultivados em sacarose e calos de cotilédone, cultivados em frutose, apresentaram valores de razão flavonoides/fenólicos totais entre 7% e 8%, superiores aos demais tratamentos.

As análises de variância fatoriais 2×2 entre os fatores tempo de cultivo e tipo de explante indicaram, para fenólicos, interação significativa para os tratamentos em sacarose ($F=278,12^{***}$, $p<0,001$) e

em frutose ($F=819,80^{***}$, $p<0,001$) (Tabelas 51, 52, 53 e 54 ANEXO A). Indicaram também interação significativa entre tipo de fonte de carbono e tipo de explante, para 30 dias de cultivo ($F=1861,96^{***}$, $p<0,001$) e 51 dias de cultivo ($F=88,42^{***}$, $p<0,001$). O mesmo ocorreu para flavonoides, nas interações entre tempo de cultivo e tipo de explante, para sacarose ($F=73,69^{***}$, $p<0,001$) e frutose ($F=45,55^{***}$, $p<0,001$). Para atividade antioxidante houve interação significativa entre tempo de cultivo e tipo de explante, em sacarose ($F=450,78^{***}$, $p<0,001$) e em frutose ($F=3795,86^{***}$, $p<0,001$) e, entre fonte de carbono e tipo de explante, aos 30 dias de cultivo ($F=92,06^{***}$, $p<0,001$) e aos 51 dias de cultivo ($F=370,61^{***}$, $p<0,001$).

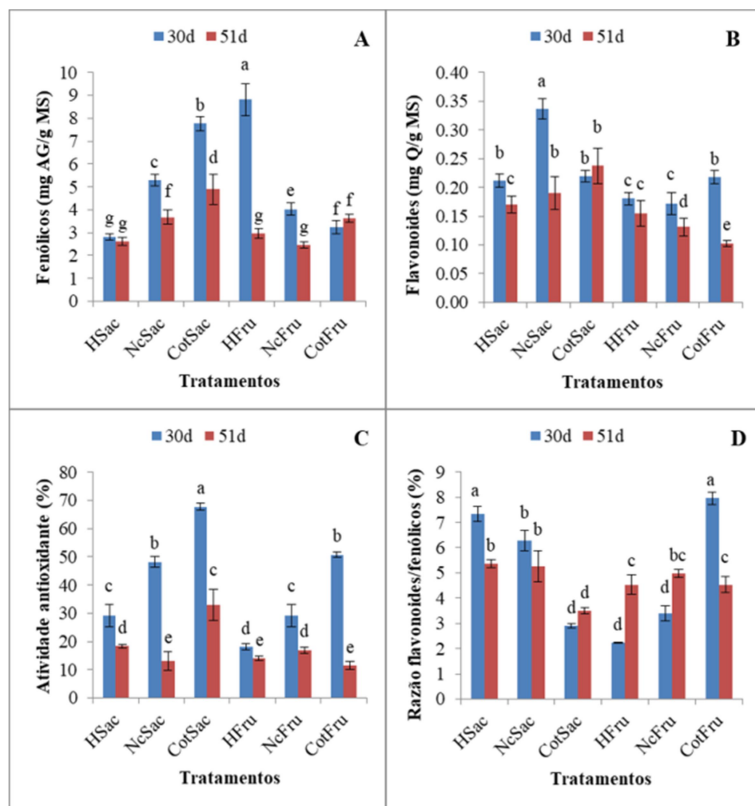


Figura 19. Efeito do tempo de cultivo nos conteúdos de fenólicos (A), flavonoides (B), atividade antioxidante (C) e razão entre flavonoides e fenólicos (D) de extratos de calos de *P. setacea* originados de explantes de hipocótilo (H), nó cotiledonar (Nc) cultivados por 30 dias (30d) e 51 dias (51d) em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac) ou frutose (Fru), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido diclorofenoxiacético. Valores são médias ± desvio padrão de dez repetições por tratamento (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05). MS= massa seca.

4.2.6 Efeito de sacarose, frutose e ácido salicílico em calos originados de diferentes tipos de explantes.

Os dados demonstram que a fonte de carbono sacarose foi eficiente para o incremento de fenólicos totais nos diferentes tipos de calos analisados (Figura 20A). Em sacarose, a presença do ácido salicílico aumentou os níveis de fenólicos totais nas culturas de calos de hipocótilo e cotilédone, inibindo a biossíntese nos calos oriundos de nó cotiledonar. Em frutose, o ácido salicílico teve efeito promotor somente nos calos de cotilédone.

A maior concentração de flavonoides ocorreu nos calos oriundos de cotilédone (0,3 ± 0,01 mg Q/g MS), cultivados em sacarose e expostos aos ácido salicílico (Figura 20B). Nos demais tipos de calos, não houve diferença entre os teores de flavonoides em sacarose e frutose, tanto nos calos elicitados como naqueles não elicitados.

O extrato das culturas de calos de cotilédone tratados com ácido salicílico e sacarose promoveu a maior atividade antioxidante de 43 ± 2,03%, conforme demonstra a Figura 20C. As porcentagens de inibição do DPPH, abaixo de 30%, foram observadas entre os calos, de hipocótilo, nó cotiledonar, tanto na ausência como na presença de ácido salicílico e nas culturas de calos de cotilédone, em frutose.

De acordo com a Figura 20D, os maiores valores da razão entre flavonoides e fenólicos totais, ocorreram nas culturas de calos de hipocótilo e cotilédone, crescidas em sacarose, sem elicitação. Com a fonte de carbono frutose observou-se aumento das razões flavonoides/fenólicos totais nas culturas de calos de hipocótilo tratada com ácido salicílico e nos calos de nó cotiledonar sem adição do elicitor.

As análises de variância fatoriais 2x2 entre os fatores elicitação e tipo de explante indicaram, para fenólicos, interações significativas para os tratamentos em sacarose (F=67,48***, p<0,001) e em frutose

($F=93,17^{***}$, $p<0,001$) e entre, tipo de fonte de carbono e tipo de explante, para o controle ($F=88,42^{***}$, $p<0,001$) e para os tratamentos elicitados ($F=53,12^{***}$, $p<0,001$) (Tabelas 55 e 56, ANEXO A). Para os flavonoides, as interações entre elicitação e tipo de explante foram significativas para sacarose ($F=5,62^{**}$, $p<0,01$) e frutose ($F=154,29^{***}$, $p<0,001$), assim como as interações entre tipo de fonte de carbono e tipo de explante, para o controle ($F=78,37^{***}$, $p<0,001$) e para os tratamentos elicitados ($F=53,29^{***}$, $p<0,001$). Para atividade antioxidante a interação entre elicitação e tipo de explante foi significativa em sacarose ($F=122,45^{***}$, $p<0,001$) e em frutose ($F=1085,51^{***}$, $p=0,001$). As interações entre tipo de fonte de carbono e tipo de explante foram significativas para os tratamentos do controle ($F=370,6^{***}$, $p<0,001$) e para os elicitados ($F=190,85^{***}$, $p<0,001$).

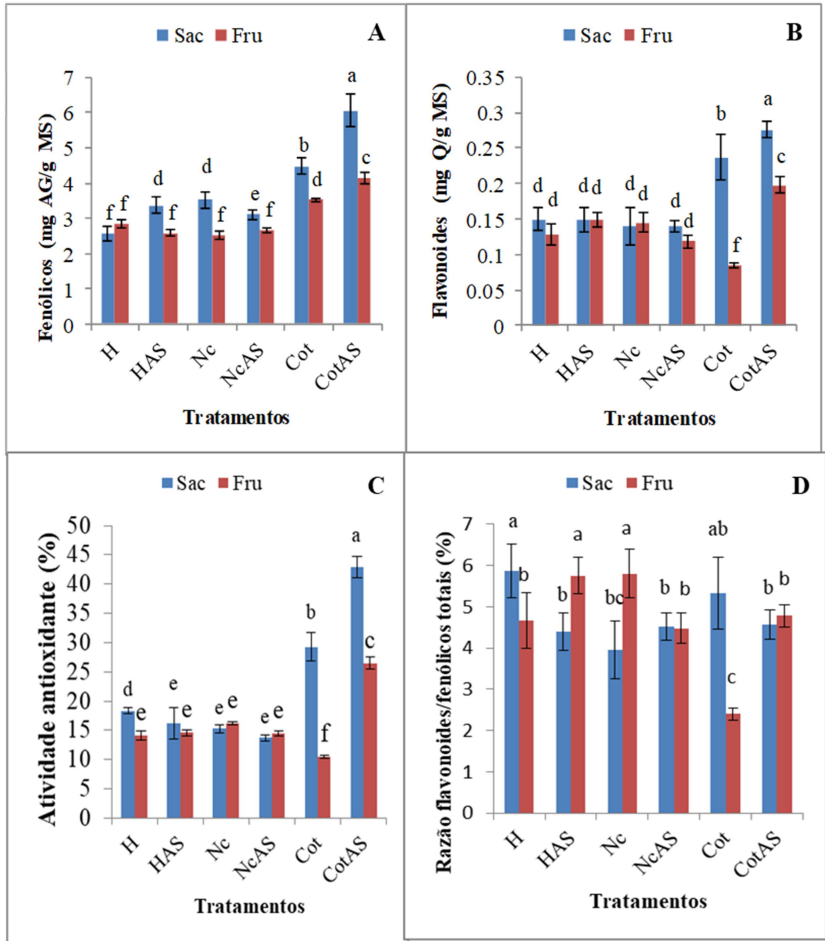


Figura 20. Efeito de fontes de carbono e ácido salicílico nos conteúdos de fenólicos (A) flavonoides (B), atividade antioxidante (C) e razão entre flavonoides e fenólicos (D) de extratos de calos de *P. setacea* originados de explantes de hipocótilo (H) cultivados por 30 dias (30d) e 51 dias (51d) em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (Sac) ou frutose (Fru), 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido diclorofenoxicético, elicitados (AS) ou não, por 21 dias com 145 µM de ácido salicílico. Valores são médias ± desvio padrão de dez repetições por tratamento (n=10). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey (p<0,05). MS= massa seca.

4.2.7 Correlação entre os níveis de fenólicos totais, flavonoides, luteína e atividade antioxidante dos calos originados de diferentes tipos de explantes.

Ao correlacionar atividade antioxidante, fenólicos, flavonoides e luteína dos extratos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea* é possível observar que no controle, o coeficiente de correlação entre atividade antioxidante e fenólicos totais foi moderado, de 0,456, e a correlação entre atividade antioxidante e flavonoides foi alta ($r= 0,871$) e significativa ($p<0,05$). Já, na presença de ácido salicílico a correlação entre atividade antioxidante e flavonoides foi alta e significativa ($r= 0,875$), ao passo que, a correlação entre atividade antioxidante e fenólicos totais foi baixa, de 0,332 (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre atividade antioxidante e fenólicos totais, flavonoides e luteína de extratos de calos de *P. setacea*, originados de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicitados (controle) ou elicitados (AS) com 145 µM de ácido salicílico.

Parâmetro	Coeficiente de correlação linear (r) ^x	
	Controle	AS
AA x fenólico	0,456	0,332
AA x flavonoide	0,871*	0,875*
AA x luteína	-0,130	0,006

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 6 amostras ($n=6$, $n-2= 4$ g.l.) para os tratamentos do controle e com ácido salicílico. (*)= $p<0,05$; (**). AA= atividade antioxidante. AS= ácido salicílico.

A Tabela 5 demonstra os dados de correlação linear simples entre ácido salicílico, atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides de extratos de calos de segmento cotiledonar observou-se que o ácido salicílico apresentou coeficiente baixo e negativo em correlação aos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante enquanto que atividade antioxidante e fenólicos foi moderada ($r= 0,437$). Ao observar a

atividade antioxidante e flavonoides o coeficiente de correlação foi alta ($r= 0,916$) e significativo ($p<0,05$) enquanto que a fenólicos e flavonoides foi moderada, de 0,565.

Tabela 5. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre concentrações de ácido salicílico e fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante e entre, atividade antioxidante e fenólicos totais e flavonoides, de extratos de calos de *P. setacea*, originados de segmentos de cotilédone, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Parâmetro	Coeficiente de correlação linear (r)
AS x fenólicos	-0,569
AS x flavonoides	-0,108
AS x AA	-0,267
AA x fenólicos	0,437
AA x flavonoides	0,916*
Fenólicos x flavonoides	0,565

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 6 amostras (n= 6, n-2= 4 g.l.). (*)= $p<0,05$. AS= concentrações de ácido salicílico. AA= atividade antioxidante.

Verifica-se na Tabela 6, que há uma correlação alta e negativa, entre ácido salicílico e fenólicos nos calos de nó cotiledonar e cotilédone ($r= -0,899$ e $r= -0,807$, respectivamente), porém para o tratamento com ácido salicílico e flavonoides a correlação foi alta e positiva para nó cotiledonar ($r= 0,926$) e negativa para cotilédone ($r=0,768$). Já para as culturas de calo de cotilédone a correlação foi significativa e positiva, nos parâmetros de atividade antioxidante e fenólicos ($r= 0,982$, $p<0,05$), atividade antioxidante e flavonoides ($r= 0,985$, $p<0,05$) e fenólicos totais e flavonoides ($r= 0,985$, $p<0,01$).

Tabela 6. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre, concentrações de ácido salicílico e fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante e entre, atividade antioxidante e fenólicos totais e flavonoides, de extratos de calos de *P. setacea*, originados de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Parâmetro	Tipos de explante		
	Hipocótilo	Nó cotiledonar	Cotilédone
AS x fenólicos	0,438	-0,899	-0,807
AS x flavonoides	0,637	0,926	-0,768
AS x AA	0,638	-0,127	-0,686
AA x fenólicos	-0,371	0,362	0,982*
AA x flavonoides	0,698	0,216	0,985*
Fenólicos x flavonoides	-0,347	-0,681	0,996**

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 6 amostras (n= 4, n-2= 2 g.l.), (*)= p<0,05, (**)= p<0,01. AS= concentrações de ácido salicílico. AA= atividade antioxidante.

Quando se correlaciona, para cada fonte de carbono, as variações entre os parâmetros em função dos tempos de cultivo, considerando-se os dados obtidos para os três tipos de explante hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone, é possível observar que, em sacarose, o coeficiente de correlação entre atividade antioxidante e fenólicos totais foi alto, de 0,917, significativo (p<0,05) e a correlação entre as variações na atividade antioxidante e flavonoides foi moderada (r= 0,483). Já, na presença de frutose as variações entre atividade antioxidante e flavonoides foi alta e significativa (r= 0,853) enquanto que a correlação entre atividade antioxidante e fenólicos totais foi baixa e negativa (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides, de extratos de calos de *P. setacea*, originados de diferentes tipos de explantes, cultivados por 30 e 51 dias, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Parâmetro	Tratamento	
	Sacarose	Frutose
AA x fenólicos	0,917**	-0,062
AA x flavonoides	0,483	0,853*
Fenólicos x flavonoides	0,377	0,296

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 6 amostras (n= 6, n-2= 4 g.l.). (*)= p<0,05. (**)= p<0,01. AA= atividade antioxidante.

Os valores de coeficientes de correlação linear obtidos a partir das análises de correlação linear realizadas para avaliar se as variações observadas entre as atividades antioxidantes dos diferentes tipos de calos, em cada tratamento, estavam associadas às variações nos níveis de fenólicos totais e flavonoides são mostrados na Tabela 8. Verifica-se que, em frutose foram observadas correlações significativas negativas, nos tratamentos sem elicitação, entre atividade antioxidante e fenólicos totais (r= -0,999) (p<0,05), porém para o tratamento com ácido salicílico a correlação foi significativa e positiva (r= 0,998) (p<0,05). Já para fenólicos e flavonoides, a correlação entre fenólicos totais e flavonoides foi significativa e negativa (r= -0,998, p<0,05). Em sacarose as correlações entre atividade antioxidante, fenólicos totais e flavonoides, e entre fenólicos totais e flavonoides, foram significativas e positivas, apenas nos tratamentos com elicitação (r= 1, p<0,01; r= 0,999, p<0,05; r= 0,999, p<0,05).

Em todos os tratamentos com frutose, com exceção dos valores de correlação negativos observados, todos os demais foram maiores do que 0,90, o mesmo ocorrendo em sacarose, com exceção dos valores obtidos no controle, para atividade antioxidante e fenólicos totais, e para fenólicos totais e flavonoides. Os menores valores de correlação observados em sacarose ocorreram entre os mesmos parâmetros que, em frutose, apresentaram valores negativos.

Tabela 8. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre atividade antioxidante e fenólicos totais, flavonoides e carotenoides de extratos de calos de *P. setacea*, originados de diferentes tipos de explantes, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicitados ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Parâmetro	Tratamento	Coeficiente de correlação linear (r) ^x	
		Frutose	Sacarose
AA x fenólicos	Controle	-0,999*	0,739
	AS	0,998*	1**
AA x flavonoides	Controle	0,994	0,994
	AS	0,934	0,999*
Fenólicos x flavonoides	Controle	-0,998*	0,811
	AS	0,912	0,999*

^xValores de r computados foram comparados com os valores de r tabulados em Statistical Procedures for Agricultural Research (Gomez & Gomez, 1984) para 3 amostras (n= 3, n-2= 1 g.l.) para os tratamentos com sacarose ou frutose, elicitados ou não elicitados. (*)= p<0,05; (**)= p<0,01. AA= atividade antioxidante. AS= ácido salicílico.

4.3 AVALIAÇÃO DOS CONTEÚDOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS, PERICARPOS, SEMENTES E CULTURAS DE CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea*.

4.3.1 Avaliação dos metabólitos de sementes, pericarpos e folhas *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Os resultados obtidos no teste de determinação do teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, medida através dos ensaios de captura do radical livre DPPH e poder redutor dos extratos hidroalcoólicos das sementes, pericarpos e folhas das espécies de *P. tenuifila* e *P. setacea* encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de sementes, pericarpo e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Espécie	Material vegetal	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH	Poder redutor ³
				CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	
<i>P. tenuifila</i>	Semente	297,10 ± 2,39 a	4,98 ± 0,13 c	5,15 ± 0,06 d	366,80 ± 30,88 a
	Pericarpo	14,22 ± 0,16 e	4,93 ± 0,08 c	118,47 ± 2,94 b	69,52 ± 2,94 d
	Folha	46,09 ± 0,75 c	18,83 ± 1,05a	46,59 ± 2,87 c	75,76 ± 4,33 d
<i>P. setacea</i>	Semente	231,18 ± 1,80 b	5,70 ± 0,08 b	0,85 ± 0,15 e	253,30 ± 18,00 b
	Pericarpo	14,87 ± 0,43 e	1,17 ± 0,08 d	271,41 ± 9,66 a	44,07 ± 1,70 d
	Folha	38,26 ± 1,06 d	8,83 ± 0,41 b	116,11 ± 4,16 b	124,33 ± 6,42 c

Valores são médias ± desvio padrão de 3 repetições (n=3). Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa entre os materiais vegetais das diferentes espécies, pelo teste de Tukey (p<0,05). ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

Os extratos hidroalcoólicos das sementes das plantas de *P. tenuifila* e *P. setacea* mostraram significativo teor de fenólicos com equivalência de ácido gálico no valor de $297,10 \pm 2,39$ e $231,18 \pm 1,80$ mg/g extrato seco, respectivamente, em relação aos teores dos extratos das folhas e pericarpos, demonstrados para estas duas espécies. Para *P. tenuifila*, o extrato bruto das sementes apresentou cerca de 1,3 vezes mais compostos fenólicos, quando comparado ao extrato bruto das sementes de *P. setacea*. Já para ambas as espécies de passifloras silvestres estudadas os extratos brutos dos pericarpos exibiram os menores conteúdos de compostos fenólicos, *P. tenuifila* ($14,22 \pm 0,16$ mg AG/g extrato seco) e *P. setacea* ($14,87 \pm 0,43$ mg AG/g extrato seco), que por sua vez não diferiram estatisticamente (Tabela 9).

Enquanto isso, os maiores teores de flavonoides foram encontrados no extrato bruto das folhas de *P. tenuifila* ($18,83 \pm 1,05$ mg Q/g extrato seco) e *P. setacea* ($8,83 \pm 0,41$ mg Q/g extrato seco), em relação aos demais materiais vegetais. Além disso, nas folhas, os flavonoides são representados por aproximadamente 41% e 35% dos compostos fenólicos para os extratos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, respectivamente. Esta mesma análise feita para os extratos dos pericarpos destas duas espécies de *Passifloras* mostra que os flavonoides representaram aproximadamente 35% e 8% dos compostos fenólicos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, respectivamente (Tabela 9).

Analisando-se os resultados, observa-se que os extratos de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* apresentaram a maior capacidade de abstração de radicais livres, com valores de $EC_{50} = 5,15$ e $0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato das folhas de *P. tenuifila* apresentou uma maior atividade antioxidante, com valor de EC_{50} de $46,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em relação ao extrato das folhas de *P. setacea*, que apresentou um valor de $EC_{50} = 116,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas duas espécies estudadas os extratos dos pericarpos exibiram a menor atividade antioxidante, com valores de EC_{50} de $118,47$ e $271,41 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. tenuifila* e *P. setacea*, respectivamente. Quanto à atividade antioxidante dos extratos brutos de *P. tenuifila* e *P. setacea* observa-se que esta atividade esteve diretamente relacionada ao teor de fenólicos existentes nos extratos.

O mesmo comportamento antioxidante pode ser observado em relação ao ensaio do poder redutor. A análise dos resultados obtidos para as duas espécies pesquisadas mostra que, os extratos brutos das sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* tiveram as maiores capacidades redutoras sobre os íons férricos, com valores equivalentes de ácido ascórbico de $366,80$ mg/g e $253,30$ mg/g de extrato seco,

respectivamente, seguido pelos extratos das folhas e pericarpos, sendo o valor obtido para *P. tenuifila* significativamente superior ao correspondente observado em *P. setacea*. Os extratos dos pericarpos das espécies de passifloras demonstraram os menores potenciais redutores, resultado também observado na avaliação da captura do radical livre DPPH.

Ao relacionar os resultados obtidos para os ensaios de atividade antioxidante com a quantificação de fenólicos presentes nos extratos, constata-se que existiu uma correlação linear entre os valores obtidos nos ensaios do poder redutor e abstração do radical livre pelo DPPH. As correlações entre a quantidade de compostos fenólicos e os valores obtidos pelo teste do poder redutor foram de 99,3% ($y = 1,092x + 40,55$; $r = 0,996$; $R^2 = 0,993$) e 91,8% ($y = 0,852x + 59,852$; $r = 0,96$; $R^2 = 0,918$), observadas para *P. tenuifila* e *P. setacea*, respectivamente. Além disso, a correlação entre as quantidades de compostos fenólicos e os valores obtidos de EC_{50} , através do ensaio de captura de radicais pelo DPPH foi de 70,5% ($y = -0,31x + 93,75b$; $r = -0,839$; $R^2 = 0,705$) e 76,2% ($y = -0,998x + 224,04$; $r = -0,873$; $R^2 = 0,762$) observada para os extratos *P. tenuifila* e *P. setacea*, respectivamente. Nenhuma relação se manteve quando se correlacionou os teores de flavonoides presentes nos extratos e as atividades antioxidantes de ambas as espécies. Isso também foi aparente nas correlações entre fenólicos e flavonoides.

As análises de variância fatoriais 2x3 indicaram interações significativas entre os fatores tipo de espécie e tipo de material vegetal para fenólicos ($F=1089,66^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=199,18^{***}$, $p<0,001$), para poder redutor ($F=43,92^{***}$, $p<0,001$) e CE_{50} ($F=436,91^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 57 ANEXO).

4.3.2 Avaliação do conteúdo de metabolitos secundários das culturas de calos de *P. tenuifila*.

Os experimentos realizados visaram verificar a influência de alguns fatores para calos de sementes imaturas, que não foram otimizados no item 4.1., como tempo de cultivo, idade das culturas no momento da elicitação e repetir, com essa nova metodologia, o experimento para verificar o efeito da sacarose e frutose, no decorrer do tempo de cultivo, em calos originados de caule.

4.3.2.1 Efeito do tempo de cultivo sobre as culturas de calos oriundos de sementes imaturas de *P. tenuifila*.

A concentração máxima de compostos fenólicos nas culturas de sementes imaturas de *P. tenuifila* foi observada no tempo de cultivo de 60 dias em comparação aos outros tempos de cultivo ($25,80 \pm 2,17$ mg AG/g extrato seco). A concentração mínima de fenólicos ($22,89 \pm 0,15$ e $20,79 \pm 0,54$ mg AG/g extrato seco) foram encontradas aos 45 e 75 dias de cultivo, respectivamente (Tabela 10). Com base nestes resultados, verificou-se que o tempo de cultivo não teve influência significativa no incremento de fenólicos nas culturas de calos de sementes imaturas. O maior teor de flavonoides ($0,60 \pm 2,17$ mg AG/g extrato seco) foi observado aos 60 dias de cultivo. Nos tempos de 45 e 75 dias os valores de flavonoides permaneceram os mesmos, com um equivalente de $0,24 \pm 0,00$ mg de quercetina/g extrato seco (Tabela 10).

A tabela 22 mostra o resultado do efeito do tempo de cultivo sobre atividade antioxidante dos calos de sementes imaturas, através do ensaio de inibição do radical livre DPPH, os valores das amostras avaliadas variaram entre 41% e 34%. O extrato da cultura de calo cultivada por 60 dias demonstrou maior potencial redutor ($62,99 \pm 3,89$ mg AA/g extrato seco), resultado que corrobora com as maiores concentrações de fenólicos e flavonoides presente nesta amostra. Nos tempos de 45 e 75 dias de cultivo, o potencial redutor das amostras foi baixo, tal resultado justifica-se pela baixa produção de fenólicos e flavonoides neste período de cultivo dos calos.

Tabela 10. Efeito do tempo de cultivo nos teores de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ Phytigel e 2,5 μM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético.

Idade (dias)	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH (% AA) ³	Poder redutor ⁴
45	22,89 ± 0,15 a	0,24 ± 0,00 b	41,32 ± 1,84 a	33,63 ± 1,32 b
60	25,80 ± 2,17 a	0,60 ± 0,00 a	34,86 ± 3,32 a	62,99 ± 3,89 a
75	20,80 ± 0,54 a	0,24 ± 0,00 b	38,60 ± 1,84 a	39,96 ± 1,00 b

Valores são médias ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Testes realizados com [DPPH] = 200 μg.mL⁻¹; ⁴Eq AA. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

4.3.2.2 Efeito da idade das culturas de calos oriundos de sementes imaturas de *P. tenuifila*, no momento da elicitação com ácido salicílico.

Neste estudo foi observado o efeito do tempo de cultivo das culturas de 30 e 60 dias, no momento da elicitação, nos teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, utilizando-se os ensaios de captura de radicais livres com o DPPH e do poder redutor de extratos de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*. Os resultados podem ser observados na tabela 11.

O acúmulo máximo de fenólicos (26,91 ± 0,78 mg ácido gálico/g de extrato seco) foi observado nas culturas de calos elicitados, aos 30 dias de idade, quando comparados com o controle correspondente (22,89 ± 0,54 mg AG/g de extrato seco). Nas culturas de calos tratados com ácido salicílico, aos 60 dias de idade, o teor de fenólicos (24,29 ± 0,56 mg AG/g extrato seco) foi superior ao encontrado no controle correspondente, sem ácido salicílico (20,80 ± 0,54 mg AG/g extrato seco). De fato, verificou-se que, quanto maior for o tempo de cultivo menor será a produção de fenólicos nas culturas de calos de sementes imaturas, na ausência ou presença do elicitor (Tabela 11).

Pode-se observar que, durante a elicitação com ácido salicílico, houve maior acúmulo de flavonoides, aos 30 dias de cultivo, sendo que o teor de flavonoides aumentou cerca de duas vezes, em relação ao

controle correspondente. O teor de flavonoides dos calos, que foram elicitados aos 60 dias de cultivo, não diferiu estatisticamente, em relação aos conteúdos de flavonoides encontrados nos calos de 30 e 60 dias de cultivo, na ausência de ácido salicílico (Tabela 11).

Os extratos das culturas de calos de sementes imaturas mostraram atividades antioxidantes que variaram entre $34,55 \pm 2,76\%$ e $41,32 \pm 1,84\%$. A menor atividade antioxidante em relação ao ensaio da avaliação da capacidade de captura do radical livre DPPH foi observada nos calos elicitados aos 60 dias de cultivo, porém os resultados de todos os tratamentos não diferiram estatisticamente, tanto na presença quanto na ausência de ácido salicílico.

Os extratos brutos das culturas de calos elicitados aos 30 dias e 60 dias demonstraram potenciais redutores equivalentes a $81,99 \pm 4,76$ e $52,67 \pm 4,58$ mg de ácido ascórbico/g extrato seco, respectivamente, superiores aos extratos dos calos cultivados nos mesmos tempos de cultivo, porém, na ausência de ácido salicílico (Tabela 11). A elicitação dos calos aos 30 dias de cultivo induziu o maior valor de poder redutor.

As análises de variância para um fator indicaram diferença significativa entre os tempos de cultivo para fenólicos ($F=11,29^{***}$, $p<0,05$), flavonoides ($F=65535^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=120,05^{***}$, $p<0,001$), mas não significativo para DPPH ($F=2,57$, $p>0,05$).

Tabela 11. Efeito da idade das culturas, no momento da elicitação com 145 μM de ácido salicílico, nos teores de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Phytigel e 2,5 μM ácido 2,4-diclorofenóxiacético.

Tratamento	Idade das culturas (dias)	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH (% AA) ³	Poder redutor ⁴
Controle	30	22,89 \pm 0,15 b	0,24 \pm 0,00 b	41,32 \pm 1,84 a	33,63 \pm 1,32 c
	60	20,80 \pm 0,54 c	0,24 \pm 0,00 b	38,60 \pm 1,84 a	39,96 \pm 1,00 c
Ácido Salicílico	30	26,91 \pm 0,78 a	0,53 \pm 0,00 a	34,95 \pm 1,42 a	81,99 \pm 4,76 a
	60	24,29 \pm 0,56 b	0,21 \pm 0,00 b	34,55 \pm 2,76 a	52,67 \pm 4,58 b

Valores são médias \pm desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Testes realizados com [DPPH] = 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; ⁴Eq AA. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

As análises de variância fatoriais indicaram interação significativa entre elicitação e idade das culturas no momento da elicitação para flavonoides ($F=9,04E+15^{***}$, $p<0,001$), para poder redutor ($F=82,20^{***}$, $p<0,001$), mas não para fenólicos ($F=0,660$, $p>0,05$) (Tabela 58, ANEXO A).

4.3.2.4 Efeito das fontes de carbono sobre as culturas de calos originadas de segmento caulinar de *P. tenuifila*.

Neste experimento foi observado o efeito das fontes de carbono, sacarose e frutose nos teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, observada pelos ensaios de captura do radical livre, usando DPPH (concentração efetiva 50%) e do poder redutor de extratos de calos de segmentos de caule de *P. tenuifila* cultivados por 45, 60 e 75 dias (Tabela 12).

Os calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose, aos 75 dias de idade ($36,62 \pm 1,36$ mg ácido gálico/g extrato seco). Os conteúdos de fenólicos totais dos calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose não apresentaram diferença significativa, em relação aos tempos de cultivo. No entanto, quando comparados com os calos cultivados em meio contendo sacarose, 45 dias ($17,39 \pm 0,23$ mg AG/g extrato seco) e 60 dias de cultivo ($19,14 \pm 0,15$ mg AG/g extrato seco), verifica-se que, o cultivo em frutose foi mais eficiente em relação ao acúmulo de compostos fenólicos.

O teor de flavonoides em calos cultivados em meio de cultura suplementado com sacarose foi maior quando comparado como teor de flavonoides em calos cultivados em meio de cultura suplementado com frutose, exceto no tempo de cultura de 60 dias onde os teores de flavonoides foram semelhantes. Os menores teores de flavonoides foram encontrados nos calos cultivados em meio de cultura contendo frutose ou sacarose, nos tempos de 60 e 75 dias de cultivo (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito da fonte de carbono nos teores de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante (concentração efetiva 50) e poder redutor de extratos de calos de segmentos de caule de *P. tenuifila* cultivados por 45, 60 e 75 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ phytagel and 2,5 µM de ácido naftalenoacético.

Fonte de carbono	Idade (dias)	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
Sacarose	45	17,39 ± 0,23 c	1,57 ± 0,00 a	-	73,90 ± 5,44 c
	60	19,14 ± 0,15 c	0,36 ± 0,00 e	-	57,52 ± 1,73 d
	75	36,62 ± 1,36 a	0,64 ± 0,00 c	175,50 ± 4,12 a	186,65 ± 14,73 a
Frutose	45	24,79 ± 0,43 b	1,29 ± 0,00 b	95,48 ± 8,72 d	144,44 ± 7,98 b
	60	24,30 ± 1,89 b	0,36 ± 0,00 e	119,88 ± 6,13 c	78,53 ± 3,60 c
	75	25,69 ± 0,68 b	0,48 ± 0,00 d	129,42 ± 7,84 b	46,29 ± 1,73 e

Valores são médias ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

Ao acrescentar ácido salicílico às culturas de calos de diferentes tipos de explantes de *P. tenuifila* observou-se que o maior conteúdo de fenólicos totais ocorreu nos calos de segmento caulinar. Já para flavonoides, a ação elicitora do ácido salicílico estimulou a biossíntese nas culturas de calos de sementes imaturas (Tabela 13).

Observa-se que, à medida que aumentou a o tempo de cultivo, em culturas suplementadas com frutose, aumentou também a atividade antioxidante avaliada pelo teste de captura de radical livre utilizando DPPH. Os resultados são expressos em CE_{50} , que significa a concentração efetiva de extrato necessária para reduzir em 50% a solução de DPPH. Os extratos de calos originados de segmentos caulinares cultivados com fonte de carbono sacarose, nos tempos de 45 e 60 dias, não foram avaliados pelo teste de captura de radical livre por terem apresentado baixa atividade antioxidante. Verifica-se que a cultura de 45 dias suplementada com frutose foi a que apresentou maior potencial antioxidante, com valor de CE_{50} de $95,48 \pm 8,72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A maior atividade antioxidante em relação ao ensaio que mediu a capacidade redutora sobre os íons férricos foi aos 75 dias, com sacarose ($186,65 \pm 14,73$ mg ácido ascórbico/g extrato seco) e em frutose, aos 45 dias cultivo ($144,44 \pm 7,98$ mg ácido ascórbico/g de extrato seco), havendo diferença estatística entre os valores (Tabela 12).

As análises de variância fatoriais 2x3 indicaram interação significativa entre tipo de fonte de carbono e tempo de cultivo para fenólicos ($F=146,49^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=6,95E+08^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=197,94^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 59, ANEXO A).

4.3.2.4 Comparação entre a cultura de calos de sementes imaturas com cultura de calos de caules de *P. tenuifila* na presença e ausência do elicitor.

Foi realizado um estudo comparativo da eficiência da produção de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, dos calos de sementes imaturas, elicitados aos 30 dias de cultivo em sacarose, com ácido salicílico e de calos oriundos de segmento caulinar, elicitados aos 45 dias de cultivo em frutose. A diferença no período de elicitação das culturas de calos de sementes imaturas e de caule foi devida à diferença no tempo, em que ocorreu o acúmulo máximo de biomassa seca. Na tabela 25 pode-se observar o efeito da elicitação com $145 \mu\text{M}$ de ácido

salicílico nos teores de fenólicos e de flavonoides e atividade antioxidante de extratos de calos de sementes imaturas e de calos de segmentos de caules de *P. tenuifila*.

Quando os extratos das culturas de calos, de diferentes tipos de explantes, foram submetidos ao teste de atividade antioxidante, pela redução do radical DPPH, verificou-se que o ácido salicílico diminuiu o potencial antioxidante dessas culturas, sendo que o maior potencial oxidante ocorreu nos extratos de calos de caule não elicitados. Ao avaliar atividade antioxidante, pelo método de redução do Fe^+ , verificou-se que a cultura de calos de caule, com ácido salicílico, apresentou maior potencial antioxidante, havendo correlação positiva com os teores de fenólicos totais.

As análises fatoriais 2x2 indicaram interação significativa entre elicitação e tipo de explante para fenólicos ($F=29,48^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=9653,78^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=426,50^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 60, ANEXO A).

Tabela 13. Efeito da elicitação com 145 μM de ácido salicílico nos teores de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de sementes imaturas e de segmentos de caule de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (calos de sementes) ou frutose (calos de caule), 2 g L^{-1} phytigel e 2,5 μM ácido 2,4-diclorofenóxiacético (calos de sementes) ou de ácido naftalenoacético (calos de caule).

Tratamento	Tipo explante	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Poder redutor ³
Controle	Caule	24,30 \pm 1,89 bc	0,36 \pm 0,00 b	119,88 \pm 6,13b	78,53 \pm 3,60 b
	Semente	22,89 \pm 0,15 c	0,24 \pm 0,00 d	-	33,63 \pm 1,32 c
AS	Caule	36,25 \pm 1,49 a	0,32 \pm 0,00 c	135,51 \pm 6,49a	202,96 \pm 1,83a
	Semente	26,91 \pm 0,78 b	0,53 \pm 0,00 a	-	81,99 \pm 4,76 b

Médias \pm desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA, AG= ácido gálico, Q= quercetina, AA= ácido ascórbico, AS= ácido salicílico.

4.3.3 Avaliação do conteúdo de metabolitos secundários das culturas de calos *P. setacea*.

Os experimentos visaram verificar a influência da idade das culturas dos calos de *P. setacea*, no momento da elicitação, que não foi otimizada no item 4.1. Assim, através do uso de método de extração hidroalcoólico foi possível confirmar o efeito do ácido salicílico, nos diferentes tipos de calos e o efeito da sacarose, frutose.

4.3.3.1 Efeito do ácido salicílico sobre as culturas de calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*.

As concentrações de fenólicos totais das culturas de calos, originados de diferentes tipos de explantes, aumentaram, significativamente, com a adição do ácido salicílico, em comparação com os controles correspondentes (Tabela 14). O teor máximo de compostos fenólicos foi observado nos calos de cotilédone tratados com ácido salicílico, seguido dos calos de nó foliar, raiz, nó cotiledonar, hipocótilo e epicótilo. Os valores de fenólicos totais dos calos de raiz, nó foliar, epicótilo, na ausência do ácido salicílico, diferiram significativamente em relação às culturas de calos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone. Dentre os diferentes tipos de calos, não elicitados, o extrato de calos de cotilédone apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, valor parecido ao obtido para calos de epicótilo, tratados com ácido salicílico.

Tabela 14. Efeito da elicitação com 145 μM ácido salicílico nos conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de *P. setacea* originados de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phytigel e 2,5 μM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético.

Tratamento	Tipo de explante	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Poder redutor ³
Controle	R	24,24 \pm 0,64 h	0,12 \pm 0,00 f	-	108,32 \pm 3,60 b
	H	31,29 \pm 1,43 g	0,60 \pm 0,00 d	124,63 \pm 0,30 b	88,71 \pm 8,01 c
	Nc	32,29 \pm 0,61 g	0,24 \pm 0,00 f	100,83 \pm 4,44 c	104,29 \pm 6,94 b
	Cot	35,99 \pm 0,12 e	1,45 \pm 0,00 a	88,50 \pm 1,72 d	129,04 \pm 9,23 b
	Nf	22,79 \pm 0,43 h	0,36 \pm 0,00 e	-	109,80 \pm 6,23 b
	Ep	23,74 \pm 0,38 h	0,36 \pm 0,00 e	-	92,30 \pm 3,71 b
AS	R	44,26 \pm 0,78 c	0,53 \pm 0,00 d	156,0 \pm 5,82 a	129,23 \pm 4,27 ab
	H	38,55 \pm 0,63 d	0,96 \pm 0,00 b	152,48 \pm 11,75 ^a	101,50 \pm 5,90 b
	Nc	42,78 \pm 0,83 c	0,71 \pm 0,06 c	123,91 \pm 1,48 b	112,26 \pm 5,57 b
	Cot	54,06 \pm 0,76 a	0,64 \pm 0,00 d	122,25 \pm 2,86 b	103,78 \pm 1,96 b
	Nf	48,90 \pm 0,73 b	0,32 \pm 0,00 e	138,25 \pm 6,65 a	112,26 \pm 8,15 b
	Ep	34,59 \pm 0,32 f	0,78 \pm 0,06 c	138,11 \pm 16,12 a	133,79 \pm 3,44 a

Valores são médias \pm desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). R=raiz, H= hipocótilo, Nc= nó cotiledonar, Cot= cotilédone, Nf= nó foliar, Ep= epicótilo. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

De maneira geral todas as culturas de calos apresentaram aumento nos níveis de flavonoides, quando elicitadas, exceto as culturas de calos oriundas de nó foliar e os calos de cotilédone, em que, a quantidade máxima de flavonoides detectada na ausência de ácido salicílico foi cerca de 2 vezes maior do que o respectivo tratamento elicitado (Tabela 14).

O extrato de calos de cotilédone não tratados com ácido salicílico (controle) apresentou maior potencial antioxidante, quando avaliado pelo teste de captura de radicais livres pelo DPPH, em relação aos demais tratamentos, com CE_{50} de $88,5 \pm 1,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como também o maior poder redutor, com valor igual a $129,04 \pm 9,23 \text{ mg AA/g}$ de extrato seco. Esses valores corresponderam aos maiores teores de fenólicos e flavonoides, detectados entre os tratamentos sem elicitação (Tabela 14). Nas culturas de calos de cotilédone, a ação do ácido salicílico, potencializou o aumento dos fenólicos, porém, diminuiu os teores de flavonoides e a ação antioxidante.

As análises fatoriais 2×6 indicaram interação significativa entre elicitação e tipo de explante para fenólicos ($F=137,94^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=353,33^{***}$, $p<0,001$), atividade antioxidante pelo DPH CE_{50} ($F= 12,12^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=20,34^{***}$, $p<0,001$) (Tabela 61, ANEXO A).

4.3.3.2 Efeito das fontes de carbono e elicitação sobre as culturas de calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*.

A tabela 15 mostra o efeito da sacarose e frutose, em calos elicitados e não elicitados com ácido salicílico, sobre o teor de fenólicos, de flavonoides e atividade antioxidante, nas culturas de calos iniciadas a partir de três diferentes tipos de explantes, hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone.

Tabela 15. Efeito de fontes de carbono nos conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de *P. setacea* originados de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético, não elicitados ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Fonte de carbono	Tratamento	Tipo de explante	Fenólicos totais ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
Sacarose	Controle	H	31,29 ± 1,43 e	0,60 ± 0,00 h	124,63 ± 4,93 b	88,71 ± 8,0 d
		Nc	32,29 ± 0,61 e	0,24 ± 0,00 i	100,61 ± 5,80 c	104,29 ± 6,94 c
		Cot	35,99 ± 0,12 d	1,45 ± 0,00 b	88,50 ± 1,72 d	129,04 ± 9,23 ^a
	AS	H	38,55 ± 0,63 c	0,96 ± 0,00 e	152,49 ± 0,63 a	101,50 ± 5,90 d
		Nc	42,78 ± 0,83 b	0,71 ± 0,06 f	123,91 ± 0,83 b	112,26 ± 5,57 b
		Cot	54,06 ± 0,76 a	0,64 ± 0,00 g	122,25 ± 0,76 b	103,78 ± 1,96 c
Frutose	Controle	H	16,47 ± 0,59 h	1,08 ± 0,00 d	-	90,60 ± 5,75 d
		Nc	19,31 ± 0,16 g	1,32 ± 0,00 c	-	65,51 ± 6,50 e
		Cot	15,75 ± 0,16 h	0,47 ± 0,00 i	-	34,14 ± 1,92 f
	AS	H	14,86 ± 0,31h	0,35 ± 0,00 j	-	63,29 ± 6,30 e
		Nc	19,21 ± 0,42 g	2,38 ± 0,07 a	-	91,71 ± 3,32 d
		Cot	20,10 ± 0,27 f	0,96 ± 0,00 e	-	58,13 ± 5,80 e

Valores são média ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). H= hipocótilo, Nc= nó cotiledonar, Cot= cotilédone. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA. AS= ácido salicílico. AG= ácido gálico. Q= quercetina. AA= ácido ascórbico.

Os teores de fenólicos em extratos de calos de hipocótilo e nó cotiledonar, cultivados em sacarose ou frutose, não variaram, tanto na presença como na ausência de ácido salicílico, Tabela 15. O maior valor de fenólicos totais foi observado em calos originados a partir de segmentos de cotilédone, cultivados em sacarose e elicitados ($54,06 \pm 0,76$ mg AG/g extrato seco), valor cerca de 2,7 vezes maior do que o obtido para os extratos de calos de cotilédone elicitados, cultivados em frutose ($20,10 \pm 0,27$ mg AG/g extrato seco).

Em frutose, as concentrações de flavonoides nos calos não elicitados de hipocótilo e nó cotiledonar aumentaram significativamente em relação aos mesmos tipos de calos cultivados em sacarose. No entanto, os calos de cotilédone cultivados em frutose apresentaram diminuição nas concentrações de flavonoides, em relação aos calos cultivados em sacarose. O tratamento com ácido salicílico, quando a fonte de carbono foi frutose, promoveu o acúmulo de flavonoides nos calos de nó cotiledonar e cotilédone em relação aos controles correspondentes, mas minimizou a biossíntese de flavonoides nos calos de hipocótilo (Tabela 15).

O extrato de calos de cotilédone não elicitados e cultivados em sacarose mostrou a melhor potencial antioxidante, com valor de CE_{50} igual a $88,5 \pm 1,72$ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, quando comparado as culturas de calos de nó cotiledonar e hipocótilo (Tabela 15). A maior atividade antioxidante avaliada pelo radical livre DPPH para os calos cotilédone na ausência de ácido salicílico, usando como fonte de carbono a sacarose, foi também observada quando avaliada pelo teste do poder redutor ($129,04 \pm 9,23$ mg AA/g extrato seco).

Os extratos hidroalcoólicos dos diferentes tipos de calos cultivados em frutose, tanto na ausência como na presença de ácido salicílico, não foram analisados pelo teste de captura de radicais livres pelo DPPH, por apresentarem muito baixa atividade antioxidante, de difícil detecção (Tabela 15). Em frutose, os calos de hipocótilo, não elicitados e de nó cotiledonar, elicitados com ácido salicílico apresentaram maior atividade antioxidante quando avaliados pelo teste do poder redutor de $90,60 \pm 5,75$ mg AA/g extrato seco e de $91,71 \pm 3,32$ mg AA/g extrato seco, respectivamente.

Em sacarose, as análises fatoriais 2×3 entre elicitação e tipo de explante indicaram interações significativas para fenólicos ($F=58,07^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=1190,07^{***}$, $p<0,001$), atividade antioxidante pelo DPPH CE_{50} ($F=12,12^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=14,46^{***}$, $p<0,001$) (Tabelas 62, ANEXO A). Em frutose, as interações também

foram significativas para fenólicos ($F=116,38^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=1516^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=23,95^{***}$, $p<0,001$). Para atividade antioxidante pelo DPPH CE50 a interação não foi significativa ($F= 1,37$, $p>0,05$) mas os efeitos dos fatores isolados foram significativos ($p<0,001$), tanto para elicitação como para tipo de explante (Tabela 63, ANEXO A).

4.3.3.3 Efeito da idade das culturas no momento da elicitação em culturas de calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*.

O efeito da idade das culturas dos calos, no momento em que foi realizada a elicitação com ácido salicílico, nos conteúdos de fenólicos totais e de flavonoides, e sobre a atividade antioxidante, avaliada pelos testes de captura do radical livre DPPH e do poder redutor, de extratos de calos de *P. setacea*, originados de diferentes tipos de explantes, pode ser observado na Tabela 16.

Os resultados da tabela 16 indicam que os teores de fenólicos totais, dos diferentes tipos de explantes, diminuíram quando a elicitação foi realizada aos 45 dias de cultivo, em relação à elicitação realizada com 30 dias de cultivo, quando os extratos de calos de raiz e nó foliar apresentaram os maiores níveis de fenólicos totais. O maior incremento de flavonoides ocorreu nos calos de hipocótilo aos 30 e 45 dias de cultivo. A atividade antioxidante, usando o radical livre DPPH, não apresentou correlação com os teores de fenólicos e flavonoides. Já a atividade antioxidante usando poder redutor diminuiu nos calos de raiz e hipocótilo, quando a elicitação foi realizada aos 45 dias de cultivo aumentou nos calos de nó foliar ($197,09 \pm 11,13$ mg AA/g extrato seco), havendo, para esse tipo de calo, uma relação entre as variações nos teores de flavonoides e o potencial redutor, na medida em os calos foram elicitados com 45 dias de cultivo (Tabela 16).

Tabela 16. Efeito da idade das culturas, no momento da elicitação com ácido salicílico, nos conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de calos de *P. setacea* originados de diferentes tipos de explantes cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético e elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Idade das culturas (dias)	Tipo de explante	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
30	R	44,26 ± 0,78 b	0,53 ± 0,00 c	156,0 ± 5,82 b	129,23 ± 4,27 b
	H	31,00 ± 0,63 d	0,96 ± 0,00 a	152,48 ± 11,75 b	101,50 ± 5,90 c
	Nf	41,40 ± 0,73 a	0,32 ± 0,00 b	138,25 ± 6,65 c	112,26 ± 8,15 b
45	R	28,03 ± 0,40 e	0,43 ± 0,00 c	213,46 ± 10,12 a	111,93 ± 2,31 b
	H	29,45 ± 0,40 d	0,71 ± 0,06 b	143,70 ± 10,63 c	89,75 ± 1,13 d
	Nf	33,19 ± 0,65 c	0,43 ± 0,00 c	105,92 ± 7,34 d	197,09 ± 11,13 a

Valores são médias ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). R= raiz, H= hipocótilo, Nf= nó foliar. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA.

As análises fatoriais 2x3 indicaram interação significativa entre idade das culturas no momento da elicitação e tipo de explante para fenólicos ($F=67,23^{***}$, $p<0,001$), flavonoides ($F=76^{***}$, $p<0,001$), atividade antioxidante pelo DPPH CE50 ($F= 40,19^{***}$, $p<0,001$) e poder redutor ($F=118,75^{**}$, $p<0,001$) (Tabela 64, ANEXO A).

4.3.4 COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS SEMENTES, FOLHAS E PERICARPOS E DAS CULTURAS DE CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea*.

4.3.4.1 *P. tenuifila*

Os resultados da tabela 17 demonstram que o extrato bruto das sementes apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, seguido pelo extrato das folhas. Maiores teores de fenólicos nas culturas de calos foram observados também para o extrato dos calos de caule, cultivados em sacarose, por 75 dias, que apresentou um valor de 36,62 mg AG/g extrato seco, e os calos de caules, cultivados em frutose e elicitados com ácido salicílico, com valor de 36,25 mg AG/g extrato seco. Esses valores se aproximaram do teor de fenólicos totais, detectado no extrato das folhas, de 46,09 mg AG/g extrato seco e que, por sua vez foram superiores, em relação ao teor de fenólicos totais encontrado no extrato de pericarpos (14,22 mg AG/g extrato seco). Os calos de caule cultivados em frutose, por 45 e 60 dias, e de calos de sementes imaturas, elicitados com ácido salicílico e cultivados em sacarose, produziram teores de fenólicos totais semelhantes estatisticamente, com valores significativamente maiores do que os níveis observados nos extratos de calos de caule cultivados em sacarose, por 45 dias e extrato dos pericarpos.

Tabela 17. Conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de sementes, pericarpos, folhas e de calos de *P. tenuifila* originados de diferentes tipos de explantes, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose (calos de caule e sementes) ou frutose (calos de caule), 2 g.L⁻¹ phytigel e 2,5 µM ácido 2,4-diclorofenóxiacético (calos de sementes) ou de ácido naftalenoacético (calos de caule), não elicitados ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Material vegetal	Tratamento	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
Semente	--	297,1 ± 2,39 a	4,98 ± 0,13 b	5,15 ± 0,06 f	366,80 ± 30,88 a
Pericarpo	--	14,22 ± 0,16 e	4,93 ± 0,08 b	118,47 ± 2,94c	69,52 ± 2,94 d
Folha	--	46,09 ± 0,75 b	18,83 ± 1,05a	46,59 ± 2,87 e	75,76 ± 4,33 d
Calos	Caule Sac 45d	17,39 ± 0,23 e	1,57 ± 0,00 c	-	73,90 ± 5,44 d
Calos	Caule Sac 75d	36,62 ± 1,36 c	0,64 ± 0,00 d	175,50 ± 4,12 a	186,65 ± 14,73 b
Calos	Caule Fru 45d	24,79 ± 0,43 d	1,29 ± 0,00 c	95,48 ± 8,72 d	144,44 ± 7,98 c
Calos	Caule Fru 60d	24,30 ± 1,89 d	0,36 ± 0,00 e	119,88 ± 6,13 c	78,53 ± 3,60 d
Calos	Caule Fru 45d AS	36,25 ± 1,49 c	0,32 ± 0,00 e	135,51 ± 6,49 b	202,96 ± 1,83 b
Calos	Sem Sac 30d AS	26,91 ± 0,78 d	0,53 ± 0,00 d	-	81,99 ± 4,76 d

Valores são média ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). Sac= sacarose; Fru= frutose; AS= ácido salicílico; SI= sementes imaturas; 45d= 45 dias de cultivo; 60d= 60 dias de cultivo e 75d= 75 dias de cultivo. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA.

O máximo de teor de flavonoides ocorreu no extrato bruto das folhas de *P. tenuifila* ($18,83 \pm 1,05$ mg Q/g extrato seco), enquanto que os menores valores foram encontrados no extrato bruto de sementes e pericarpos (Tabela 17). Quando se compara os teores de flavonoides sintetizados pelas plantas e nas culturas de calos, nota-se que os flavonoides estão em menores concentrações nos calos, porém os calos de caule, com 45 dias de idade, cultivados em sacarose ou em frutose apresentaram os maiores teores de flavonoides ($1,57$ e $1,29$ mg Q/g extrato seco, respectivamente), valores $3,8$ a $3,1$ vezes menores do que o teor detectado no extrato de pericarpos.

Os maiores potenciais antioxidantes, detectados pelo teste de captura de radical livre pelo DPPH, foram observados nos extratos derivados de sementes, folhas e calos oriundos do cultivo de segmentos de caule em frutose, por 45 dias, que apresentaram os menores valores de CE_{50} , $5,15 \pm 0,06$; $46,59 \pm 2,87$ e $95,48 \pm 8,72$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, (Tabela 17). Esses valores de CE_{50} observados para estas culturas de segmentos de caules foram menores do que o observado para o extrato de pericarpo, com um valor de CE_{50} de $118,47 \pm 2,94$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando uma atividade antioxidante superior do extrato de calo, em relação ao pericarpo da planta.

Os calos de caule cultivados em sacarose por 45 e 75 dias, e os calos de caule cultivados por 45 dias, em frutose e elicitados, juntamente com os calos oriundos do cultivo de sementes imaturas, por 30 dias, em sacarose e elicitados com ácido salicílico, mostraram maiores valores de CE_{50} em relação aos calos de caule cultivados em frutose, por 45 e 60 dias e aos extratos de sementes, pericarpos e folhas.

Em ordem decrescente do potencial de captura do radical livres DPPH tem-se: o extrato de sementes, seguido pelos extratos de folhas, de calos de caule cultivados em frutose por 45 dias, de pericarpo que foi estatisticamente semelhante ao extrato de calos de caule, cultivados em frutose por 60 dias, seguido pelo extrato de calos elicitados de caule, cultivados em frutose e finalmente, de calos de caule, cultivados em sacarose por 75 dias (Tabela 17).

O extrato bruto de sementes apresentou a maior capacidade redutora ($366,80$ mg AA/ g de extrato seco), o mesmo observado para o teste de captura de radicais pelo DPPH, seguido pelo extrato das folhas e pericarpo (Tabela 17). Observou-se que culturas originadas de segmentos de caule, cultivadas por 45 dias com a fonte de carbono frutose e elicitadas com ácido salicílico e culturas de segmentos de caule, cultivadas em sacarose, por 75 dias, sem elicitação apresentaram a

maior atividade antioxidante, segundo o teste do poder redutor com valores de 202,96 mg AA/g de extrato seco, 186,65 mg AA/g de extrato seco, seguido pelo extrato de cultura de calos de caule, cultivados em frutose, por 45 dias e sem elicitação (144,44 mg AA/g de extrato seco). Todos estes valores, encontrados para os extratos de cultura de calos, foram superiores aos valores do poder redutor detectado nos extratos de pericarpos e folhas (Tabela 17). Os valores de poder redutor dos calos de caule cultivado em frutose, por 60 dias e dos calos de sementes imaturas, cultivados em sacarose e elicitados, que foram, respectivamente, de 78,53 mg AA/g de extrato seco e de 81,99 mg AA/g de extrato seco, foram similares aos obtidos nos extratos derivados do pericarpos (69,52 mg AA/g de extrato seco) e de folhas (75,76 mg AA/g de extrato seco).

Dentre os tratamentos avaliados, como mostrado na tabela 18, os valores máximos de razão flavonoides e fenólicos totais foram encontrados nos extratos do pericarpo (34,67%) e nos extratos de folhas (40,85%). Em calos de *P. tenuifila*, os maiores valores de razão flavonoides e fenólicos totais ocorreram apenas aos 45 dias de cultivo, tanto nos calos de caule cultivados em sacarose (9,02%) e como naqueles cultivados em frutose (5,20%). As razões demonstraram que as sementes, os calos de caule em sacarose, aos 75 dias de cultivo, os calos de caule em frutose, aos 60 dias de cultivo, os calos de caule em frutose elicitados e os calos de sementes imaturas, em sacarose e elicitados, apresentaram menores percentagens de flavonoides em relação ao total de compostos fenólicos (1,68; 1,75; 1,48; 0,88 e 1,96%, respectivamente). Outra informação interessante foi que os diferentes tratamentos, realizados com as culturas de calos, induziram a mesma dinâmica de biossíntese de flavonoides e fenólicos totais observada em sementes.

Tabela 17. Valores de razão entre flavonoides e fenólicos totais de extratos de sementes, pericarpo, folhas e calos de *P. tenuifila* produzidos em diferentes condições de cultivo.

Material vegetal	Explante e condições de cultivo	Razão flavonoides/fenólicos totais (%)
Semente	--	1,68
Pericarpo	--	34,67
Folha	--	40,85
Calos	Caule Sac 45d	9,02
Calos	Caule Sac 75d	1,75
Calos	Caule Fru 45d	5,20
Calos	Caule Fru 60d	1,48
Calos	Caule Fru AS	0,88
Calos	SI Sac AS	1,96

Valores são proporções entre as médias dos conteúdos de flavonoides e fenólico totais dos diferentes tratamentos. Sac= sacarose; Fru= frutose; AS= ácido salicílico; SI= sementes imaturas; AS= ácido salicílico; 45d= 45 dias de cultivo; 60d= 60 dias de cultivo e 75d= 75 dias de cultivo.

4.3.4.2 *P. setacea*

Uma comparação dos teores de fenólicos, de flavonoides e atividade antioxidante realizada entre as folhas, pericarpos, sementes e diferentes tipos de culturas de calos de *P. setacea* é mostrada na tabela 18.

O maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no extrato de sementes ($231,18 \pm 1,80$ mg AG/g de extrato seco). O teor de compostos fenólicos, detectado nas folhas ($38,26 \pm 1,06$ mg AG/g de extrato seco) foi similar aos valores observados nas culturas de calos de hipocótilo, elicitados com ácido salicílico ($38,55 \pm 0,63$ mg AG/g de extrato seco) e em calos de cotilédone, não elicitados ($35,99 \pm 0,15$ mg AG/g de extrato seco). Esses valores foram inferiores aos observados em calos elicitados de cotilédone ($54,06 \pm 0,76$ mg AG/g de extrato seco), nó foliar ($48,90 \pm 0,73$ mg AG/g de extrato seco) e de raiz ($44,26 \pm 0,78$ mg AG/g de extrato seco). O extrato oriundo do pericarpo produziu o menor nível de fenólicos totais ($14,87 \pm 0,43$ mg AG/g de extrato seco), quando comparado com os demais materiais analisados.

Tabela 18. Conteúdos de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e poder redutor de extratos de sementes, pericarpos, folhas e de calos de *P. setacea* originados de diferentes tipos de explantes, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ phytagel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenóxiacético, não elicitados ou elicitados com 145 µM de ácido salicílico.

Material vegetal	Explante e condição de cultivo	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
Semente	--	231,18 ± 1,80 a	5,70 ± 0,08 b	0,85 ± 0,15 g	253,30 ± 18,00 a
Pericarpo	--	14,87 ± 0,43 g	1,17 ± 0,08 c	271,41 ± 9,66 a	44,07 ± 1,70 d
Folha	--	38,26 ± 1,06 e	8,83 ± 0,41 a	116,11 ± 4,16 d	124,33 ± 6,42 b
Calos	Nc	32,29 ± 0,61 f	0,24 ± 0,00 e	100,83 ± 4,44 e	104,29 ± 6,94 c
Calos	Cot	35,99 ± 0,15 ef	1,45 ± 0,00 c	88,5 ± 1,40 e	129,04 ± 9,23 b
Calos	R AS	44,26 ± 0,78 d	0,53 ± 0,00de	156,0 ± 5,82 b	129,23 ± 4,27 b
Calos	H AS	38,55 ± 0,63 e	0,96 ± 0,00 c	152,48 ± 11,75 bc	101,50 ± 5,90 c
Calos	Nc AS	42,78 ± 0,83 d	0,71 ± 0,06 d	123,91 ± 1,48 cd	112,26 ± 5,57 bc
Calos	Cot AS	54,06 ± 0,76 b	0,64 ± 0,00 d	122,25 ± 2,86 cd	103,78 ± 1,96 c
Calos	Nf AS	48,90 ± 0,73 c	0,32 ± 0,00 de	138,25 ± 6,65 c	112,26 ± 8,15 bc
Calos	Ep AS	34,59 ± 0,32 f	0,78 ± 0,06 d	138,11 ± 16,12 c	133,79 ± 3,44 b

Valores são média ± desvio padrão de três repetições seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05). R=raiz, H= hipocótilo, Nc= nó cotiledonar, Cot= cotilédone, Nf= nó foliar, Ep= epicótilo. AS= ácido salicílico. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA.

As culturas de calos, não expostas ao ácido salicílico, como nó cotiledonar e cotilédone e as culturas de calos de hipocótilo e epicótilo, elicitadas, apresentaram os mesmos níveis de fenólicos encontrados no extrato de folhas, porém as respectivas culturas de calos foram superiores, em relação ao detectado no extrato de pericarpos (Tabela 18). Esses resultados demonstram que o ácido salicílico estimulou a produção de compostos fenólicos nas culturas de calos, igualando-se ao nível de produção de algumas estruturas vegetais, tais como folhas e pericarpos.

Observa-se, na Tabela 18, que as maiores concentrações de flavonoides ocorreram nos extratos de sementes, folhas, pericarpos e nos calos de cotilédone, não elicitados e de hipocótilo, elicitados com ácido salicílico, 5,70; 8,83; 1,17; 1,45 e 0,96 mg Q/g extrato seco, respectivamente. Os calos de nó cotiledonar, não elicitados, os calos de raiz e de nó foliar, elicitados, apresentaram as menores concentrações de flavonoides, em relação aos demais tratamentos. Verifica-se que, os conteúdos de flavonoides dos calos de cotilédone, não elicitados e de hipocótilo, elicitados equipararam-se ao existente no extrato de pericarpos.

Considerando o ensaio de abstração do radical livre, pelo DPPH, o menor valor de CE_{50} foi observado no extrato de sementes, indicando a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos de calos oriundos do cultivo de segmentos de cotilédone e de nó cotiledonar, não elicitados ($0,85 \pm 0,15$; $88,5 \pm 1,40$; $100,83 \pm 4,44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) (Tabela 18).

Observa-se que nos extratos de pericarpos e folhas, assim como nas demais culturas de calos, os valores de CE_{50} foram maiores, ou seja, apresentaram menor atividade antioxidante. É interessante ressaltar que os valores de CE_{50} do extrato das folhas foram parecidos aos observados nos extratos de calos de nó cotiledonar e cotilédone, elicitados, com ácido salicílico (Tabela 18).

Todos os extratos de calos, não elicitados, apresentaram valores menores, e, portanto maior atividade antioxidante, do que o extrato de pericarpos. Portanto, os valores de CE_{50} das amostras ocorreram em ordem crescente, em extratos de sementes, calos de cotilédone não elicitados, calos de nó cotiledonar não elicitados, calos elicitados de nó foliar, calos elicitados de hipocótilo, calos elicitados de raiz, calos elicitados de hipocótilo e de pericarpos (Tabela 18).

A maior capacidade redutora foi observada em extrato de sementes ($253,30 \pm 18,00 \text{ mg AA/g extrato seco}$), seguida pelo extrato

de calos, derivados do cultivo de segmentos de epicótilo, com elicitação ($133,79 \pm 3,44$ mg AA/g extrato seco), valor que foi similar aos detectados em extratos de folhas ($124,33 \pm 6,42$ mg AA/g extrato seco) e de calos, elicitados, de raiz, hipocótilo, nó cotiledonar e nó foliar, que variaram entre 112,26 e 129,23 mg AA/g extrato seco. Os extratos dos demais tratamentos avaliados apresentaram menores valores de potencial redutor, mas ainda superiores ao observado em extrato de pericarpos de $44,07 \pm 1,70$ mg AA/g extrato seco (Tabela 18).

Assim como descrito anteriormente para o ensaio com DPPH, onde o extrato de sementes apresentou o menor valor de CE_{50} , este extrato apresentou também o maior valor de poder redutor e o maior conteúdo de fenólicos totais. Entre os calos, o extrato de calos de cotilédone apresentou o menor valor de CE_{50} , maior valor de poder redutor e maior conteúdo de flavonoides. Calos com níveis similares de fenólicos totais, como os calos de cotilédone não elicitados e calos elicitados de epicótilo, apresentaram valores de poder redutor similares, mas teores de flavonoides e valores de CE_{50} muito diferentes e nesse caso, o menor valor de CE_{50} ocorreu nos calos de cotilédone, que apresentaram aproximadamente 2 vezes mais flavonoides que os calos de epicótilo. Calos com níveis de fenólicos totais e de flavonoides similares, como calos de cotilédone, não elicitados e calos elicitados de hipocótilo apresentaram valores de CE_{50} e de poder redutor muito diferentes. Portanto, entre os calos, nem sempre houve uma relação direta entre os maiores teores de fenólicos totais e flavonoides com os menores valores de CE_{50} e maior poder redutor (Tabela 18).

Analisando-se os valores de razão flavonoides e fenólicos totais, obtidos nos tratamentos (Tabela 19), observa-se que estas razões foram superiores nos extratos de folhas (23,08%) e pericarpos (7,87%). Os calos originados do cultivo de segmentos de cotilédone apresentaram a maior razão flavonoides e fenólicos (4,03%), seguido dos calos elicitados com ácido salicílico, como os de hipocótilo (2,49%) e epicótilo (2,25%). Verifica-se que, nos calos de nó cotiledonar, não elicitados e nos calos elicitados de raiz, nó cotiledonar, cotilédone e nó foliar as razões flavonoide/ fenólicos totais foram menores, em relação aos demais tratamentos. Observa-se que, os calos elicitados de hipocótilo e epicótilo apresentaram valores de razão flavonoides/ fenólicos totais semelhantes ao encontrado nos extratos de sementes.

Tabela 19. Valores de razão entre flavonoides e fenólicos totais de extratos de sementes, pericarpo, folhas e calos de *P. setacea* produzidos em diferentes condições de cultivo.

Material vegetal	Explante e condição de cultivo	Razão flavonoides/fenólicos totais (%)
Semente	--	2,47
Pericarpo	--	7,87
Folha	--	23,08
Calos	Nc	0,74
Calos	Cot	4,03
Calos	R AS	1,20
Calos	H AS	2,49
Calos	Nc AS	1,66
Calos	Cot AS	1,18
Calos	Nf AS	0,65
Calos	Ep AS	2,25

Valores são proporções entre as médias dos conteúdos de flavonoides e fenólico totais dos diferentes tratamentos. R=raiz, H= hipocótilo, Nc= nó cotiledonar, Cot= cotilédone, Nf= nó foliar, Ep= epicótilo. AS= ácido salicílico. AS= ácido salicílico.

4.4 Comparação entre os métodos de extração hidroalcoólica, extração com fluidos supercríticos (ESC) e extração com líquido pressurizado (ELP) de sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* e de calos de cotilédone de *P. setacea*.

Verifica-se na tabela 20 que os maiores valores de compostos fenólicos dos extratos de calos de cotilédone foram observados nos processos de ELP ($50,60 \pm 0,30$ mg ácido gálico/g extrato seco) e no extrato do resíduo da extração supercrítica, submetido à extração com líquido pressurizado ($50,94 \pm 0,09$ mg ácido gálico/g extrato seco). Esses valores não diferiram estatisticamente entre si, mas foram superiores aos valores obtidos na extração hidroalcoólica (EH) e à extração supercrítica (ESC) ($38,79 \pm 0,12$ e $23,66 \pm 0,00$ mg ácido gálico/g extrato seco, respectivamente).

Tabela 20. Conteúdos de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da extração hidroalcoólica, extração supercrítica, extração com líquido pressurizado do resíduo da extração supercrítica e da extração com líquido pressurizado de calos de *P. setacea*, originados de segmentos de cotilédone cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ de phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Método de extração	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Poder redutor ³
EH	35,99 ± 0,12 b	1,45 ± 0,00 b	88,50 ± 1,72 b	129,04 ± 9,23 a
ESC	23,66 ± 0,00 c	0,75 ± 0,00 c	-	64,45 ± 0,58 d
RESC+ELP	50,59 ± 0,30 a	2,09 ± 0,07 a	118,1 ± 0,88 a	113,25 ± 0,33 b
ELP	50,94 ± 0,09 a	0,25 ± 0,00 d	117,7 ± 1,67 a	107,10 ± 0,58 c

Valores são médias ± desvio padrão de 3 repetições (n= 3). Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa entre os materiais vegetais das diferentes espécies, pelo teste de Tukey (p<0,05). EH= extração hidroalcoólica. ESC= extrato da extração supercrítica. RESC= resíduo da extração supercrítica extraído por líquido pressurizado. ELP= extrato da extração com líquido pressurizado. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA.

A maior concentração de flavonoides foi observada no extrato obtido do resíduo da extração supercrítica extraído por ELP (RESC+ELP), com $2,09 \pm 0,07$ mg de quercetina/g extrato seco.

Os extratos obtidos pelo método de RESC+ELP e ELP e apresentaram potencial antioxidante quando avaliados pelos métodos do poder redutor ($113,25 \pm 0,33$ e $107,10 \pm 0,58$ mg AA/g extrato seco, respectivamente) e de redução do DPPH (CE_{50} de $118,13 \pm 0,88$ e $117,74 \pm 1,67$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente, indicando que a atividade antioxidante esteve diretamente relacionada com os altos conteúdos de fenólicos. Esses valores, contudo, foram menores do que os obtidos com a extração hidroalcoólica.

Os resultados da Tabela 21 mostram o efeito dos métodos de extração por líquido pressurizado e extração hidroalcoólica, na extração de fenólicos, flavonoides e na atividade antioxidante de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Verifica-se que para as sementes de *P. tenuifila* as maiores concentrações de fenólicos ($297,10 \pm 2,39$ mg AG/g extrato seco) e de flavonoides ($4,98 \pm 0,13$ mg Q/g extrato seco) foram obtidas com a extração hidroalcoólica, enquanto que os maiores valores de poder redutor de $499,12 \pm 11,39$ mg AA/g de extrato seco e de CE_{50} foram obtidos com a extração por líquido pressurizado.

Para as sementes de *P. setacea*, as maiores concentrações de fenólicos ($331,56 \pm 1,74$ mg AG/g extrato seco) e os maiores valores de poder redutor ($659,02 \pm 5,00$ mg AA/g extrato seco) e $CE_{50} = 3,87 \pm 0,07$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram obtidos na extração por líquido pressurizado (RESC), enquanto que a extração hidroalcoólica, foi melhor apenas para a extração dos flavonoides ($5,7 \pm 0,08$ mg Q/g extrato seco).

Tabela 21. Conteúdo de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* obtidos a partir da extração do resíduo da ESC por líquido pressurizado e por extração hidroalcoólica.

Espécies	Método de extração	Fenólicos ¹	Flavonoides ²	DPPH	Poder redutor ³
				CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	
<i>P. tenuifila</i>	RESC	213,97 ± 1,15 d	3,32 ± 0,00 d	10,43 ± 0,38 a	499,12 ± 11,39 b
	EH	297,10 ± 2,39 b	4,98 ± 0,13 c	5,15 ± 0,06 b	366,80 ± 30,88 c
<i>P. setacea</i>	RESC	331,56 ± 1,74 a	5,07 ± 0,20 b	3,87 ± 0,07 c	659,02 ± 5,00 a
	EH	231,18 ± 1,80 c	5,70 ± 0,08 a	0,85 ± 0,15 d	253,30 ± 18,0 d

Valores são médias ± desvio padrão de 3 repetições (n= 3). Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa entre os materiais vegetais das diferentes espécies, pelo teste de Tukey (p<0,05). EH= extração hidroalcoólica. RESC= resíduo da extração supercrítica extraído com líquido pressurizado. ¹Eq AG; ²Eq Q; ³Eq AA.

4.5 Perfis de compostos fenólicos, detectados por LC-ESI-MS/MS, em extratos de pericarpos, sementes, folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea* e em calos de *P. setacea*.

As composições de compostos fenólicos dos extratos de pericarpos, sementes e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea*, estudadas estão representadas na Tabela 22. Foram detectados 17 compostos fenólicos, sendo 11 ácidos fenólicos, um aldeído fenólico e 5 flavonoides, as estruturas químicas estão demonstradas nas Figuras 1, 3 e 21.

Neste estudo, os ácidos fenólicos salicílico [36], protocatecuico [32] e *p*-cumárico [28] foram detectados em todos os materiais vegetais analisados. Nos pericarpos de ambas as espécies foram encontrados os seguintes ácidos fenólicos: salicílico [36], protocatecuico [32], *p*-cumárico [28], gálico [37], cafeico [25], ferúlico [30], sinápico [29] e vanílico [33], assim como flavonoides, vitexina [2] e eriodictiol [35]. Os componentes verificados nas sementes de ambas as espécies foram o ácido salicílico [36], ácido protocatecuico [32], ácido *p*-cumárico [28], ácido vanílico [33], taxifolina [39] e eriodictiol [35] e, nas folhas, foram detectados os ácidos salicílico [36], protocatecuico [32], *p*-cumárico [28], gálico [37], cafeico [25], ferúlico [30], siríngico [27] e flavonoide *C*-glicosilado vitexina [2].

Entre os flavonoides *C*-glicosilados, a vitexina [2] foi detectada nos extratos de folhas e pericarpos de ambas as espécies analisadas, exceto nos extratos de sementes. O flavonoide isoorientina [4] foi predominante nos extratos de folhas de *P. tenuifila*, assim com a vanilina [41] e o ácido elágico [42] nos extratos de folhas de *P. setacea*. O flavanona taxifolina [40] foi identificado somente nos extratos de sementes, de ambas as espécies. Já a flavona hispidulina [38] foi encontrada nos extratos de sementes de *P. tenuifila* e o ácido rosmarínico [39], em folhas de *P. tenuifila* e sementes de *P. setacea*.

Tabela 22. Compostos polifenólicos detectados por LC-ESI-MS/MS em extratos hidroalcoólicos de pericarpo, sementes e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Compostos	Material vegetal					
	<i>P. tenuifila</i>			<i>P. setacea</i>		
	Pericarpo	Semente	Folha	Pericarpo	Semente	Folha
ácido salicílico	X	X	X	X	X	X
ácido protocatecuico	X	X	X	X	X	X
ácido <i>p</i> -cumárico	X	X	X	X	X	X
ácido gálico	X	X	X	X	c.a	X
ácido cafeico	X	X	X	X	c.a	X
ácido ferúlico	X	c.a	X	X	X	X
ácido siríngico	c.a	X	X	X	c.a	X
hispidulina	c.a	X	c.a	c.a	c.a	c.a
taxifolina	c.a	X	c.a	c.a	X	c.a
ácido rosmarínico	c.a	c.a	X	c.a	X	c.a
ácido sinápico	X	c.a	c.a	X	c.a	c.a
vitexina	X	c.a	X	X	c.a	X
isorientina	c.a	c.a	X	c.a	c.a	c.a
eriodictiol	X	X	c.a	X	X	c.a
vanilina	c.a	c.a	c.a	c.a	c.a	X
ácido vanílico	X	X	c.a	X	X	c.a
ácido elágico	c.a	c.a	c.a	c.a	c.a	X

c.a= composto ausente

A tabela 23 apresenta os compostos produzidos por três diferentes tipos de calos de *P. setacea*, originados a partir de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédones, cultivados em sacarose ou frutose. Os resultados indicam que os extratos dos três tipos de calos de *P. setacea*, cultivados em sacarose produziram os seguintes compostos, independente do explante de origem dos mesmos: ácido salicílico [36], ácido protocatecuico [32], ácido *p*-cumárico [28], ácido cafeico [25], ácido ferúlico [30], ácido siríngico [27], ácido vanílico [33] e vanilina [41]. Observa-se que, os calos hipocótilo, cultivados em frutose, deixaram de produzir os ácidos ferúlico [30], siríngico [27] e a vanilina [41], mas passaram a produzir a vitexina [2]. Os calos de nó cotiledonar, em frutose, deixaram de produzir apenas o ácido siríngico [27] e a vanilina [41], mas passaram a produzir vitexina [2] e isoorientina [4] e os calos de cotilédone, deixaram de produzir o ácido *p*-cumárico [28], o ácido siríngico [27].

Tabela 23. Compostos polifenólicos detectados por LC-ESI-MS/MS em extratos hidroalcoólicos de calos originados de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone de *P. setacea*, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Compostos	Tipos de explante					
	Hipocótilo		Nó cotiledonar		Cotilédone	
	Sacarose	Frutose	Sacarose	Frutose	Sacarose	Frutose
ácido salicílico	X	X	X	X	X	X
ácido protocatecuico	X	X	X	X	X	X
ácido <i>p</i> -cumárico	X	X	X	X	X	c.a.
ácido cafeico	X	X	X	X	X	X
ácido ferúlico	X	c.a.	X	X	X	X
ácido siríngico	X	c.a.	X	c.a.	X	c.a.
vanilina	X	c.a.	X	c.a.	X	X
ácido vanílico	X	X	X	X	X	X
vitexina	c.a.	X	c.a.	X	c.a.	c.a.
isoorientina	c.a.	c.a.	c.a.	X	c.a.	c.a.

c.a.= composto ausente.

A tabela 24 demonstra os compostos produzidos pelos diferentes tipos de calos de *P. setacea*, originados a partir de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédones, cultivados em frutose e, não elicitados ou elicitados com ácido salicílico [36]. Verifica-se que os calos de hipocótilo elicitados passaram a produzir os ácidos ferúlico [30] e sinápico [29], mas deixaram de produzir a vitexina [2]. Já os calos de nó cotiledonar, na presença de ácido salicílico [36], além de passarem a produzir o ácido sinápico [29], mantiveram a produção de vitexina [2] e isoorientina [4], observadas no controle em frutose. Nos calos de cotilédone elicitados, observa-se que as biossínteses de vanilina [41] e de ácido elágico [42] foram bloqueadas e a produção de ácido sinápico [29] e vitexina [2] estimuladas.

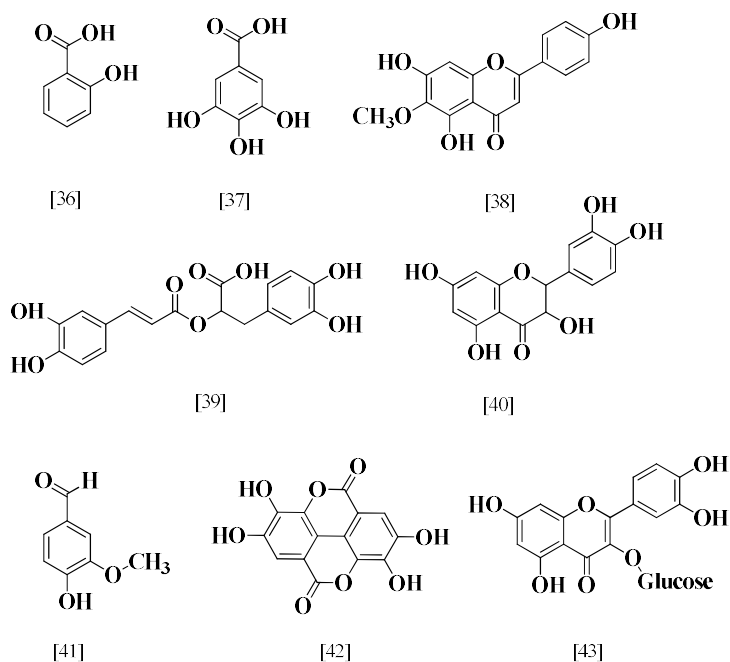


Figura 21. Estrutura compostos fenólicos das espécies de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Quando se compara as listas dos compostos produzidos pelos materiais vegetais de *P. setacea*, analisados na Tabela 23, com os compostos produzidos pelos calos de *P. setacea*, em sacarose e em frutose (Tabela 24) e, em frutose, elicitados ou não (Tabela 25), verifica-se que algumas moléculas não foram produzidas por nenhum dos três tipos de calos, em nenhuma das condições de cultivo testadas. Nomeadamente o ácido gálico [37], hispidulina [38], taxifolina [40], ácido rosmarínico [39], eriodictiol [35], ácido vanílico [33] e ácido elágico [42]. A isoorientina [4] foi a única molécula, que não apareceu nos materiais vegetais de *P. setacea*, mas que foi detectada, tanto nos calos de nó cotiledonar, cultivados em frutose, não elicitados ou elicitados.

Tabela 24. Compostos polifenólicos, detectados por LC-ESI-MS/MS, em extratos hidroalcoólicos de calos originados de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone de *P. setacea*, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de frutose, 2 g.L⁻¹ de phytigel, 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicitados (Fru) ou elicitados (Fru+AS) com 145 µM de ácido salicílico, por 21 dias.

Compostos	Tipos de explante					
	Hipocótilo		Nó cotiledonar		Cotilédone	
	Fru	Fru+AS	Fru	Fru+AS	Fru	Fru+AS
ácido salicílico	X	X	X	X	X	X
ácido protocatecuico	X	X	X	X	X	X
ácido <i>p</i> -cumárico	X	X	X	X	c.a	X
ácido cafeico	X	X	X	X	X	X
ácido ferúlico	c.a	X	X	X	X	X
ácido sinápico	c.a	X	c.a	X	c.a	X
vitexina	X	c.a	X	X	c.a	X
isoorientina	c.a	c.a	X	X	c.a	c.a
vanilina	c.a	c.a	c.a	c.a	X	c.a
ácido vanílico	X	X	X	X	X	X
ácido elágico	c.a	c.a	c.a	c.a	X	c.a

Fru= frutose; AS= ácido salicílico; c.a= composto ausente.

A Tabela 25 mostra a comparação entre os diferentes métodos de extração realizados com os calos originados de segmentos de cotilédone de *P. setacea*, cultivados em sacarose, por 30 dias. Este tipo de calo foi escolhido para a realização dos experimentos, por terem apresentado, níveis elevados de fenólicos totais e considerável atividade antioxidante, durante o decorrer do presente estudo.

Verifica-se que, no resíduo da extração supercrítica foram detectados os compostos vitexina [2] e isoorientina [4], que não foram detectados nos extratos hidroalcoólicos, porém, o ácido siríngico [27], detectado com a extração hidroalcoólica, não apareceu entre os compostos presentes no resíduo da extração supercrítica. Através da extração com líquido pressurizado, contudo, foram extraídos novos compostos como o ácido gálico [37] e a isoquercetina [43], que não apareceram no extrato hidroalcoólico e nem no resíduo da extração supercrítica.

Tabela 25. Efeito da extração hidroalcoólica, extração com fluidos supercríticos (ESC) e extração com líquido pressurizado (ELP), na composição de compostos polifenólicos de extratos de calos originados de segmentos de cotilédone de *P. setacea*, cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ de phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Compostos	Método de extração		
	EH	RESC+ELP	ELP
ácido salicílico	X	X	X
ácido protocatecuico	X	X	X
ácido <i>p</i> -cumárico	X	X	X
ácido gálico	c.a.	c.a	X
ácido cafeico	X	X	X
ácido ferúlico	X	X	X
ácido siríngico	X	c.a	X
isoquercetina	c.a.	c.a	X
vitexina	c.a	X	X
isoorientina	c.a.	X	X
vanilina	X	X	X
ácido vanílico	X	X	X

c.a= composto ausente; EH= extrato hidroalcoólico; RESC= resíduo da extração supercrítica extraído com líquido pressurizado; ELP= extrato da extração com líquido pressurizado.

Na tabela 26 estão representados os compostos polifenólicos detectados nas sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, extraídas por extração hidroalcoólica ou pelo método de extração por líquido pressurizado.

Observa-se que, para *P. tenuifila*, o ácido ferúlico [30], ácido clorogênico [24], ácido rosmarínico [39] e vanilina [41], que não apareceram no extrato hidroalcoólico, foram extraídos por líquido pressurizado. Para as sementes de *P. setacea*, os novos compostos extraídos por esse método foram o ácido cafeico [25] e a vanilina [41], porém, o ácido rosmarínico [39], não foi detectado nos extrato hidroalcoólico das sementes.

Tabela 26. Efeito da extração hidroalcoólica (EH) e da extração com líquido pressurizado (ELP), na composição de compostos polifenólicos de extratos de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

Compostos	Espécies			
	<i>P. tenuifila</i>		<i>P. setacea</i>	
	EH	RESC+EPL	EH	RESC+EPL
ácido salicílico	X	X	X	X
ácido protocatecuico	X	X	X	X
ácido <i>p</i> -cumárico	X	X	X	X
ácido gálico	X	X	c.a.	c.a
ácido cafeico	X	X	c.a.	X
ácido ferúlico	c.a.	X	X	X
ácido siríngico	X	X	c.a.	c.a
txifolina	X	X	X	X
ácido clorogênico	c.a.	X	c.a.	c.a
ácido rosmarínico	c.a.	X	X	c.a.
eridictiol	X	X	X	X
vanilina	c.a.	X	c.a.	X
ácido vanílico	X	X	X	X

c.a= composto ausente; EH= extrato hidroalcoólico; RESC= resíduo da extração supercrítica extraído com líquido pressurizado; ELP= extrato da extração com líquido pressurizado.

4.6 PERFIS DE TERPENOS DETECTADOS POR HS-SPME/CG-MS DE DIFERENTES TIPOS DE CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea*.

4.6.1 Análise da diversidade de terpenos produzidos pelos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*

A diversidade de terpenos produzidos pelos diferentes tipos de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, no decorrer do tempo de cultivo, são mostrados na Tabela 27. Verifica-se que o número de terpenos produzidos pelas culturas de calos de *P. setacea* variaram entre os tipos de calos, em cada tempo de cultivo. Além disso, calos de epicótilo apresentaram a maior diversidade de terpenos, 4 e 5, na primeira, segunda e terceira semanas de cultivo, respectivamente, mas esses números diminuíram a partir da quarta semana de cultivo, para 2 tipos de terpenos.

As culturas de calos de diferentes tipos de explantes produziram compostos terpênicos durante todo o ciclo de cultivo. Em calos de nó cotiledonar e nó foliar, o número de tipos de terpenos produzidos aumentou, da primeira semana até pelo menos a quarta semana de cultivo, enquanto que em calos de hipocótilo o número de terpenos aumentou na segunda semana, mas manteve-se constante durante todo o decorrer do ciclo de cultivo.

Já nos calos de *P. tenuifila*, observa-se, ainda na Tabela 28, que para os tempos de cultivo de uma e três semanas, os calos de sementes imaturas produziram, respectivamente, 6 e 5 tipos de terpenos, enquanto que o maior número de tipos de terpenos produzidos pelos calos de caule foi de 2, na primeira semana de cultivo. Ambas as culturas deixaram de produzir terpenos da quarta semana de cultivo em diante.

Tabela 27. Número de terpenos produzidos por diferentes tipos de calos de *P. setacea* e de *P. tenuifila*, no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel.

Espécie	Tipo de calos	Tempo de cultivo (semanas)					
		1	2	3	4	5	6
<i>P. setacea</i>	Raiz	2	2	2	2	2	2
	Hipocótilo	1	2	2	2	2	2
	Nó cotiledonar	1	1	2	2	1	1
	Cotilédone	1	1	1	1	1	1
	Nó foliar	1	1	2	4	3	2
	Epicótilo	4	5	5	2	2	2
<i>P. tenuifila</i>	Caule	2	1	1	0	0	0
	Semente imatura	6	2	5	0	0	0

Os resultados da Tabela 28 indicam que os hidrocarbonetos monoterpênicos α -pineno e *D*-limoneno estiveram presentes em todos os tipos de calos. O número de tipos de terpenos produzidos pelos calos variou dependendo do explante de origem e do tempo de cultivo. Assim, calos de cotilédone produziram apenas 1 tipo de terpeno, enquanto que calos de raiz, hipocótilo e nó cotiledonar produziram 2 tipos; em calos de nó foliar e epicótilo foi observada uma diversidade acentuadamente maior de moléculas, com 4 e 6 tipos de terpenos, respectivamente.

As culturas de calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea* produziram 8 tipos de terpenos (3 monoterpênicos e 5 sesquiterpenos) durante o tempo total de cultivo *in vitro*, como pode ser observado na Tabela 29.

Os demais tipos de terpenos não foram de ocorrência geral e estiveram presentes apenas em certos tipos de calos. Assim sendo, calos de raiz foram os únicos que apresentaram o α -acetato de terpinil (Figura 27), enquanto que os calos de nó foliar foram os únicos a apresentar o γ -elemeno (Figura 28) e os calos de epicótilo, β -elemeno, *E*-cariofileno e *D*-germacreno. O *D*-limoneno ocorreu apenas nos calos de hipocótilo, nó cotiledonar e epicótilo; enquanto que o *E*- α -bergamoteno (Figura 28) foi característico dos calos de nó foliar e epicótilo (Tabela 29).

É importante ressaltar que todos esses compostos foram produzidos em fases específicas do ciclo de cultivo dos calos. Em calos de epicótilo, por exemplo, o *D*-germacreno foi produzido a partir da segunda semana e terpenos como β -elemeno foram produzidos na primeira semana de cultivo, desaparecendo nas semanas seguintes (Tabela 29).

Estes resultados demonstram que a diversidade de terpenos produzidos pelos calos aumentou na medida em que foram utilizados explantes dos órgãos mais superiores das plantas, para iniciar as culturas de calos.

Tabela 28. Tipos de terpenos produzidos por diferentes tipos de calos de *P. setacea*, em algum momento do ciclo de cultivo in vitro, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel.

Tipos de terpenos	Tipos de calos					
	R	H	Nc	Cot	Nf	E
α -pineno	x	x	x	x	x	x
<i>D</i> -limoneno		x	x		x	x
α -acetato de terpinil	x					
β -elemeno						x
<i>E</i> -cariofileno						x
<i>Trans</i> - α -bergamoteno					x	x
<i>D</i> -germacreno						x
γ -elemeno					x	

R=raiz; H=hipocótilo; Nc= nó cotiledonar; Cot= cotilédone; Nf= nó foliar; E= epicótilo.

Tabela 29. Compostos terpênicos identificados nas culturas de calos de diferentes tipos de explante de *Passiflora setacea*.

Tipo de calos	Compostos	Tr/min	IR(E)	IR(L)	Tempo de cultivo (semanas)					
					1	2	3	4	5	6
Raiz	α -pineno	8,537	933	932	30,74*	14,70	23,20	4,82	0,90	0,03
	α -acetato de terpinil	21,253	1347	1346	1,24	1,78	6,10	0,27	0,23	2,47
Hipocótilo	α -pineno	8,517	932	932	35,64	32,52	24,83	23,18	7,85	7,07
	<i>D</i> -limoneno	11,533	1028	1024	--	1,88	2,55	0,17	0,50	0,38
Nó cotiledonar	α -pineno	8,544	933	932	25,31	30,98	4,42	0,21	0,31	0,52
	<i>D</i> -limoneno	11,546	1029	1024	--	--	1,93	0,04	--	--
Cotilédone	α -pineno	8,541	933	932	20,48	15,46	10,10	8,58	0,43	0,97
Nó foliar	α -pineno	8,545	933	932	84,28	45,94	57,96	2,26	8,36	0,88
	<i>D</i> -limoneno	11,536	1028	1024	--	--	--	0,16	0,14	0,24
	γ -elemeno	23,529	1430	1434	--	--	--	0,09	--	--
	<i>E</i> - α -bergamoteno	23,622	1433	1432	--	--	1,79	0,15	0,04	--
Epicótilo	α -pineno	8,537	933	932	17,71	6,92	13,75	0,15	0,17	0,25
	<i>D</i> -limoneno	11,536	1028	1024	--	1,78	6,10	0,27	0,23	2,47
	β -elemeno	22,498	1391	1389	2,53	--	--	--	--	--
	<i>E</i> -cariofileno	23,376	1424	1417	5,27	1,57	5,46	--	--	--
	<i>E</i> - α -bergamoteno	23,669	1435	1432	0,94	0,48	0,98	--	--	--
	<i>D</i> -germacreno	25,126	1490	1484	--	0,44	1,74	--	--	--

Tr/min= Tempo de retenção (min); IR (E)= Índices de retenção (dados experimentais); IR (L)= Índices de retenção (dados literatura (ADAMS, 2007)); (--)= não detectado; (*) porcentagem calculada pela área.

Os diferentes calos de *P. tenuifila* produziram, no total do ciclo de cultivo, 6 tipos de terpenos (5 monoterpenos e 1 sesquiterpeno). O α -pineno e o sabineno foram detectados tanto em calos oriundos do cultivo de segmentos de caule, quanto em calos de sementes imaturas. Entretanto, terpenos como α -tujona (Figura 22), β -pineno (Figura 25), *D*-limoneno e *D*-germacreno ocorreram apenas em calos originados a partir do cultivo *in vitro* de sementes imaturas (Tabela 30).

O α -pineno ocorreu apenas na primeira, segunda e na terceira semana de cultivo em ambos os tipos de calos. Já os demais tipos de terpenos também foram produzidos em fases específicas do período de cultivo dos calos. Por exemplo, o *D*-limoneno (Figura 26) e sabineno (Figura 24) produzidos na primeira semana, não apareceram na composição de terpenos das demais semanas de cultivo (Tabela 31).

Tabela 30. Tipos de terpenos produzidos por diferentes tipos de calos de *P. tenuifila* em algum momento do ciclo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel.

Tipos de terpenos	Tipos de calos	
	Caule	Sementes imaturas
α -pineno	x	x
sabineno	x	x
α - thujene		x
β - pineno		x
<i>D</i> -limoneno		x
<i>D</i> -germacreno		x

Tabela 31. Compostos terpênicos identificados nas culturas de calos de diferentes tipos de explante de *Passiflora tenuifila*.

Tipo de calos	Compostos	Tr/min	IR(E)	IR(L)	Tempo de cultivo (semanas)					
					1	2	3	4	5	6
Caule	α -pineno	8,545	933	932	39,95*	0,89	0,27	--	--	--
	sabineno	9,774	973	969	1,81	--	--	--	--	--
Sementes imaturas	α -tujona	8,300	928	924	2,87	--	1,02	--	--	--
	α -pineno	8,523	933	932	20,33	2,12	6,96	--	--	--
	sabineno	9,749	973	969	6,03	--	2,24	--	--	--
	β -pineno	9,900	978	974	1,03	--	0,57	--	--	--
	<i>D</i> -limoneno	11,536	1027	1029	5,82	--	--	--	--	--
	<i>D</i> -germacreno	24,733	1474	1484	0,20	--	0,19	--	--	--

Tr/min= Tempo de retenção (min); IR (E)= Índices de retenção (dados experimentais); IR (L)= Índices de retenção (dados literatura (ADAMS, 2007)); (--)= não detectado; (*)= porcentagem calculada pela área.

4.6.2 Análise da quantidade de terpenos produzidos pelos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Na tabela 32, são apresentados os percentuais de terpenos em relação ao total de compostos voláteis, produzidos pelos diferentes tipos de calos de *P. setacea* durante o decorrer do tempo de cultivo. Os resultados indicam que, em todos os tipos de calos, exceto em calos de nó cotiledonar, as maiores porcentagens de terpenos ocorreram na primeira semana de cultivo e decresceram, progressivamente, nas semanas de cultivo subsequentes.

Na primeira semana de cultivo, os calos de nó foliar produziram a maior porcentagem de terpenos (84,28%), seguidos pelos calos de hipocótilo (35,64%), raiz (31,99%), epicótilo (26,45%), nó cotiledonar (25,31%) e cotilédone (20,48%). Apenas nos calos de nó cotiledonar foi observado aumento da porcentagem de terpenos produzidos na segunda semana de cultivo (30,98%). Os calos de nó foliar seguiram produzindo as maiores porcentagens de terpenos que os demais tipos de calos até a terceira semana de cultivo (Tabela 32).

Tabela 32. Porcentagem de terpenos, em relação à quantidade de total de compostos voláteis produzidos pelos diferentes calos de *P. setacea*, no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel.

Tipos de calos	Tempo de cultivo (semanas)					
	1	2	3	4	5	6
Raiz	31,99	16,48	29,30	5,09	1,14	2,50
Hipocótilo	35,64	34,40	27,38	23,35	8,35	7,45
Nó cotiledonar	25,31	30,98	6,35	0,25	0,31	0,52
Cotilédone	20,48	15,46	10,10	8,58	0,43	0,97
Nó foliar	84,28	45,94	59,75	2,66	8,54	1,12
Epicótilo	26,45	11,19	28,02	0,42	0,41	2,72

Na terceira semana de cultivo os calos de raiz, hipocótilo, nó foliar e epicótilo produziram os maiores percentuais de terpenos em comparação aos calos de nó cotiledonar e cotilédone. Porém, na quarta semana a maior porcentagem de terpenos foi observada em calos de hipocótilo (23,35%), seguidos pelos calos de cotilédone (8,58%), raiz (5,09%), nó foliar (2,66%), epicótilo (0,42%) e nó cotiledonar (0,25%). Na última semana de cultivo, apenas os calos hipocótilo, epicótilo, raiz e nó foliar permaneceram produzindo entre 1,12% e 7,45% de terpenos (Tabela 32).

Os resultados da Tabela 33 indicam que, para os diferentes tipos de calos de *P. tenuifila*, os maiores percentuais de terpenos foram produzidos na primeira semana de cultivo, enquanto as quantidades decresceram drasticamente nas segunda e terceira semanas, cessando completamente a biossíntese nas semanas subsequentes. As porcentagens de terpenos produzidas na primeira semana foram de 41,76%, em calos de segmentos de caule e de 36,29%, em calos de sementes imaturas, valores que são ligeiramente superiores aos produzidos pela maioria dos calos de *P. setacea*, no mesmo período; contudo, são apenas a metade do percentual máximo de terpenos produzidos pelos calos de nó foliar de *P. setacea* (84,28%).

Em seguida, ocorreu uma queda drástica nos percentuais de terpenos produzidos, na segunda semana de cultivo, em ambos os tipos de calos, para valores de 0,89%, em calos de caule e 2,12%, em calos de sementes. Em calos de caule foi observada a diminuição progressiva, enquanto que calos de sementes imaturas voltaram a produzir terpenos em maior quantidade (11%) que os calos de caule. Contudo, a partir da quarta semana de cultivo ambos os tipos de calos já não produziram terpenos.

Tabela 33. Porcentagem de terpenos, em relação à quantidade de total de compostos voláteis produzidos pelos diferentes calos de *P. tenuifila*, no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 2 g.L^{-1} de Phytigel.

Tipos de calos	Tempo de cultivo (semanas)					
	1	2	3	4	5	6
Caule	41,76	0,89	0,27	--	--	--
Sementes imaturas	36,29	2,12	10,99	--	--	--

(--)= não detectado

Nas primeiras três semanas de cultivo, os calos de nó foliar foram os maiores produtores de α -pineno 84,28%, 45,94% e 58,96%, respectivamente, da primeira para a terceira semana de cultivo (Tabela 34). Nas semanas subsequentes de cultivo os maiores percentuais α -pineno, em relação aos demais tipos de calos, foram observados nos calos de hipocótilo (23,18%), durante a quarta semana; nos calos de hipocótilo e nó foliar, 7,85% e 8,36%, respectivamente, na quinta semana e nos calos de hipocótilo, 7,07%, na sexta semana de cultivo.

Tabela 34. Porcentagem de α -pineno, em relação à quantidade total de terpenos produzidos pelos diferentes tipos de calos de *P. setacea*, no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de μM de 2,4-D e 2 g.L^{-1} de Phytigel.

Tipos de calos	Tempo de cultivo (semanas)					
	1	2	3	4	5	6
Raiz	30,74	14,70	23,20	4,82	0,90	0,03
Hipocótilo	35,64	32,52	24,83	23,18	7,85	7,07
Nó cotiledonar	25,31	30,98	4,42	0,21	0,31	0,52
Cotilédone	20,48	15,46	10,10	8,58	0,43	0,97
Nó foliar	84,28	45,94	58,96	2,26	8,36	0,88
Epicótilo	17,71	6,92	13,75	0,15	0,17	0,25

Os resultados da Tabela 29 mostram que os maiores picos de produção do *D*-limoneno ocorreram, na terceira semana de cultivo, em ambos os calos de epicótilo (6,10%), hipocótilo (2,55%), e nos calos de nó cotiledonar (1,93%). No entanto, somente os calos de epicótilo continuaram produzindo de *D*-limoneno, em relação aos demais tipos de calos, chegando ao valor de 2,47% durante a sexta semana.

Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos *D*-germacreno (Figura 32) e *E*-cariofileno (Figura 30) foram produzidos unicamente pelas culturas de calos oriundas de epicótilo. O *D*-germacreno foi produzido, em maior quantidade, na terceira semana (1,74%), cessando a produção nas semanas subsequentes; ao mesmo tempo, nos demais tipos de calos não houve biossíntese deste terpeno. O *E*-cariofileno foi produzido, em maior quantidade, na primeira e terceira semana (5,27 e 5,46%), respectivamente, com parada total da biossíntese da quarta semana em diante (Tabela 29).

Tais resultados indicam que, em todos os tipos de calos de *P. setacea*, o pico da produção de α -pineno (Figura 23) ocorreu durante primeira semana, enquanto que os picos de produção de outros terpenos como o *D*-limoneno, *D*-germacreno e *E*-cariofileno ocorreram entre a segunda e até mesmo na sexta semana de cultivo, dependendo do tipo de terpeno e do tipo de calo (Tabela 29).

As variações na produção de α -pineno, *D*-limoneno e *D*-germacreno, pelos diferentes tipos de calos de *P. tenuiflora*, em função do tempo de cultivo (Tabela 35) indicam que a maior produção de α -pineno ocorreu na primeira semana, tanto em calos de caule (39,95%), como em calos de sementes (20,33%), logo decrescendo acentuadamente ao decorrer do tempo de cultivo, parando totalmente da quarta semana em diante, em ambos os tipos de calos.

Na primeira semana o percentual de α -pineno produzido pelos calos de caule foi 2 vezes maior que o produzido pelos calos de sementes (20,33%). Porém, na segunda semana decresceu, aproximadamente, 45 vezes, para 0,89% apenas. Nesse mesmo período, os calos de sementes, apesar de terem diminuído cerca de 10 vezes a produção em relação à primeira semana, ainda continuaram a produzir quantidades maiores do que os calos de caule, na segunda e terceira semanas, 2,12% e 7,96%, respectivamente (Tabela 35).

Já o pico máximo de produção do *D*-limoneno (Tabela 31) ocorreu na primeira semana (5,82%) em calos de sementes, parando totalmente nas semanas posteriores de cultivo, sendo cerca de 2,3 vezes maior do que o percentual detectado nos calos de hipocótilo e 3 vezes maior do que o encontrado em nó cotiledonar de *P. setacea*.

O maior percentual de *D*-germacreno (0,20%) produzido nos calos de sementes, ocorreu durante a primeira semana, posteriormente caindo para zero na segunda semana, e logo depois, na terceira semana, voltando a ser produzido (0,19%). Nos calos de caule não houve produção de *D*-germacreno (Tabela 31).

Tabela 35. Porcentagem de α -pineno, em relação à quantidade de total de compostos voláteis produzidos pelos diferentes calos de *P. tenuifila*, no decorrer do tempo de cultivo *in vitro*, no meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 2 g.L⁻¹ de Phytigel.

Tipos de calos	Tempo de cultivo (semanas)					
	1	2	3	4	5	6
Caule	39,95	0,89	0,27	--	--	--
Sementes imaturas	20,33	2,12	7,96	--	--	--

(--)= não detectado

Os resultados indicam que, em calos de sementes de *P. tenuifila*, os maiores picos de produção do α -pineno, *D*-limoneno (20,33 e 5,82%, respectivamente) e de outros terpenos, como α -tujona (2,87%) e sabineno (6,03%) ocorreram, todos, apenas na primeira semana de cultivo dos calos, com picos menores de biossíntese ocorrendo ainda na terceira semana. Os calos oriundos de segmentos de caule (Tabela 32), produziram o α -pineno (39,95%) e sabineno (1,81%) apenas na primeira semana, sendo a produção de α -pineno 22 vezes maior do que a de sabineno; contudo, a biossíntese de ambos cessou, completamente, a partir da segunda semana.

Em geral, as culturas de calos de nó foliar e hipocótilo de *P. setacea* produziram os maiores percentuais de α -pineno; já os calos de epicótilo foram os únicos a produzirem *E*-cariofileno, que não foi produzido pelos calos de *P. tenuifila*; enquanto que, a biossíntese de α -tujona (Figura 19) ocorreu somente nos calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*.

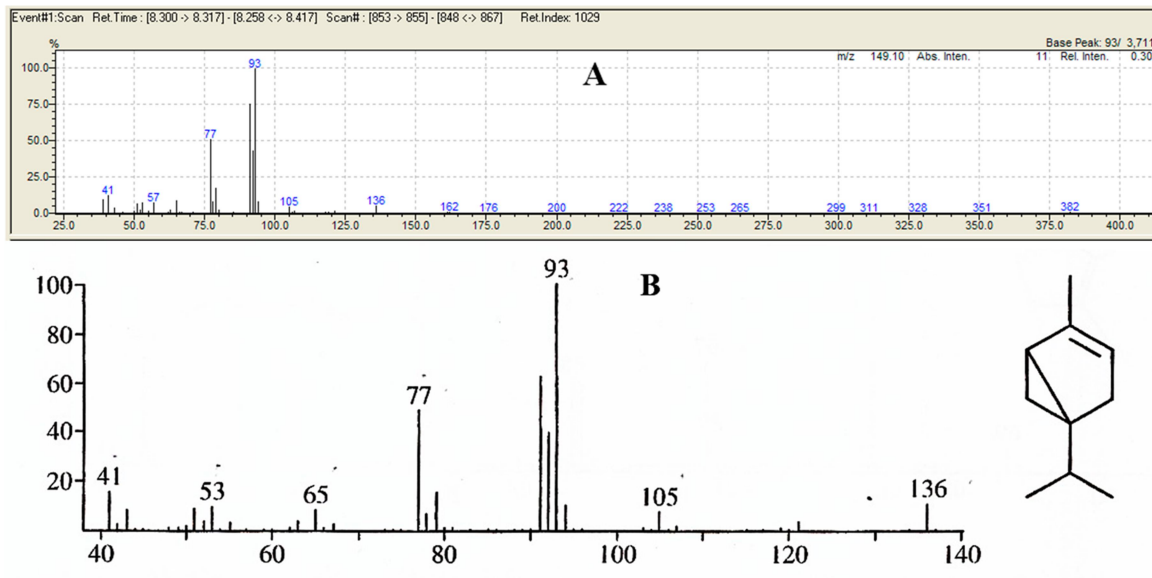


Figura 22. Espectro de massas do α -tujona (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

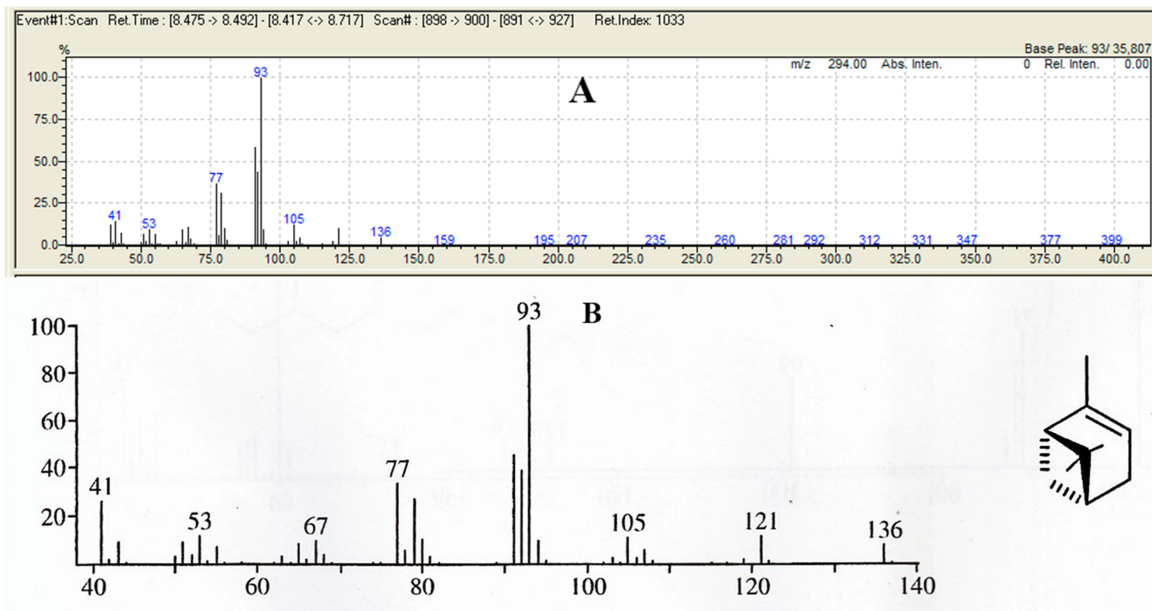


Figura 23. Espectro de massas do α -pineno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

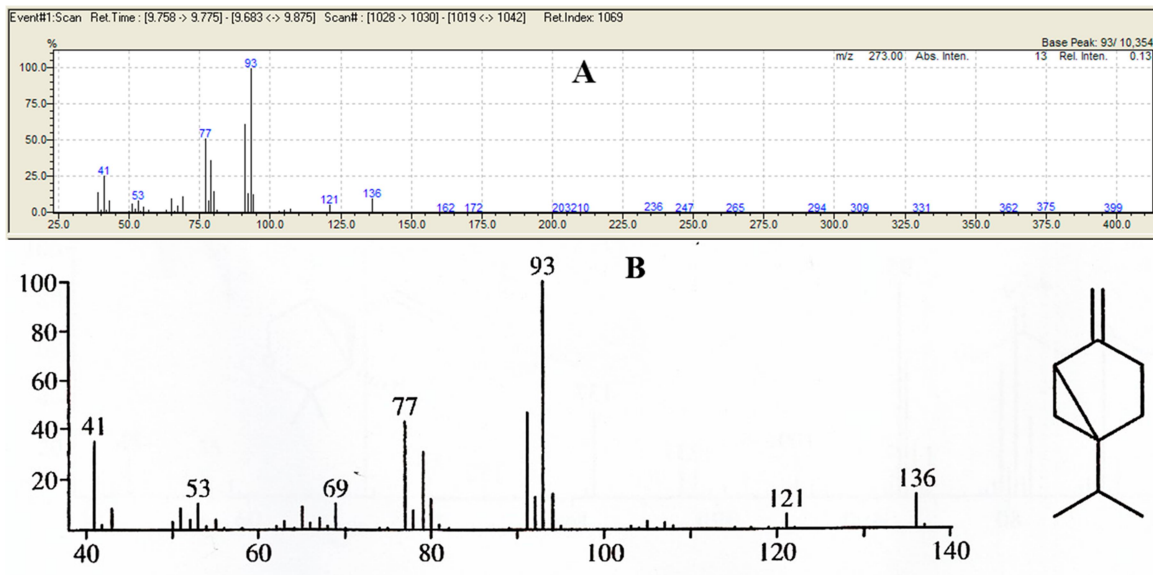


Figura 24. Espectro de massas do sabineno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

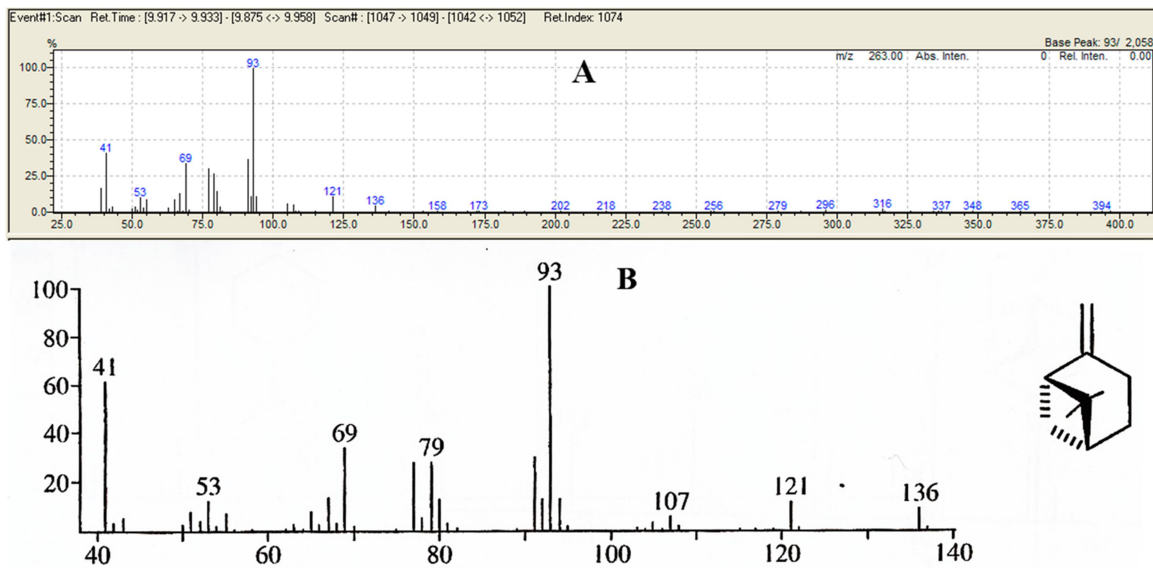


Figura 25. Espectro de massas do β -pineno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

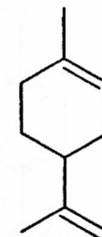
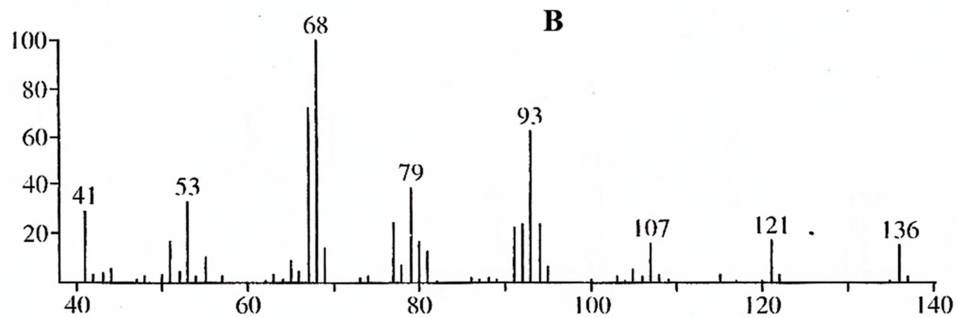
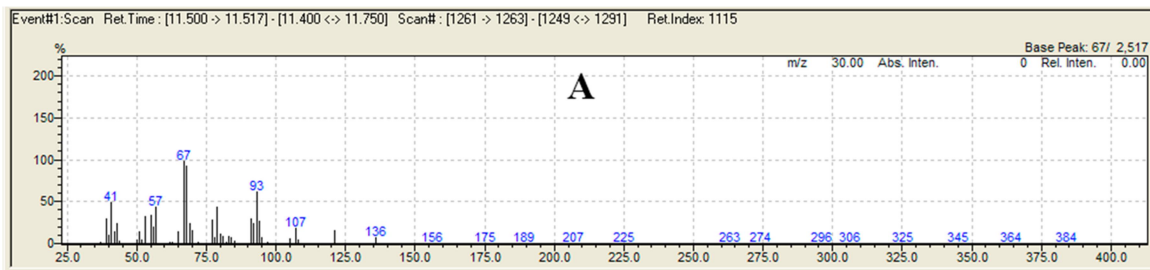


Figura 26. Espectro de massas do D-limoneno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

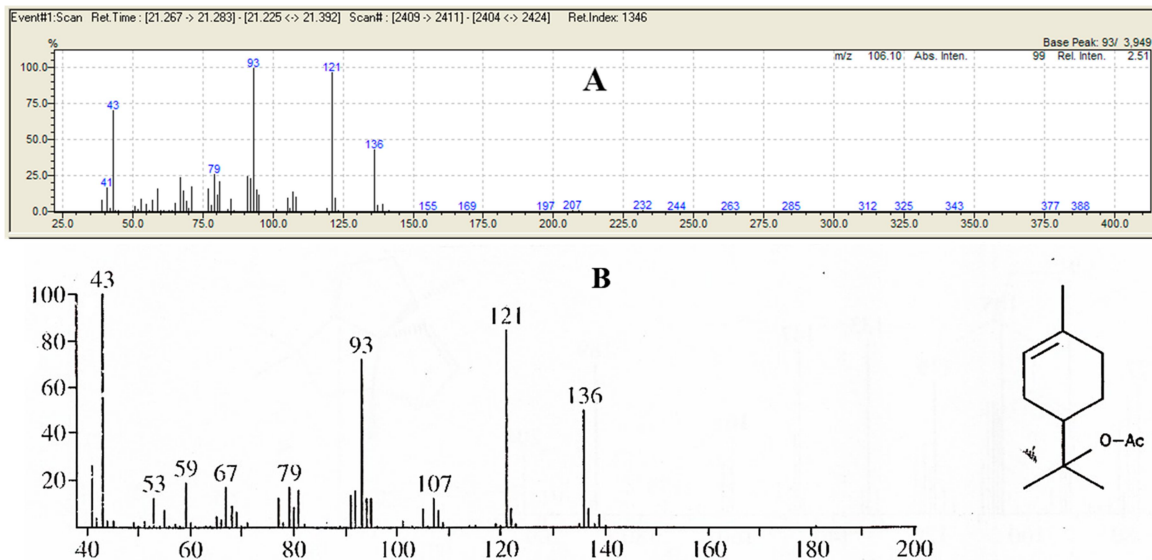


Figura 27. Espectro de massas do α -acetato de terpinil (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

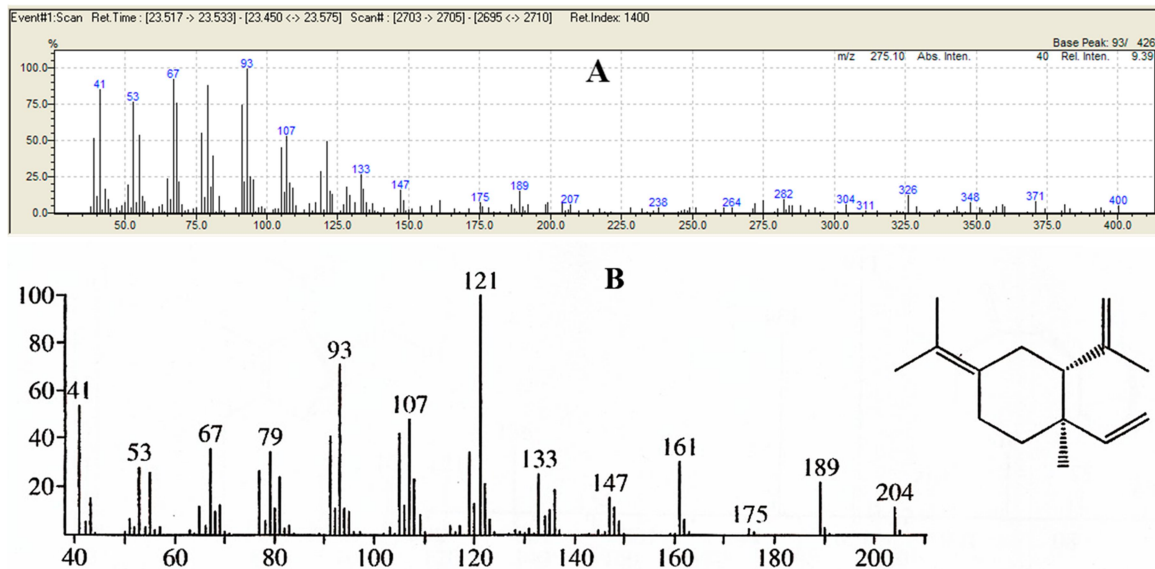


Figura 28. Espectro de massas do γ -elemeno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

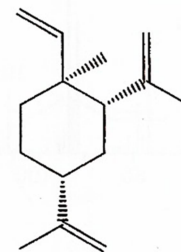
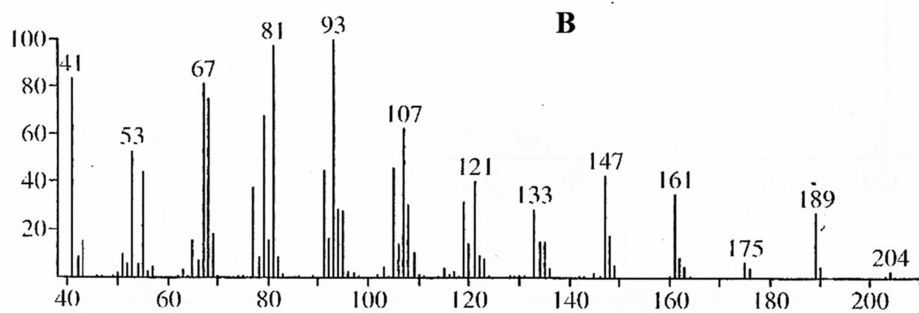
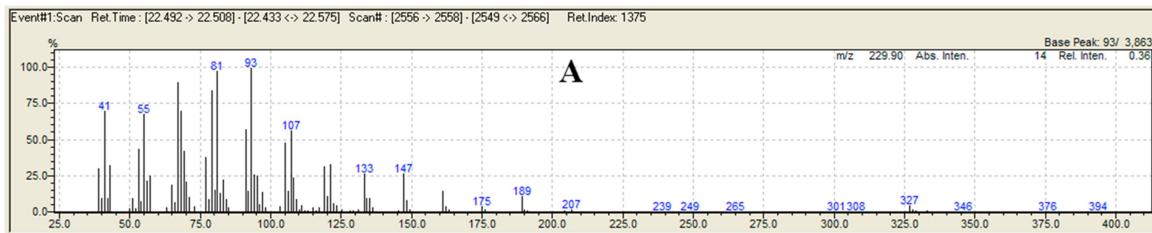


Figura 29. Espectro de massas do β -elemeno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

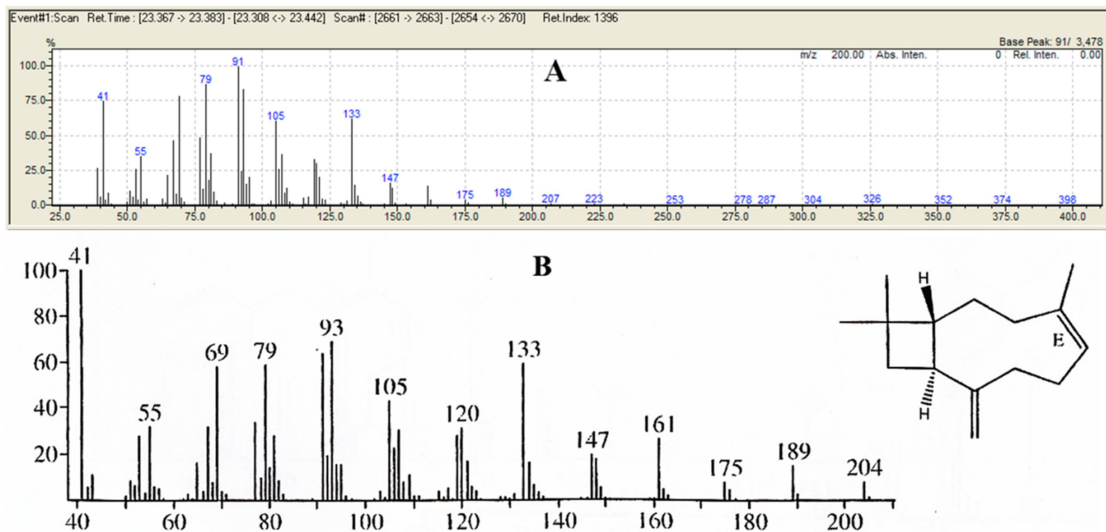


Figura 30. Espectro de massas do *E*-cariofileno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007)

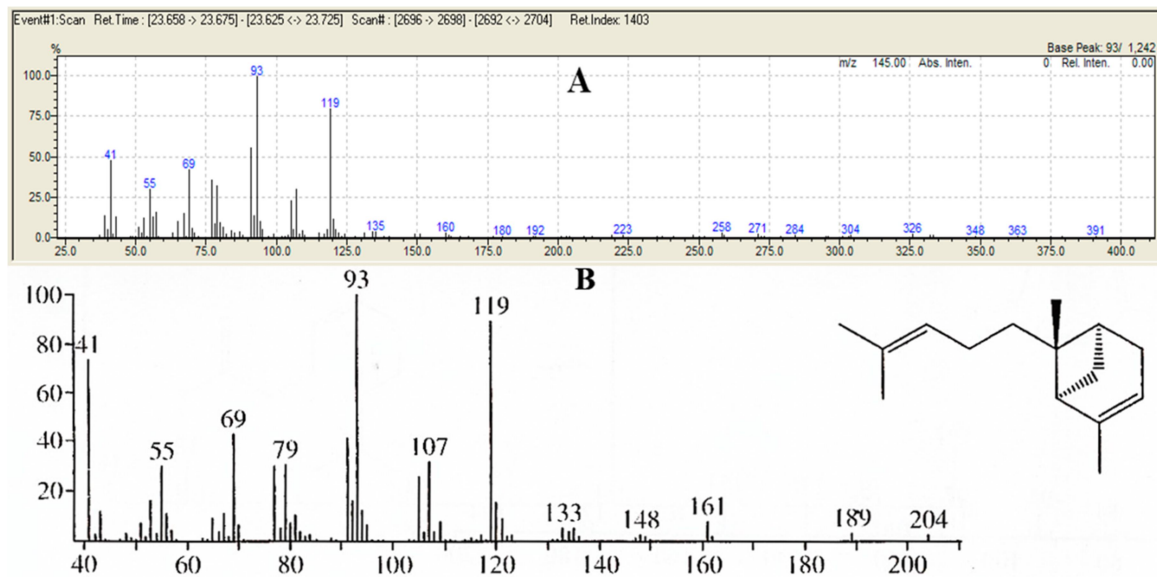


Figura 31. Espectro de massas do *E*- α -bergamoteno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

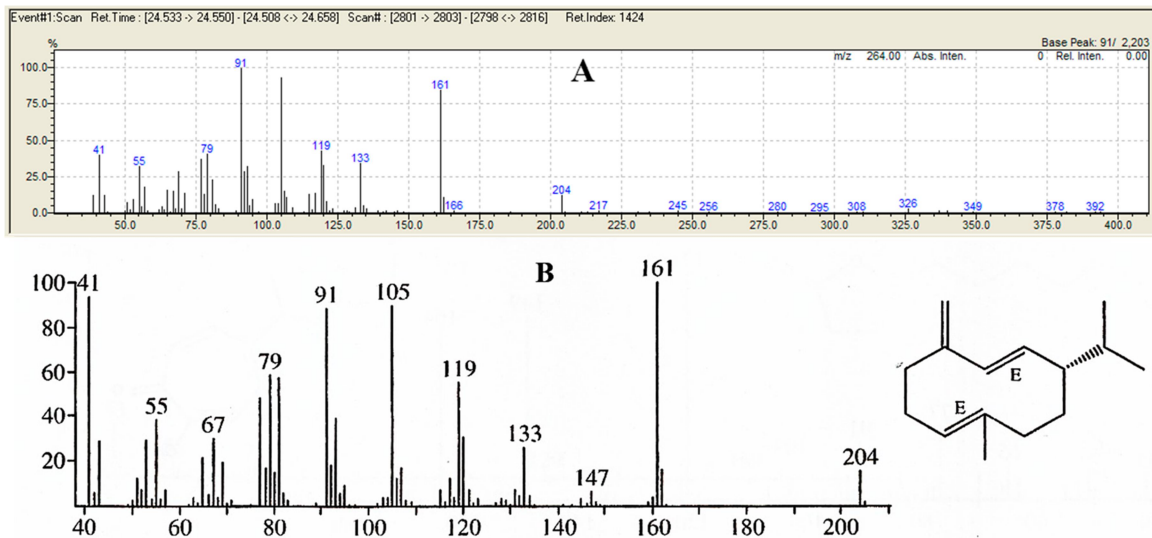


Figura 32. Espectro de massas do D-germacreno (A), em comparação à literatura (B) (ADAMS, 2007).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, PERICARPOS, SEMENTES E DE CALOS DE *P. setacea* E *P. tenuifila*.

4.7.1 Atividade antibacteriana

Como pode ser visto na tabela 36, os extratos brutos de pericarpos, sementes e folhas de *P. tenuifila* e *P. setacea* ($> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não apresentaram atividade diante das bactérias testadas, exceto o extrato de sementes de *P. setacea*, que demonstrou atividade moderada para o teste de cocos Gram-positivos *S. aureus* (CIM: $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), bacilos Gram-negativos *E. coli* (CIM: $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *P. aeruginosa* (CIM: $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 36. Atividade antibacteriana (CIM) dos extratos hidroalcoólicos dos pericarpos, sementes e folhas de *P. setacea* e *P. tenuifila*.

Espécie	Extrato	Atividade antibacteriana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
		<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>P. setacea</i>	Pericarpo	>1000	>1000	>1000
	Sementes	125	250	500
	Folhas	>1000	>1000	>1000
<i>P. tenuifila</i>	Pericarpo	>1000	>1000	>1000
	Sementes	>1000	>1000	>1000
	Folhas	>1000	>1000	>1000
Gentamicina		2,5		

Os resultados da tabela 37 indicam que, os extratos hidroalcoólicos das culturas dos diferentes tipos de calos testados de *P. setacea* não apresentaram atividade antibacteriana, exceto os extratos de epicótilo, na ausência de ácido salicílico, que apresentaram boa atividade para *S. aureus* (CIM: $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e atividade moderada diante de *E. coli* e *P. aeruginosa* (CIM: $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 37. Atividade antibacteriana (CIM) dos extratos hidroalcoólicos de culturas de calos de *P. setacea* originadas de diferentes tipos de explante cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ de Phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicitadas (Controle) ou elicitadas com 145 µM de ácido salicílico.

Tipo de explante	Tratamentos	Atividade antibacteriana (µg.mL ⁻¹)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Raiz	Controle	>1000	>1000	>1000
	Ácido salicílico	>1000	>1000	>1000
Hipocótilo	Controle	>1000	>1000	>1000
	Ácido salicílico	n.a.	n.a.	n.a.
Nó cotiledonar	Controle	>1000	>1000	>1000
	Ácido salicílico	>1000	>1000	>1000
Cotilédone	Controle	>1000	>1000	>1000
	Ácido salicílico	>1000	>1000	>1000
Nó foliar	Controle	>1000	>1000	>1000
	Ácido salicílico	>1000	>1000	>1000
Epicótilo	Controle	125	62,5	125
	Ácido salicílico	>1000	>1000	>1000
Gentamicina		2,5		

n.a= não analisado devido à não disponibilidade de extrato.

4.7.2 Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos dos pericarpos, sementes e folhas, tanto de *P. tenuifila* como *P. setacea*, indicou fraca atividade, com valores de CIM acima de 500 µg.mL⁻¹, para todas as espécies do gênero *Candida* e *Cryptococcus* (Tabela 38). No entanto, os extratos de sementes e folhas de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram ativos para a espécie fúngica *Paracoccidioides brasiliensis* (isolado Pb18). Os extratos de sementes de *P. setacea* e *P. tenuifila* apresentaram os valores de CIM iguais a 125 µg.mL⁻¹, enquanto que os extratos das folhas apresentaram valores de 62,5 µg.mL⁻¹ e 31,25 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 38. Atividade antifúngica (CIM) dos extratos hidroalcoólicos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, contra oito espécies de fungos, na concentração de 500 mg.mL⁻¹.

Espécies	Espécies de fungos	Atividade antifúngica (µg mL ⁻¹)		
		Pericarpo	Semente	Folha
<i>P. tenuifila</i>	<i>C. albicans</i>	>500	>500	>500
	<i>C. glabrata</i>	>500	>500	>500
	<i>C. tropicalis</i>	>500	>500	>500
	<i>C. parapsilosis</i>	>500	>500	>500
	<i>C. krusei</i>	>500	>500	>500
	<i>C. gatti</i>	>500	>500	>500
	<i>C. neoformans</i>	>500	>500	>500
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	500	125	31,25
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	500	125	31,25
<i>P. setacea</i>	<i>C. albicans</i>	>500	>500	>500
	<i>C. glabrata</i>	>500	>500	>500
	<i>C. tropicalis</i>	>500	>500	>500
	<i>C. parapsilosis</i>	>500	>500	>500
	<i>C. krusei</i>	>500	>500	>500
	<i>C. gatti</i>	>500	>500	>500
	<i>C. neoformans</i>	>500	>500	>500
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	500	125	62,5
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb18)	500	125	62,5

4.7.3 Atividade antiprotozoário

4.7.3.1 Atividade leishmanicida

Na tabela 39 estão demonstradas as atividades dos extratos hidroalcoólicos de pericarpos, sementes e folhas de *P. setacea* e *P. tenuifila*. Pode-se observar que houve uma pequena percentagem de inibição pelo extrato das sementes de *Passiflora setacea* ($5,82 \pm 0,55\%$), não sendo observada qualquer atividade nos demais extratos, para as duas espécies.

Tabela 39. Percentagem de inibição do crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses* pelos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* na concentração de 50 mg.mL⁻¹.

Extratos	Espécie	
	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. setacea</i>
Pericarpo	Sem atividade	Sem atividade
Sementes	Sem atividade	5,82 ± 0,55
Folhas	Sem atividade	Sem atividade
Anfotericina (20 µM)	87,41 ± 0,48	

Os extratos hidroalcoólicos de culturas de calos originados de sementes imaturas e de segmentos caulinares de *P. tenuifila*, cultivados *in vitro*, com sacarose ou frutose, em diferentes tempos de cultivo de 45, 60 e 75 dias, foram testados contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* (Tabela 40). Observa-se que, os níveis de atividade dos extratos foram baixos em relação à Anfotericina, sendo que as maiores percentagens de inibição de 6,33%, 4,83% e 24,56%, foram observadas em extratos de calos de caule, cultivados em sacarose, aos 45, 60 e 75, dias, respectivamente.

Tabela 40. Percentagem de inibição do crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses* pelos extratos hidroalcoólicos de diferentes tipos de calos de *P. tenuifila*, cultivados, por diferentes períodos de tempo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose ou frutose, 2 g.L⁻¹ de phytagel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicítadas (Controle).

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)	Tratamento
		Controle
Sementes imaturas	45	1,89 ± 0,28
	60	1,11 ± 0,60
	75	2,36 ± 0,06
Caules em frutose	45	Sem atividade
	60	2,56 ± 0,22
	75	Sem atividade
Caule em sacarose	45	6,33 ± 0,53
	60	4,83 ± 1,54
	75	24,56 ± 2,16
Anfotericina 2 µM	-	72,10 ± 3,08

A tabela 41 mostra os valores de percentagens de inibição do crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses* pelos extratos hidroalcoólicos de culturas de calos de *P. setacea*, cultivados *in vitro*, em diferentes tempos de cultura, de 30, 45 e 60 dias, elicítadas ou não com ácido salicílico. Observa-se que, no controle, os níveis de atividade dos extratos foram muito baixos em relação à anfotericina e variaram com o tipo de calo e, para cada tipo de calo, com o decorrer do tempo de cultivo, sendo que as maiores percentagens de inibição foram observadas em extratos de calos de epicótilo (7,15%), de raiz (6,95%) e de nó foliar (4,99%), aos 45 dias de cultivo, valores similares ao observado em extratos de sementes de *P. setacea*, de 5,82% (Tabela 39).

A elicitação com ácido salicílico elevou as percentagens de inibição, em relação aos controles, para 56,67% e 55,79%, respectivamente, em calos de cotilédone e hipocótilo, aos 30 dias de cultivo, valores quase 10 vezes maiores do que a atividade observada em extratos de sementes de *P. setacea* e 2,3 vezes maior do que o maior valor observado nos calos de caule de *P. tenuifila*, cultivados em sacarose. Em calos de nó cotiledonar, aos 30 dias de cultivo, e nos calos de raiz, aos 30 e 45 dias de cultivo, os percentuais de inibição aumentaram, em relação aos controles, para 35,89%; 39,30% e 31,12%,

respectivamente, valores aproximadamente 6 vezes maiores do que o observado em extratos de sementes. Os calos de cotilédone e de epicótilo, aos 30 dias de cultivo, que não apresentaram atividade no controle, passaram a apresentar inibição, após a elicitação com ácido salicílico.

Tabela 41. Percentagem de inibição do crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses* pelos extratos hidroalcoólicos de diferentes tipos de calos de *P. setacea*, cultivados, por diferentes períodos de tempo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2 g.L⁻¹ de phytigel e 2,5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, não elicidadas (Controle) ou elicidadas com 145 µM de ácido salicílico.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)	Tratamento	
		Controle	Ácido salicílico
Cotilédone	30	Sem atividade	n.a.
	45	Sem atividade	56,67 ± 1,25
	60	2,00 ± 0,56	9,26 ± 0,95
Nó foliar	30	3,61 ± 0,57	Sem atividade
	45	4,99 ± 0,17	n.a.
	60	1,93 ± 1,04	n.a.
Hipocótilo	30	0,89 ± 0,05	n.a.
	45	Sem atividade	55,79 ± 4,30
	60	3,25 ± 0,13	Sem atividade
Nó cotiledonar	30	1,27 ± 0,08	n.a.
	45	Sem atividade	35,89 ± 1,87
	60	2,21 ± 0,26	n.a.
Raiz	30	3,53 ± 0,45	n.a.
	45	6,95 ± 0,31	39,30 ± 3,07
	60	2,00 ± 0,24	31,12 ± 1,66
Epicótilo	30	Sem atividade	n.a.
	45	7,15 ± 0,56	21,66 ± 2,37
	60	3,56 ± 0,99	n.a.
Anfotericina 2 µM		72,10 ± 3,08 µM	96,53 ± 0,58 µM

AS= ácido salicílico. n.a.= não analisado devido à não disponibilidade de extrato.

4.7.3.2 Atividade tripanocida

A atividade tripanocida foi avaliada através da observação da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Na tabela 42 observa-se que, apenas os extratos hidroalcoólicos dos pericarpos de *P. setacea* e *P. tenuifila* mostraram uma pequena percentagem de inibição de crescimento, $6,35 \pm 0,95\%$ e $4,44 \pm 0,74\%$, respectivamente.

Tabela 42. Percentagem de inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* pelos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* na concentração de 50 mg.mL^{-1} .

Extratos	Espécie	
	<i>P. tenuifila</i>	<i>P. setacea</i>
Pericarpo	$4,44 \pm 0,74$	$6,35 \pm 0,95$
Sementes	Sem atividade	Sem atividade
Folhas	Sem atividade	Sem atividade
Benzonidazol ($20 \mu\text{M}$)	$87,41 \pm 0,48$	

Na tabela 43 são demonstradas as percentagens de inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, pelos extratos hidroalcoólicos de culturas de calos de sementes imaturas e de caule de *P. tenuifila*, cultivadas *in vitro*, em sacarose e frutose, em diferentes tempos de cultivo de 45, 60 e 75 dias. Os valores de inibição dos tratamentos foram inferiores à percentagem de inibição do controle positivo benzonidazol ($85,94\%$). No entanto, os valores de atividade antiprotozoário variaram com o tipo de tratamento e com o decorrer do tempo de cultivo. A maior percentagem de inibição foi encontrada em calos de caule, em sacarose, aos 75 dias de cultivo ($39,62\%$), valor 8,9 vezes maior do que o observado em extratos de pericarpo de *P. tenuifila*.

Tabela 43. Percentagem de inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* pelos extratos hidroalcoólicos de culturas de calos *in vitro*, não elicitada de *Passiflora tenuiflora* em diferentes tempos de cultura na concentração de 50 mg.mL⁻¹.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)	Tratamentos
		Controle
Semente imatura	45	2,41 ± 1,20
	60	20,20 ± 1,75
	75	Sem atividade
Caule em frutose	45	Sem atividade
	60	13,15 ± 0,76
	75	Sem atividade
Caule em sacarose	45	1,53 ± 0,24
	60	39,62 ± 1,37
	75	Sem atividade
Benzonidazol 20 µM		85,94 ± 1,29

As percentagens de inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, pelos extratos hidroalcoólicos de culturas *in vitro* de calos de *P. setacea*, em diferentes tempos de cultivo de 30, 45 e 60 dias, na ausência e na presença de ácido salicílico, são demonstradas na tabela 44. Observa-se que os níveis de atividade dos extratos variaram com o tipo de calo e com o decorrer do tempo de cultivo. As maiores percentagens de inibição de 28,56% e 24,34% foram observadas no controle, respectivamente, em extratos de calos de nó foliar e de raiz, aos 45 dias de cultivo. Apesar desses valores terem sido inferiores à percentagem de inibição de 20 µM de benzonidazol (85,94%), foram 4,5 e 3,8 vezes superiores, respectivamente, aos níveis de atividade observados em extratos de pericarpo, de 6,35% de *P. setacea* (Tabela 44).

Tabela 44. Percentagem de inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* pelos extratos hidroalcoólicos de culturas de calos *in vitro*, elicitadas com ácido salicílico (145 mM) e não elicitada (sacarose) de *Passiflora setacea* em diferentes tempos de cultura na concentração de 50 mg.mL⁻¹.

Tipo de explante	Tempo de cultivo (dias)	Tratamentos	
		Controle	Ácido salicílico
Cotilédone	30	Sem atividade	Sem atividade
	45	Sem atividade	n.a
	60	11,40 ± 3,43	n.a
Nó foliar	30	Sem atividade	Sem atividade
	45	28,56 ± 4,00	n.a
	60	Sem atividade	n.a.
Hipocótilo	30	4,83 ± 0,65	Sem atividade
	45	10,62 ± 0,90	Sem atividade
	60	Sem atividade	n.a.
Nó cotiledonar	30	Sem atividade	Sem atividade
	45	7,03 ± 1,41	n.a.
	60	Sem atividade	n.a.
Raiz	30	Sem atividade	Sem atividade
	45	24,34 ± 1,56	Sem atividade
	60	Sem atividade	n.a.
Epicótilo	30	Sem atividade	Sem atividade
	45	1,68 ± 0,82	n.a.
	60	Sem atividade	n.a.
Benzonidazol 20 uM		85,94 ± 1,29	

n.a= não analisado devido à não disponibilidade de extrato.

Verifica-se que, mesmo os extratos de calos de cotilédone, aos 60 dias de cultivo e calos de hipocótilo, aos 45 dias de cultivo apresentaram percentagens de inibição de 11,40% e de 10,62%, respectivamente, também maiores do que os extratos de pericarpo.

A elicitação com ácido salicílico, nos casos dos extratos analisados, ou não teve efeito ou teve efeito negativo sobre a atividade

tripanocida dos extratos, como observado para os calos de hipocótilo, aos 30 e 45 dias de cultivo e calos de raiz, aos 45 dias de cultivo.

5 DISCUSSÃO

5.1 PERFIS QUANTITATIVOS DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, CAROTENOIDES, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE CALOS DE *P. tenuifila* E *P. setacea*, EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*.

5.1.1 Fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram nas Figuras 12A e 12B que o cultivo dos calos de caule de *P. tenuifila*, em frutose e a elicitação com o ácido salicílico, por 21 dias, promoveu o máximo acúmulo de fenólicos totais e a máxima atividade antioxidante dos extratos. Mostraram, também, que os calos de cotilédone de *P. setacea*, em sacarose e elicitados, pelo mesmo período, com ácido salicílico, produziram os maiores níveis de fenólicos totais, flavonoides e a máxima atividade antioxidante..

O único relato encontrado na literatura, sobre elicitação de culturas *in vitro* do gênero *Passiflora* refere-se ao estudo que foi conduzido por Antognoni *et al.* (2007), que demonstraram o efeito da radiação UV-B na produção de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de calos das folhas de *Passiflora quadrangularis*. Os autores observaram que a atividade antioxidante, pelo método de inibição do radical livre DPPH, apresentou valor máximo de 49%; essa atividade antioxidante foi inferior à atividade obtida no presente trabalho para os calos de *P. tenuifila*, cujos valores na ausência e na presença do elicitor ácido salicílico foram de 58,6% e 74,2% (Figura 12D), respectivamente, e similar à atividade antioxidante de 43,51% observada para os calos de cotilédone de *P. setacea*, elicitados e cultivados sem sacarose.

Mais recentemente, Lugato *et al.* (2014) analisaram os extratos de calos de *P. alata* pelo método de Folin-Ciocalteu e obtiveram teores de fenólicos equivalentes a 5,97 mg AG/ g de biomassa seca. Essa concentração foi semelhante ao teor de fenólicos totais (6,01 mg AG/ g biomassa seca) obtido nas culturas de calos de *P. tenuifila*, aos 14 dias

de elicitação, quando crescidos em frutose. Porém, o conteúdo de compostos fenólicos foi 1,5 vezes maior nos calos de *P. tenuifila*, crescidos em frutose e elicitados com ácido salicílico por 21 dias, apresentando desempenho superior em relação aos calos de *P. alata* na produção de compostos fenólicos *in vitro*. Já o nível máximo de fenólicos totais observados em calos de cotilédone de *P. setacea* foi de 3,7 mg AG/ g de biomassa seca, valor menor do que o encontrado em *P. alata*. O incremento de compostos fenólicos tanto nos calos de *P. tenuifila*, como nos calos de *P. setacea*, pode estar relacionado com a capacidade do ácido salicílico em induzir a expressão de genes, que codificam diferentes respostas relacionadas com a defesa, ativando assim, as enzimas envolvidas na biossíntese de fenólicos pela via de fenilpropanóides (HOU *et al.*, 2014). Resultados similares aos obtidos no presente trabalho para calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* foram observados por Dong *et al.* (2010), em que o ácido salicílico estimulou a atividade da enzima FAL (fenilalanina amônia liase), em culturas de células de *Salvia miltiorrhiza* (Lamiaceae), resultando no aumento dos compostos fenólicos, ácido salvianólico B e ácido cafeico. Segundo esses autores, a aplicação de ácido salicílico atuou na regulação da atividade de várias enzimas de biossíntese como a FAL e a tirosina-aminotransferase (TAT), e as enzimas envolvidas na modulação do estresse oxidativo como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POD).

No estudo conduzido por Ali *et al.* (2018), a maior atividade de captura do radical livre foi correlacionada com a atividade da FAL nas culturas de células de *Ajuga bracteosa* (Lamiaceae) elicitadas com 0,5 mg.L⁻¹ de metil jasmonato e cultivadas na ausência de luz/penumbra. Curiosamente, os valores mais elevados da SOD (4,5 U/mg.proteína) e POD (3,1 U/mg.proteína), foram observados nas mesmas culturas, assim como a maior concentração de fenólicos e flavonoides.

Um fato interessante observado nessa pesquisa foi que o estímulo da produção de compostos fenólicos nas culturas de calos de *P. tenuifila*, em frutose e elicitadas com ácido salicílico, não foi acompanhado pelo aumento correspondente no nível de flavonoides que, ao contrário, decresceu. Por outro lado, em culturas de calos de cotilédone de *P. setacea*, em sacarose e elicitadas com ácido salicílico, houve tendência da maior produção de compostos fenólicos ter sido acompanhada da maior produção de flavonoides, pela maioria dos tipos de calos. No entanto, os resultados obtidos para os calos de *P. tenuifila* diferiram do efeito promotor do ácido salicílico sobre a produção de isoflavonoides que foi observado por outro estudo realizado em cultura

de raízes em cabeleira de *Pueraria candollei* (Fabaceae) (UDOMSUK *et al.*, 2011) e indica que, nos extratos metanólicos de calos de *P. tenuifila*, outros grupos de compostos fenólicos, com alta capacidade de capturar radicais livres, podem ter sido os responsáveis pela alta atividade antioxidante, enquanto que nos calos de cotilédone de *P. setacea*, o concomitante aumento dos flavonoides sugere o envolvimento dessas moléculas na maior atividade antioxidante observada. Neste sentido, os resultados obtidos por Monteiro *et al.* (2015), também indicam, apesar de terem sido desenvolvidos com folhas de espécies de *Passiflora*, que houve correlação linear positiva entre o conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante. Enquanto que estes autores relataram a existência de correlação negativa entre o conteúdo de flavonoides e atividade antioxidante, confirmando que, nem sempre, no gênero *Passiflora* os flavonoides se correlacionam positivamente com a atividade antioxidante.

Nos calos de *P. tenuifila*, as diferenças observadas nos coeficientes de correlação linear obtidos entre atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos, flavonoides e luteína, em frutose e sacarose, indicam que, em sacarose, apesar das concentrações desses metabólitos secundários terem sido inferiores do que em frutose, parece que foram produzidas, qualitativamente, moléculas mais eficientes na atividade antioxidante, como ficou demonstrado pelos altos coeficientes de correlação linear significativos, entre a atividade antioxidante e as três classes de metabólitos secundários analisadas. Estudos conduzidos por Bendini *et al.* (2006) demonstraram que a presença de *O*-difenol e catequinas nos extratos metanólicos de culturas de calos de cinco espécies de *Passiflora* estão positivamente correlacionadas com atividade antioxidante.

Considerando-se que as variações detectadas nos níveis de flavonoides nos calos de *P. tenuifila* e de *P. setacea*, tenham sido devido às diferenças no controle da biossíntese ligadas à atividade da CHS (chalcona sintase), é possível inferir que as diferenças observadas podem ter sido decorrentes da modificação na regulação da biossíntese, ligada ao genótipo e também às interações entre as fontes de carbono e o ácido salicílico, uma vez que, em calos de *P. tenuifila* redução foi mais drástica em sacarose, tanto aos 14 como aos 21 dias de elicitação e que, apenas em frutose, com 21 dias de elicitação, a adição de ácido salicílico reduziu os níveis de flavonoides, indicando que nesse caso interagiu com a fonte de carbono.

Os resultados observados no presente estudo mostraram que a suplementação das culturas de calos com de diferentes tipos de explante

de *P. setacea* com sacarose e ácido salicílico viabilizou o incremento de compostos fenólicos como confirmado pela análise fatorial entre elicitação e tipo de explante em que foi detectada a interação significativa entre dois fatores ($F= 600,51^{***}$; $p>0,001$). O sinergismo entre sacarose e ácido salicílico tem sido relatado em culturas de células de segmentos foliares de *Cayratia trifolia* (Vitaceae) elevou os teores de polifenóis (estilbeno) (ARORA *et al.*, 2010). Yu *et al.* (2006) constataram que o ácido salicílico, na concentração de 20 μM promoveu o acúmulo dos compostos derivados de fenilpropanóides (siringina, jaceosidina), devido ao aumento da atividade das enzimas FAL, chalcona síntase, chalcona isomerase e da expressão de RNAm em cultura de células de *Saussurea medusa* (Asteraceae). O ácido salicílico também influenciou a biossíntese de outras classes de metabólitos secundários, como artemisinina em folhas de *Artemisia annua* (Asteraceae) (PU *et al.*, 2009). Em cultura de calos de originadas de diferentes tipos de explante de *P. setacea*, contendo sacarose, o ácido salicílico provocou aumento significativo na produção de compostos fenólicos, na maioria dos tipos de calos analisados, mas a produção de flavonoides foi ativada apenas em alguns tipos de calos. Resultados similares apontam que a sacarose influenciou o aumento das taxas de compostos fenólicos em cultura de calos de explante de folhas e pecíolo de *Beta vulgaris* (Amaranthaceae) (YILDIZ *et al.*, 2007).

Segundo Dias *et al.* (2016), durante o crescimento e estabilização das culturas de calos, as atividades da desidrogenase celular e da citocromo c oxidase diminuem, promovendo um aumento no conteúdo de compostos fenólicos. Nas células vegetais, o ácido salicílico aumenta os níveis de H_2O_2 devido à inibição da enzima catalase (CAT), causando um estresse oxidativo que leva ao incremento da atividade não enzimática, ou seja, os metabólitos secundários (ASKARI; EHSANZADEH, 2015).

A síntese *de novo* da enzima FAL pode ser ativada pelo ataque de patógenos, ferimentos, irradiação UV, falta de ferro e fosfato e pelos fitormônios etileno, ácido jasmonico e ácido salicílico (DEHGHAN *et al.*, 2014) e a regulação atividade da CHS pode ocorrer, por controle metabólico, em que o acúmulo de flavonoides no citosol bloqueia a atividade da CHS, para evitar efeitos tóxicos e pelo controle da expressão gênica, que depende de vários fatores de transcrição (Dao *et al.*, 2011). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), por exemplo, que não apresentam a enzima CHS, não produzem flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O fato dos diferentes tipos de calos de *P. setacea*, dependerem de determinadas concentrações ótimas de ácido salicílico para desencadear a melhor produção de fenólicos e flavonoides indica diferenças entre eles quanto aos mecanismos de controle da biossíntese desses compostos. Esse fato foi comprovado pelas interações significativas entre tipo de explante e concentração de ácido salicílico, para fenólicos ($F= 194,05^{***}$; $p<0,001$) e para flavonoides ($F= 99,02^{***}$; $p<0,001$) Em estudos conduzidos por Dehghan *et al.* (2014), plântulas intactas de *Carthamus tinctorius* (Asteraceae) foram monitoradas quanto às expressões gênicas das sequências que codificam a enzima FAL (CtPAL) e a enzima CHS (CtCHS), duas sequências críticas, respectivamente nas vias dos fenilpropanóides simples e dos flavonoides. Durante o tratamento com ácido salicílico nas concentrações de 0,1 mM e 1 mM e os resultados apresentados por Dehghan *et al.* (2014) indicaram que apenas a concentração de 1 mM de ácido salicílico estimulou altos níveis de transcrição de ambas as sequências gênicas, sugerindo uma possível relação de dependência entre a concentração do ácido salicílico e os níveis de transcrição. Apesar de, no presente trabalho, os estudos terem sido realizados com calos foi possível inferir que, apenas em calos de cotilédone de *P. setacea* a concentração de 0,145 μM de ácido salicílico deve ter estimulado a transcrição de ambas as sequências gênicas, o que pode ser constatado pelos maiores níveis de produção de fenólicos e flavonoides. Já para os calos de hipocótilo e nó cotiledonar as concentrações de 290 μM e 580 μM de ácido salicílico, respectivamente, ativaram a produção de flavonoides, mas a produção de fenólicos foi ativada apenas na a concentração de 0,145 μM , em calos de hipocótilo e para calos de nó cotiledonar a produção de fenólicos não pareceu ser influenciada positivamente pelas concentrações do ácido salicílico.

Os resultados do presente trabalho mostraram que a maior produção de fenólicos totais foi estimulada, em calos de cotilédone de *P. setacea*, pela adição de ácido salicílico na concentração de 145 μM . No entanto, na literatura há relatos indicativos de variações nas concentrações ótimas requeridas para induzir a produção de fenólicos e atividade antioxidante, dependendo da espécie de planta estudada. Ali *et al.* (2008) constataram que concentrações maiores de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido salicílico (362 μM), em culturas de calos de rizomas de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) promoveram, significativamente, o aumento de compostos fenólicos e a atividade antioxidante, pelo ensaio de DPPH. Já Mewis *et al.* (2011) apontaram que em suspensão celular de

Vitis vinifera (Vitaceae), com concentrações menores, de 50 μM de ácido salicílico, ocorreu a potencialização da produção de fenólicos.

No entanto, dependendo da concentração do elicitador pode ocorrer um decréscimo nos níveis de metabólitos secundários, o que foi confirmado em culturas de calos de *P. setacea*, originados de segmentos de cotilédones, quando submetidos ao tratamento com ácido salicílico, nas concentrações de 580 μM e 2320 μM , produzindo menores níveis de fenólicos e de flavonoides. Dados similares foram reportados por Walker *et al.* (2002), mostrando que, o ácido salicílico inibiu o crescimento de biomassa e a biossíntese de naftodiantronas em suspensões celulares de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae). Da mesma forma, Ram *et al.* (2013), em cultura de calos de cultivar de *Rosa hybrida* (Rosaceae), observaram que o aumento das dosagens de ácido salicílico levou à diminuição das taxas de biossíntese de antocianinas.

Os resultados obtidos para os diferentes tipos de calos de *P. setacea* mostraram que a importância da otimização das concentrações dos elicitores, para cada tipo de calo produzido, pode estar ligada às diferenças quanto às vias de metabolismo e sinalização do ácido salicílico.

5.1.2 Carotenoides

As análises de carotenoides, realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que indicaram a luteína como carotenoide majoritário nos extratos de calos de diferentes tipos de explante de *P. tenuifila* e *P. setacea*, comprovam o potencial de produção *in vitro* dessas moléculas. Isto pode apontar para uma aplicação potencial desta técnica de cultivo nas agroindústrias alimentícias e fitofarmacêuticas. Não há relato na literatura, sobre o potencial de culturas de células de espécies de *Passiflora* para a produção *in vitro* de carotenoides. No momento, há apenas trabalhos preliminares por Sozo (2014) em culturas de calos, frutos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* em diferentes estágios de desenvolvimento. Porém, os níveis detectados por estes autores foram inferiores aos observados no atual trabalho. Wolfart (2015) reportou os perfis de carotenoides presentes em culturas de calos de *P. tenuifila*, originadas a partir de segmentos caulinares, em diferentes fontes de carbono e concentrações de ácido naftaleno acético (ANA), destacando a luteína, a zeaxantina e o α -caroteno como os carotenoides majoritários. Vanegas-Espinoza *et al.* (2011) relataram que

a presença de luteína em culturas de calos de folhas de *Tagetes erecta* (Asteraceae) ocorreu, não apenas em tecidos especializados, mas também em tecidos indiferenciados, de culturas *in vitro*.

Nos tecidos vegetais, a produção de luteína depende da ativação da enzima licopeno ϵ -ciclase (ϵ -LCY), que converte licopeno em δ -caroteno, da enzima licopeno β -ciclase (β -LCY), que converte o δ -caroteno em α -caroteno, e das enzimas hidroxilases envolvidas na conversão do α -caroteno em luteína (NISAR *et al.*, 2015). Os resultados do presente trabalho sugerem que essa via de biossíntese foi otimizada, nos calos de segmentos de caule de *P. tenuifila*, pela frutose, na ausência de elicitação e aos 71 dias do ciclo de cultivo dos calos e ainda mais, nos calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, em sacarose e elicitados, que produziram 3,9 vezes mais do que os calos de *P. tenuifila*.

Os maiores valores de luteína encontrados nos calos de caule de *P. tenuifila* mantidos em frutose, e nos calos de nó foliar de *P. setacea*, em sacarose e elicitados, poderiam estar associados aos baixos níveis de açúcares solúveis totais nos calos e poderiam estar relacionadas com as condições de estresse das culturas. Isto pode ocorrer devido à exaustão da fonte de carbono e de outros nutrientes, desencadeando o acúmulo de EROs e ativando os mecanismos de proteção antioxidantes, através da maior produção de moléculas de polifenóis, carotenoides e de atividade antioxidante (KEUNEN *et al.*, 2013). Slesak *et al.* (2006) demonstraram que o estresse nutricional provocado em cotilédones de *Trifolium repens* cultivados *in vitro*, em meio de cultura líquido MS, na ausência de açúcares solúveis foi acompanhado do aumento significativo da atividade da enzima SOD, em relação aos cultivados na presença de sacarose, glicose ou frutose. Segundo esses autores, o aumento da atividade dessa enzima provocaria o sequestro da maior quantidade de EROs, produzida nessa condição de cultura limitante para o metabolismo.

Divya *et al.* (2014) salientam que, em plantas de coentro, a aplicação do ácido salicílico interferiu na taxa fotossintética, aumentando, assim, os teores de carotenoides, para minimizar os danos causados pela foto-oxidação. Do mesmo modo, a análise da expressão gênica confirmou que muitos dos genes envolvidos na biossíntese de astaxantina, por exemplo, são regulados, positivamente, pelo ácido salicílico, na alga unicelular de água doce da espécie de *Haematococcus pluvialis* (GAO *et al.*, 2012), o que poderia explicar os aumentos significativos de luteína nos calos de nó foliar, de cotilédone e epicótilo de *P. setacea*, em relação aos controles não elicitados.

Benítez-García *et al.* (2014) afirmam que uma forma de aprimorar a produção de carotenoides consiste na adoção de estratégias biotecnológicas ambientalmente seguras, como fermentações microbianas, de bactérias e fungos, microalgas, manipulação genética e sistemas de cultura *in vitro* de células e tecidos de plantas. Portanto, a otimização da produção de luteína, por calos de caule de *P. tenuifila*, em frutose e calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, em sacarose e elicitados com ácido salicílico deve ser considerada como relevante, demonstrando o potencial de aplicação de abordagens biotecnológicas, via cultura de células *in vitro*, para a produção desses pigmentos, visto que essa xantofila tem potencial efeito protetor (NAMITHA; NEGI, 2010).

5.1.3 Açúcares solúveis totais

Os diferentes níveis de açúcares solúveis totais encontrados nos calos de *P. tenuifila* cultivados em frutose e sacarose sugerem que estes poderiam estar modulando, de forma diferenciada, os metabolismos primário e secundário e a produção de substâncias antioxidantes. Rosa *et al.* (2009) afirmam que os açúcares solúveis, sacarose e hexoses, principalmente glicose e frutose, podem atuar como mensageiros primários e regular sinais que controlam a expressão de diferentes genes e as atividades das enzimas sacarose sintase, que converte a sacarose em UDP-glicose, da invertase e da sacarose fosfato sintase, o que asseguraria a ótima síntese e uso do carbono e das fontes de energia. Assim, as células com seus sensores independentes para sacarose e hexoses, percebem variações nas taxas dessas moléculas e fornecem essa informação, para diferentes vias de transdução de sinais, afetando as enzimas envolvidas na síntese e degradação das moléculas de sacarose.

Rosa *et al.* (2009) afirmam que a eficiência da sacarose na via glicolítica depende do número de hexoses fosforiláveis produzidas, sendo que a ação da invertase amplifica o sinal metabólico em relação à sacarose sintase, produzindo duas hexoses fosforiláveis para a via glicolítica enquanto que a sacarose sintase produz apenas uma hexose fosforilável. Ressaltaram ainda que, em plantas, um complexo de enzimas com diferentes afinidades e especificidades são capazes de fosforilar, não somente a glicose (glicocinases), mas também a frutose (frutocinases) ou ambos, glicose e frutose (hexocinases). Assim, uma outra possibilidade para explicar a maior eficiência da frutose no metabolismo secundário dos calos de *P. tenuifila*, poderia ser a maior

eficiência da frutocinase em relação à hexocinase, aumentando o aporte de moléculas fosforiladas, a partir da frutose, para as etapas seguintes da via glicolítica e também para a via oxidativa das pentoses-fosfato, rota metabólica de produção de NADPH, que contribui para o sequestro de espécies reativas de oxigênio (COUÉE *et al.* 2006). Em plantas de *Arabidopsis*, Rosa *et al.* (2009) relatam que a atividade de fosforilação foi mais alta com frutose do que com glicose, sendo a frutocinase a enzima de fosforilação ativa, enquanto que a hexocinase, que mostrou reduzida afinidade por frutose, estava presente em níveis relativamente baixos.

Assim, pode-se inferir que a baixa eficiência da sacarose no metabolismo secundário dos calos de *P. tenuifila* pode ter ocorrido através do processo de ativação das enzimas de degradação dessa molécula e/ou da subsequente fosforilação pelas cinases, reduzindo a disponibilidade de moléculas de glicose-6-fosfato e de frutose-6-fosfato para as vias de biossíntese de fenólicos totais, flavonoides e carotenoides (TAIZ; ZEIGER, 2013). As análises complementares dos açúcares solúveis totais nos calos e no meio de cultura e a identificação dos tipos de hexoses presentes poderão contribuir para elucidar as causas das diferenças nos perfis metabólicos dos calos crescidos em frutose e em sacarose.

O fato dos teores de açúcares solúveis totais, nos calos de *P. tenuifila* terem diminuído na presença de ácido salicílico, tanto em frutose, quanto em sacarose, em ambos os tempos de elicitação testados e, o fato dessa queda ter sido acompanhada, nos dois tempos de elicitação, e em alguns tratamentos, pela diminuição dos níveis de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, luteína sugere que o ácido salicílico pode ter tido um efeito no metabolismo secundário dos calos, decorrente da ação no metabolismo primário dos carboidratos. Nesses casos, o ácido salicílico pode ter interferido, diminuindo a eficiência do metabolismo das moléculas de sacarose e frutose, na via glicolítica, que forneceria os precursores para a produção de metabólitos secundários.

O maior acúmulo em biomassa seca dos calos de *P. tenuifila* em frutose, tanto aos 14 dias como aos 21 dias de elicitação com ácido salicílico, em que também foram observados os níveis mais baixos de açúcares solúveis totais, sugere que o ácido salicílico pode ter atuado direcionando os esqueletos de carbono para a maior produção de biomassa seca. Porém, em detrimento de atividades metabólicas tais como, biossíntese de flavonoides, carotenoides e luteína, desencadeando, contudo, as maiores atividades antioxidantes, e aos 21 dias de elicitação, a maior produção de fenólicos totais. O efeito

promotor do ácido salicílico no crescimento de calos *in vitro* foi observado também por Galal (2012) em *Ziziphus spina-christi* (Rhamnaceae) e no incremento em massa fresca e seca de ramos de *Chlorophytum borivilianum* (Liliaceae) cultivados *in vitro* (BABEL *et al.*, 2014).

As análises dos níveis de açúcares solúveis totais nas culturas de calos de *P. tenuifila* crescidos em sacarose e frutose, elicítadas ou não, demonstraram que, em sacarose, ocorreram as maiores concentrações de açúcares solúveis totais mas os menores níveis de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante, carotenoides e luteína. Em experimento preliminar realizado por Wolfart (2015), o nível de amido nos calos de *P. tenuifila* cultivados em sacarose também foi superior ao observado nos calos em frutose, indicando que a sacarose foi metabolizada pelas células dos calos e utilizada na produção de amido, forma de armazenamento de carboidratos, que ocorre nos tecidos vegetais, em resposta à presença de altas concentrações de açúcares solúveis. Portanto, os baixos níveis de metabólitos secundários, nos calos mantidos em sacarose, podem ter sido devidos às alterações na eficiência da via glicolítica na produção dos precursores, ou poderiam ser devidos à regulação metabólica que sinalizou priorizando a rota de armazenamento dos açúcares solúveis totais, na forma de amido.

A maior eficiência da frutose em relação à sacarose, na promoção da biossíntese de fenólicos totais, nos calos de *P. tenuifila*, mesmo na ausência de ácido salicílico, pode estar relacionada com o fato de que, de acordo com Rosa *et al.* (2009), nem todos os açúcares solúveis totais desempenham funções semelhantes no metabolismo das plantas sob estresse, sendo que a sacarose e glicose atuam como substrato para a respiração celular ou para manter a osmoregulação das células, enquanto que a frutose não estaria relacionada com a osmoregulação, parecendo estar mais relacionada com a síntese de metabólitos secundários, conforme demonstrado por Hilal *et al.* (2004), em que a frutose poderia estar relacionada com a síntese de eritrose-4-fosfato, que atua como substrato na síntese de lignina e compostos fenólicos.

As variações nas concentrações de açúcares solúveis totais e de metabólitos secundários, entre os diferentes tipos de calos de *P. setacea*, não elicítados ou elicítados, sugerem a importância da origem dos explantes utilizados para iniciar as culturas, na determinação da eficiência dos sistemas de cultura *in vitro* desenvolvidos, potencializando, em diferentes níveis, a expressão das vias de biossíntese de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, luteína e de

outros compostos com atividade antioxidante. Slesak *et al.* (2006), também demonstraram diferenças fisiológicas, entre as atividades das formas da superóxido dismutase, em explantes de cotilédone e de hipocótilo de *Trifolium repens* (Fabaceae), cultivados *in vitro*, em meio líquido, em meios de cultura contendo sacarose, glicose e frutose.

Tanto nos calos de *P. setacea* crescidos na presença como na ausência de ácido salicílico, foram observadas variações, entre os diferentes tipos de explante em relação aos conteúdos de açúcares solúveis totais, demonstrando as diferenças fisiológicas entre os calos, no metabolismo primário. Talvez a eficiência maior ou menor, na degradação da sacarose, em glicose e frutose, que serão transformadas nas hexoses fosfato, glucose-6-fosfato e de frutose-6-fosfato, disponibilizou quantidades diferentes de esqueletos de carbono, para as vias de biossíntese dos metabólitos secundários. Um resultado importante foi o ácido salicílico ter contribuído para aumentar os níveis de açúcares solúveis totais, na maioria dos calos, mas diminuindo esses níveis em calos de raiz e nó foliar, sugerindo que poderia estar atuando na regulação da via glicolítica, modulando o metabolismo da sacarose, fornecida no meio de cultura, e indiretamente afetando a produção de metabólitos secundários nos calos de *P. setacea*.

A sacarose pode ser utilizada pelos explantes sendo que, a quantidade de açúcares solúveis totais, glicose e frutose, gerada pela decomposição, em cada tipo de calo, pode estimular, em maior ou menor nível, a respiração mitocondrial, aumentando a produção de EROs e a ativação de mecanismos antioxidantes enzimáticos, como a atividade da MnSOD, para evitar o acúmulo de EROs (SLESACK *et al.*, 2006). Assim, pode-se considerar que as altas concentrações de açúcares solúveis totais, potencializadas, nos calos de *P. setacea*, pela ação do ácido salicílico, em especial nos calos de cotilédone, tenham contribuído para ativar os mecanismos antioxidantes, seja através de mecanismos enzimáticos, não analisados no presente trabalho, e de mecanismos não enzimáticos, via ativação da maior produção de compostos fenólicos, flavonoides e de outros compostos. Estes últimos podem ter contribuído no aumento da atividade antioxidante em todos os tipos de calos, como constatado. Uma das evidências para isso foram as altas correlações lineares detectadas entre as concentrações de açúcares solúveis totais e a produção de fenólicos totais, nos calos de *P. setacea*, elicitados ou não.

A diversidade de respostas fisiológicas dos calos originados a partir de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*, além da relativa facilidade na manutenção das culturas, do crescimento rápido e da facilidade de manipulação do meio de cultura, tornam esses sistemas de

cultura *in vitro* excelentes ferramentas para futuros estudos dos mecanismos antioxidantes e dos metabolismos primário e secundário, e de como podem ser afetados por fatores bióticos e abióticos, como fontes de carbono e hormônios, como o ácido salicílico.

5.2 Perfis qualitativos de compostos fenólicos de extratos de pericarpos, sementes e folhas de *P. tenuiflora* e *P. setacea* e de calos cultivados *in vitro* de *P. setacea*.

Entre os ácidos fenólicos, o ácido protocatecuico, ácido salicílico e ácido *p*-cumárico foram identificados em todos os extratos de pericarpo, sementes e folhas de *P. tenuiflora* e *P. setacea* e nos calos de *P. setacea* analisados. O ácido protocatecuico foi considerado como apresentando efeito neuroprotetor *in vivo*, prevenindo a redução da sobrevivência celular induzida por H₂O₂, uma espécie reativa de oxigênio. O ácido protocatecuico pode atuar reduzindo a concentração de peróxidos lipídicos e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SHI *et al.*, 2006). O mesmo composto tem sido reportado como quimiopreventivo devido à capacidade de inibir a produção de radicais livres e aumentar a ativar as enzimas antioxidantes (TANAKA *et al.*, 2011). Ensaios *in vitro* mostraram que os ácidos cafeico e *p*-cumárico protegeram os neurônios contra lesões causadas pela 5-S-Cisteinil-Dopamina, que possui neurotoxicidade e pode contribuir para a progressão da doença de Parkinson (VAUZOUR; CORONA SPENCER, 2010).

No presente trabalho verificou-se a presença de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) em determinadas matérias vegetais. O ácido gálico ocorreu em extratos de pericarpos e folhas de *P. tenuiflora* e *P. setacea*, em sementes de *P. tenuiflora* e foi detectado pelo método de extração com líquido pressurizado em calos de cotilédone de *P. setacea*, cultivados em sacarose. O ácido elágico ocorreu apenas em extratos de folhas de *P. setacea* e em calos de cotilédone de *P. setacea* cultivados em frutose. Os polifenóis nas plantas desempenham diversas funções bioquímicas com implicações em adaptações ecológicas. Como exemplo tem-se os taninos nos tegumentos das sementes protegem o embrião e o endosperma contra fatores bióticos, também impedem a antecipação da germinação, bloqueando o fluxo de moléculas sinalizadoras, que neutralizam a dormência das sementes. Outro aspecto, refere-se ao fato de que os taninos possuem capacidade de se ligar às

proteínas, assim agindo como fitoquímicos antioxidantes ou pró-oxidantes (CONSTABEL *et al.*, 2014).

Os extratos de pericarpo, sementes, folhas de ambas as espécies e de calos de *P. setacea* cultivados *in vitro* apresentaram compostos fenólicos, cujos efeitos já foram citados na literatura como antioxidante, antidepressivo, antidiabético e com propriedade anti-inflamatórias (ZENI *et al.*, 2017; HOON KIM *et al.*, 2017; VINOITHIYA; ASHOKKUMAR, 2017). Estudos anteriores realizados por Saravanan *et al.* (2014); Saravanan; Parimelazhagan, (2014); Costa *et al.* (2015) e Viganó *et al.* (2016) com as espécies de *P. edulis*, *P. alata*, *P. incarnata*, *P. leschenaultii*, *P. mollissima*, *P. tripartita*, *P. ligularis* e *P. quadrangularis* demonstraram funções biológicas associadas ao ácido elágico, ácido gálico, isoorientina, orientina, vitexina e rutina. Olafsdottir *et al.* (1997); Saravanan *et al.* (2014), detectaram compostos tais como ácido gálico, apigenina, catequina e derivados cumarínicos e glicosídeos cianogênicos em folhas de *Passiflora subpeltata*, os quais contribuem para propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, analgésicas, antipiréticas e hepatoprotetora (SHANMUGAM *et al.*, 2016).

Os extratos das folhas, pericarpos e de calos oriundos de nó cotiledonar e cotilédone de *P. setacea*, analisados nesse estudo, apresentaram os flavonoides C-glicosilados vitexina e isoorientina. Da mesma forma Gomes *et al.* (2016) nas folhas e Carvalho *et al.* (2018) na polpa, observaram a presença de vitexina em *P. setacea*. Esses flavonoides possuem função de proteger os vegetais contra a radiação ultravioleta (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003) e contra agentes patogênicos, como *Fusarium oxysporum* e *Fusarium culmorum* (MIERZIAK *et al.*, 2014). Nas espécies do gênero *Passiflora* é comum a presença destes isômeros, como vitexina, em *P. foetida* (SHUAYPROM *et al.*, 2016); isoorientina e isovitexina em *P. setacea* (WOSCH *et al.*, 2017). Além disso, esses flavonoides glicosilados desempenham papel farmacológico, com propriedades neuroprotetora (MACHADO *et al.*, 2016), citoprotetora e anti-inflamatória (KU *et al.*, 2014).

De acordo com resultados descritos anteriormente no item 5.4, pode-se observar que os extratos dos pericarpos e sementes, de ambas as espécies e das culturas de calos, originados de diferentes tipos de explantes de *P. setacea*, apresentaram ácido vanílico. Esse componente tem demonstrado potencial efeito anti-hiperglicêmico, anti-hipertensivo (VINOITHIYA *et al.*, 2017), antimicrobiano e antimalárico (VARMA *et al.*, 1993) e antibacteriano (MAURYA RAI; MAURYA, 1996). De

acordo com o processo de biossíntese, a vanilina tem como precursores os ácidos fenólicos (DAUGSCH; PASTORE, 2005).

No presente estudo o ácido salicílico foi detectado em todos os materiais vegetais. Até onde a literatura informa, o ácido salicílico tem sido encontrado nas espécies do gênero *Salix*, principalmente na casca do salgueiro, onde foi isolado pela primeira vez (EMEA, 2009; POLSKA, 2014; SULIMA *et al.*, 2017). Porém, ainda não foi relatado para o gênero *Passiflora*.

Estudos demonstraram que muitas plantas apresentam um incremento no teor de ácido salicílico após serem infectadas por vírus ou fungos, mas também após serem expostas à radiação UV ou expostas a outras condições de estresse (HELDT; PIECHULLA, 2008). Um fato que chama atenção referente às espécies aqui estudadas apresentarem genes de resistência a determinados tipos de doenças e o ácido salicílico atua como fitormônio sinalizador das cadeias de transdução de sinal, que levam à expressão das enzimas envolvidas nas reações de defesa contra estresse biótico e abiótico (YANG *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2017), podendo então estar envolvido nas respostas de defesa de ambas as espécies.

As espécies de maracujás silvestres aqui estudadas ocorrem nos Biomas Caatinga e Cerrado do Brasil e estas já foram alvo de estudos de ecologia que mostraram a correlação entre os níveis de metabólitos secundários produzidos com os níveis de estresse abiótico e biótico aos quais as plantas de *P. setacea* e *P. tenuiflora* encontram-se normalmente submetidas nesses biomas. Desta forma, pode-se inferir que os calos teriam capacidade de resposta similares àquelas características de respostas aos estressores ambientais presentes nas regiões em que estas espécies de *Passiflora* ocorrem espontaneamente.

O ácido salicílico também é um importante composto, utilizado para fins farmacológicos, por apresentar propriedades anti-inflamatórias (FURMAN, 2018). Esse fato sugere que, os extratos oriundos de pericarpos, sementes e folhas de *P. tenuiflora* e *P. setacea*, e de calos de *P. setacea*, podem ser futuramente testados em ensaios anti-inflamatórios, para combater a infecção e lesão dos tecidos. Além disso, os efeitos sinérgicos entre os componentes bioativos de extratos vegetais podem desempenhar papel importante na atividade anti-inflamatória, muito provavelmente baseada na capacidade de inibir os danos causados ao DNA e à peroxidação lipídica (MO *et al.*, 2013; BAKASATAE *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que, as culturas *in vitro* de calos de ambas as espécies de *Passiflora* estudadas no presente trabalho, além de

serem ferramentas biotecnológicas que otimizar a produção de metabólitos secundários, são modelos formidáveis, para a elucidação de vias de biossíntese dos compostos de interesse. Essa estratégia consiste no fornecimento e incorporação de precursores biossintéticos marcados com isótopos estáveis às culturas de calos. Após a incorporação e a metabolização deste precursor, os extratos podem ser analisados e comparados com padrões, utilizando-se cromatografia líquida, para obter-se informações detalhadas sobre as vias biossintéticas.

Os valores quantitativos dos compostos encontrados nos extratos de calos deverão ser mensurados para a determinação dos compostos majoritários presentes nas amostras, para se ter a real ideia do potencial promissor dos calos de *P. setacea* cultivados *in vitro*, uma vez que não há na literatura de espécies de *Passiflora*, relatos de pesquisas nessa linha, a não ser o trabalho de Antognoni *et al.* (2007). Esses autores demonstraram que a exposição das culturas de calos de *P. quadrangularis* ao UV-B por 7 dias aumentou a produção de isoorientina e a elicitação com metil jasmonato também aumentou as concentrações de orientina, vitexina e isovitexina, enquanto que, no presente trabalho, ficou demonstrado pela primeira vez que a biossíntese de alguns desses tipos de flavonoides, como vitexina e isoorientina pode ser induzida, através da manipulação do tipo de explante, da fonte de carbono e da elicitação com ácido salicílico.

Os resultados em que, os baixos teores de compostos fenólicos e, conseqüentemente, a menor atividade antioxidante foram detectados nos extratos de calos de cotilédone de *P. setacea*, submetidos ao método de extração com CO₂ supercrítico, podem ser explicados pelo fato desse método de extração apresentar afinidade por substâncias não polares. Esses dados foram similares aos obtidos por Oliveira *et al.* (2016), nos extratos lipídicos das sementes de *Passiflora edulis*. O mesmo autor verificou que, após extração do óleo das sementes de maracujá, uma segunda extração do resíduo foi realizada com ELP, demonstrando altos teores de fenólicos e potencial de atividade antioxidante do extrato, confirmando a afinidade dos compostos antioxidantes com solventes polares.

Como visto em vários trabalhos (RAO *et al.*, 2018; HAJJI *et al.*, 2018; BUJOR *et al.*, 2018) e nos resultados aqui apresentados, a composição fenólica tem forte correlação com atividade antioxidante. Arabshahi-Delouee; Urooj (2007) comentam que, os compostos fenólicos possuem capacidade doadora de elétrons, assim neutralizando os radicais livres. A propriedade antioxidante destas moléculas atribui-se

à presença de um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila ou metoxila.

A composição fenólica dos extratos das culturas de calos de cotilédone de *P. setacea*, determinada através da metodologia de extração com líquido pressurizado, foi superior ao método convencional de maceração e extração hidroalcoólica. Vários trabalhos confirmam a eficiência do método ELP, para a extração de compostos fenólicos (PAES *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015; SETYANINGSIH *et al.*, 2016; GARCIA-MENDOZA *et al.*, 2017; ALEXANDRE *et al.*, 2017). Isso ocorre devido às condições de temperatura e pressão utilizadas, durante o procedimento de extração, que aumentam a capacidade de mistura dos solventes, como etanol e água, para solvatar compostos de polaridade intermediária. A elevada temperatura proporciona o aumento da taxa de difusão e da cinética de dessorção dos compostos (MARCUS, 2018).

Análise fatorial para os fatores relativos ao tipo de extração e espécies indicaram interações significativas ($p < 0,001$), para todas as variáveis. Desta forma, pode-se supor que composições químicas diferentes entre as sementes das espécies estudadas poderiam justificar as variações em termos de compostos extraídos do material vegetal. Portanto, o enriquecimento do extrato com um determinado metabólito secundário de interesse depende da utilização de métodos específicos para otimizar a extração dos mesmos.

5.3 Perfis de terpenos de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, em diferentes condições de cultivo *in vitro*.

A capacidade das culturas *in vitro* de biossintetizar e acumular terpenóides foi investigada em estudos anteriores realizados em suspensão celular de *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) (ALWIS *et al.*, 2008), cultura de calos de *Santalum album* (Santalaceae) (CROVADORE *et al.*, 2012), cultura de calos de espécies do gênero *Daucus* (JAWDAT *et al.*, 2016) e cultura de segmento nodal de *Plectranthus ornatus* (Lamiaceae) (PASSINHO-SOARES *et al.*, 2017). Uma observação importante do presente estudo é que o α -pineno, *D*-limoneno e *D*-germacreno ocorreram tanto em calos de *P. setacea* como em calos de *P. tenuifila*. Já o sabineno, α -tujona e β -pineno foram característicos de calos de *P. tenuifila*, indicando diferenças entre as espécies, quanto ao potencial de produção de dessas moléculas, *in vitro*, por culturas de células. No entanto, a produção de sesquiterpenos como,

o β -elemeno, γ -elemeno, *E*- α -bergamoteno e *E*-cariofileno foram característicos de calos de *P. setacea*. Esse resultado indica a possível ação das enzimas terpeno-sintases nas células visto que, estão envolvidas na biossíntese de compostos sesquiterpênicos (ZHUANG *et al.*, 2012).

A presença da fonte de carbono sacarose no meio de cultura, onde cresceram os diferentes tipos de calos estudados, foi essencial para a biossíntese de compostos terpênicos, pois, os precursores como piruvato e o 3-fosfoglicerato (3-PGA) são metabolizados, pela via do metileritritol fosfato (MEP) formadora dos monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (TAIZ; ZEIGER, 2013). O mesmo ocorre com a síntese dos sesquiterpenos e triterpenos, em que as moléculas de acetil-CoA e piruvato são metabolizadas pela via do ácido mevalônico (MVA), que é formado pela ligação de três moléculas de acetil-CoA, em uma sequência de reações, produzindo a isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica de formação dos terpenos.

Os resultados do presente trabalho indicaram a predominância do monoterpeno α -pineno no ciclo de cultura de calos de diferentes tipos de explantes de *P. setacea* e *P. tenuifila*. No entanto, as principais culturas de calos que apresentaram as maiores proporções do constituinte volátil, foram os calos de *P. setacea* oriundos dos explantes de raiz, hipocótilo e nó foliar. Esse monoterpeno tem sido citado como constituinte da espécie de maracujá amarelo (CARASEK; PAWLISZYN, 2006), também detectado em cultura *in vitro* de *Agastache rugosa* (ZIELINSKA *et al.*, 2011) e na composição do óleo essencial de caules, folhas, flores e raízes de *Chaerophyllum coloratum* (STEŠEVIĆ *et al.*, 2016). Estudos com o monoterpeno α -pineno tem demonstrado o potencial desse composto contra agentes etiológicos, tais como, *Trypanosoma evansi*, *T. cruzi* (LEAL *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2016) e *Leishmania amazonenses* na forma promastigota e amastigota (RODRIGUES *et al.*, 2015). Além disso, foram demonstrados os efeitos anticolinérgicos do α -pineno e do β -pineno, de *Pinus insularis* (Pinaceae) (SPELMAN *et al.*, 2006) e do α -pineno de *Salvia lavandulaefolia* (Lamiaceae) (PERRY *et al.*, 2000).

Somente os calos oriundos de sementes imaturas de *P. tenuifila* apresentaram o isômero volátil β -pineno. Os monoterpenos, α -pineno e β -pineno são promissores agentes antimicrobianos contra a formação de biofilmes de *Candida albicans* e na inibição da atividade fosfolipase e esterase da espécie de *Cryptococcus neoformans* (SILVA *et al.*, 2012). A atividade inibidora de acetilcolinesterase também foi comprovada para o α -pineno, linalol e elemol (MIYAZAWA *et al.*, 1998; PERRY *et al.*,

2000). É conhecido o potencial farmacológico destes compostos orgânicos voláteis, nas atividades anti-microbianas e anti-inflamatórias (OLGUNSOY *et al.*, 2017).

As culturas de calos originadas de explantes de hipocótilo e de epicótilo de *P. setacea* e de sementes de *P. tenuifila* apresentaram a predominância do monoterpeneo *D*-limoneno, em relação aos demais tipos de culturas de calos dessas espécies. Esse composto já havia sido identificado em polpas de maracujás orgânicos (MARCORIS *et al.*, 2011), no óleo dos frutos de *P. edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg., no qual, sua nota aromática remete ao eucalipto, capim-limão e citros (JANZONTTI *et al.*, 2012; LEÃO *et al.*, 2014). Estudos tem demonstrado o potencial ansiolítico deste constituinte volátil, com viés biotecnológico para aromaterapia (LIMA *et al.*, 2013), além da ação preventiva anticarcinogênica do limoneno, presente no óleo essencial de *Carum carvi* (ZHENG *et al.*, 1992b) e da ação anticolinérgica desse composto, constituinte do óleo essencial de *Citrus limon* (SPELMAN *et al.*, 2006)

O *E*-cariofileno, encontrado apenas nos calos de epicótilo de *P. setacea* (Tabela 30), também foi encontrado em folhas e caules da espécie amazônica *Rhodostemonodaphne parvifolia* (ALCÂNTARA *et al.*, 2010). Spelman *et al.* (2016) mencionaram a atividade bactericida do β -cariofileno de folhas de *Cammelia sinensis*, de óleos essenciais de sementes de *Coriandrum sativum*, de folhas de *Eucalyptus dives*. É importante ressaltar que o (-)-*E*-cariofileno isolado de óleo essencial de *Cordia verbenacea* apresentou efeito anti-inflamatório, enquanto que o β -cariofileno apresentou atividade anestésica local (FERNANDES *et al.*, 2007; GHELARDINI *et al.*, 2001), além de atividades antifúngica e anticarcinogênica. O β -elemeno, exclusivo dos calos de epicótilo de *P. setacea* também foi encontrado apenas nos caules de *R. parvifolia* e o sabineno, característico dos calos de caule e sementes de *P. tenuifila*, ocorreu apenas nas folhas dessa espécie amazônica.

O estudo conduzido, utilizando-se as mesmas técnicas de análises empregadas no presente trabalho, com o óleo de sementes de *P. setacea* e de *P. alata*, por Paula *et al.* (2015 a,b) indicou, entre os terpenos produzidos, o α -terpeniol, o geraniol, linalol, óxido de linalol, *Z*-ocimeno e o β -ocimeno, em *P. setacea* e em *P. alata*, o *E*- β -ocimeno. No óleo essencial de *P. incarnata* Buchbauer; Jirovetz (2011), através de análises com GC/ GC-MS e GC-FTIR encontraram linalol (3,2%), eugenol (1,8%), isoeugenol (1,6%), α -bergamotol (1,7%), carvona (8,1%). Mais recentemente, Calevo *et al.* (2016) analisando a composição de óleos voláteis de flores e folhas de três novos híbridos de

espécies de *Passiflora* ornamentais, por GC-FID e GC-MS e concluíram que as frações voláteis preponderantes foram os hidrocarbonetos e álcoois, enquanto que os terpenos e aldeídos ocorreram em menor quantidade. Os compostos predominantes foram o geraniol (13,7%), eugenol (3,9%) e fitol, que variou entre 14,3% e 38,5%, dependendo do híbrido. Nenhum desses constituintes voláteis foi encontrado nas culturas de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* analisados no presente trabalho. O α -pineno, em particular não apareceu nas listas de compostos voláteis em nenhuma dessas espécies de *Passiflora*, mas em calos de nó foliar de *P. setacea* foi o componente majoritário (84,28%), seguido pelos calos de hipocótilo (35,64%) e de raiz (30,74%).

A variação do número de tipos de terpenos produzidos pelos diferentes tipos de calos, no decorrer do tempo e a produção de certos tipos de terpenos, em apenas determinados períodos do ciclo de cultivo podem ser indicativos de que alterações no metabolismo dos mesmos são dinâmicas e, como consequência, afetaram a diversidade das moléculas produzidas.

O fato dos calos de epicótilo de *P. setacea* e de sementes de *P. tenuifila* terem produzido a maior diversidade de compostos, na primeira semana ou até a terceira semana de cultivo, coincidiu com a fase de maior acúmulo de massa seca pelos diferentes tipos de calos nesse período, como pode ser observado na curva de crescimento em massa seca dos mesmos. Após a quarta semana de cultivo é possível que, a depleção dos carboidratos e nutrientes do meio de cultura restringiram o metabolismo de biossíntese dos calos, o que justificaria a queda na diversidade de moléculas de terpenos, na maioria dos tipos de calos, de ambas as espécies, especialmente na quinta e sexta semanas de cultivo, mas curiosamente, não em outros tipos, como nos calos de hipocótilo. As quedas nos percentuais de terpenos totais e do α -pineno de *P. setacea*, da segunda semana em diante de cultivo, poderia, também, ser explicada pelo empobrecimento nutricional do meio de cultura, com o decorrer do tempo de cultivo.

Cabe ressaltar que nos calos de *P. setacea*, apesar da diversidade de terpenos nos calos ter se mantido alta na primeira e segunda semanas de cultivo, houve queda nos percentuais totais de terpenos, já da segunda semana em diante, em relação à primeira semana, ou seja, as quantidades totais de terpenos produzidas pelos calos diminuíram, mas a produção de novos tipos de moléculas foi evidente nas semanas seguintes, tais como: (ver na tabela).

O fato dos explantes da parte aérea das plantas jovens de *P. setacea*, como nó foliar e epicótilo terem originado calos que

produziram uma diversidade maior de moléculas de terpenos, pode estar ligado à manutenção das características metabólicas dos tecidos originais, quanto ao potencial de produção de terpenos, relacionado com o clássico papel ecológico de defesa das plantas, desempenhado pelos terpenos da parte aérea, caules e folhas. Esta mesma justificativa pode ser aplicada para explicar a maior diversidade de moléculas de terpenos encontradas em calos de sementes de *P. tenuifila*, pois as sementes, que irão originar as plantas jovens, devem ter um arsenal de genes se expressando, assim sintetizando uma grande diversidade de moléculas, incluindo os terpenos, para garantir a defesa das mesmas contra todos os possíveis ataques bióticos e abióticos (radiações UV e termais, seca, acidez do solo, por exemplo), aos quais podem estar vulneráveis, no solo, nessa fase do desenvolvimento.

A comparação dos perfis dos compostos voláteis produzidos pelos calos de *P. setacea* e *P. tenuifila* em relação aos perfis de frutos, sucos, polpas congeladas e resíduos de processamento de diferentes espécies de espécies de *Passiflora* indica que os calos cultivados *in vitro* produziram uma quantidade relativamente grande de tipos de moléculas, que não foram detectadas nos perfis de compostos voláteis, incluindo os terpenos, de outras partes das plantas e de outros materiais de outras espécies de espécies de *Passiflora*, mesmo quando a comparação foi feita, por exemplo, com o perfil dos óleos essenciais de sementes de *P. setacea*. Esse fato pode reforçar o potencial de utilização das culturas *in vitro* de calos de ambas as espécies, como fontes de produção de novas moléculas e como modelos para a realização de estudos de biossíntese de compostos específicos.

Os resultados obtidos permitiram identificar, para cada tipo de terpeno, a melhor espécie a ser utilizada, o melhor tipo de explante, para originar os calos, e o melhor período do ciclo de cultivo, em que ocorre o percentual máximo de produção. Além disso, ainda há a possibilidade de otimização da produção *in vitro* de cada classe de compostos, especialmente dos terpenos, através da manipulação da constituição do meio de cultura, fornecimento de precursores e utilização de elicitores específicos, como o metil jasmonato.

Há várias evidências na literatura de que os reguladores de crescimento podem alterar a composição de óleos essenciais produzidos por culturas *in vitro* de ramos de várias espécies. Em cultura *in vitro* de ramos de *Agastache rugosa* (Lamiaceae), Zielinska *et al.* (2011) demonstraram que a composição de monoterpénos produzidos diferiu, dependendo do tipo de auxina utilizada no meio de cultura, ácido indolacético ou picloran, enquanto que Santos-Gomes *et al.* (2003),

observaram a alteração na composição do óleo essencial produzidos por culturas de ramos *in vitro* de *Salvia officinalis* (Lamiaceae), manipulando o 2,4-D, mesmo regulador de crescimento utilizado no meio de cultura dos calos de *P. setacea* e dos calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* e em *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) onde Ribeiro *et al.* (2009) observaram o aumento na produção de timol com ácido indolacético. Além disso, Prins *et al.* (2010) relataram a ação do metil jasmonato na ativação da síntese da enzima terpeno sintase, em *Iva frutescens* (Asteraceae) e das citocininas, na ativação do metabolismo dos monoterpenos, em *Lavandula vera* (Lamiaceae) e em espécies *Mentha spicata*, *Mentha suaveolens* (Lamiaceae), por exemplo. Passinho-Soares *et al.* (2017) relataram a ação das citocininas induzindo o aumento da produção de compostos voláteis nas culturas *in vitro* de *Plectranthus ornatos* (Lamiaceae), também foi observada em *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) (AFFONSO *et al.*, 2009) e *Lavandula dentata* (Lamiaceae) (SUDRIÁ *et al.*, 1999). Crovadore *et al.* (2012) também induziram a produção de hidrocarbonetos sesquiterpênicos nos calos de *Santalum album* (Santalaceae) usando reguladores de crescimento, como 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético).

As diferenças qualitativas observadas nos perfis de compostos voláteis produzidos pelos sistemas de cultura *in vitro* de calos de *P. setacea* e *P. tenuifila*, durante o ciclo de cultivo, indicaram, pela primeira vez, o potencial de aplicação de estratégias biotecnológicas para a produção de moléculas de compostos voláteis de interesse, em especial de diferentes moléculas de terpenos, no caso dos calos de nó foliar e epicótilo de *P. setacea* e de caules e sementes de *P. tenuifila*.

5.4 Atividades biológicas dos extratos de pericarpos, sementes, folhas e calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, em diferentes condições de cultivo *in vitro*.

Os resultados da concentração inibitória mínima demonstraram que os extratos hidroalcoólicos das sementes e de calos, oriundos de segmentos de epicótilo de *P. setacea*, não expostos ao ácido salicílico, foram moderadamente efetivos contra as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Além disso, o extrato de calos de epicótilo apresentou moderada atividade frente à bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, sendo esta a principal causadora de doenças infecciosas hospitalares, gerando infecções de pequena à grande proporção, como por exemplo, pneumonia, septicemia, osteomielite e endocardite

(ARCHER; CLIMO, 2001). As atividades antibacterianas observadas no ensaio *in vitro*, realizado com os respectivos extratos hidroalcoólicos, podem ser atribuídas à ação de compostos fenólicos, que foram encontrados na análise por LC-MS/MS, tais como ácido salicílico, ácido protocatecuico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido ferulico, taxifolina e eriodictiol. No entanto, os compostos presentes nos extratos podem apresentar interações químicas, combinando-se sinergicamente, assim exibindo atividades biológicas mais pronunciadas que seus constituintes isolados (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013; CASANOVA; COSTA, 2017). Os ácidos fenólicos têm influência na permeabilidade da membrana plasmática bacteriana e sua ruptura parcial, o que reflete ainda mais na liberação de macromoléculas citoplasmáticas e morte de células bacterianas. São metabólitos secundários que apresentam boa atividade antibacteriana contra isolados gram-positivos e gram-negativos, devido à capacidade de inibir a atividade da DNA topoisomerase II (KEMPERMAN *et al.*, 2010)

Os resultados dos extratos mais ativos, de sementes e de calos de epicótilo de *P. setacea*, foram interessantes, visto que ambos apresentaram atividade relevante contra bactérias gram-negativas, uma vez que é sabido que estas bactérias são mais resistentes à ação de extratos e compostos, pois possuem uma membrana externa de lipopolissacarídeo, estrutura que torna sua parede celular impermeável às substâncias antimicrobianas, em comparação com as bactérias gram-positivas, que possuem uma única membrana, o que as torna mais vulnerável à penetração de compostos bioativos (GIRISH; SATISH, 2008; PERRICONE *et al.*, 2015).

Diversos estudos com extratos de espécies de *Passiflora* indicaram que os mesmos foram efetivos na inibição de cepas de bactérias gram (+) e gram (-). Assim, extratos metanólicos e clorofórmicos de culturas de calos e de folhas de *P. edulis* mostraram ação antibacteriana contra *S. aureus* (JOHNSON *et al.*, 2008). Além disso, o extrato metanólico das folhas de *P. nitida* e o extrato do pecíolo de *P. palmeri* exibiram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (BENDINI *et al.*, 2006). Bem como, o extrato em acetona da polpa da fruta de *P. ligularis* mostrou ser efeito contra *Salmonella paratyphi*, *S. typhi*, *S. typhi* B e *Klebsiella pneumoniae* (SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014). Quando comparado ao antibiótico Ciprofloxacina, verificou-se significativa atividade antibacteriana, do extrato metanólico das folhas de *P. edulis*, frente às bactérias gram-positiva *Bacillus subtilis* e gram-negativa *E. coli* (KANNAN *et al.*, 2011). Contudo, Ramaiya *et al.* (2014) reportaram que efeito antibacteriano, do extrato metanólico das

folhas de *P. maliformis* inibiu o crescimento da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*.

A literatura contém poucos relatos de substâncias, com propriedades antifúngicas, oriundas de sementes de espécies do gênero *Passiflora*. Algumas das substâncias descritas até momento foram: a albumina 2S (*Pe*-AFP1), obtida a partir da espécie *P. edulis*, minimizando o crescimento micelial de *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus* (PELEGRINI *et al.*, 2006); a Passiflin, isolada de *P. edulis*, com atividade contra a cepa *Rhizoctonia solani*, com IC_{50} = 16 mM (LAM; NG, 2009) e albumina 2S, em *P. alata* *Pa*-AFP1, contra *Colletotrichum goesporioides* (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Os compostos citados acima somente apresentaram atividade contra fungos de importância agrícola, não havendo ainda relatos sobre o efeito dos extratos de sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* contra fungos de interesse médico, inclusive *P. brasiliensis*. Os resultados obtidos no presente trabalho, são relevantes neste sentido, pois sugerem que os extratos hidroalcoólicos das sementes e das folhas de *P. setacea* e *P. tenuifila* foram capazes de inibir a atividade do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são responsáveis pela paracoccidioidomicose, é uma das micoses sistêmicas mais importantes na América Latina, não somente por sua distribuição geográfica, mas pela sua morbidade, apresentando-se na forma aguda ou subaguda, com disseminação hematogênica, predominantemente em crianças, adolescentes e jovens e na forma crônica, pulmonar, ganglionar ou mucosa em adultos (COURA, 2008).

No presente estudo foi avaliada a atividade antiprotozoário *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das folhas, pericarpos e sementes e das culturas de calos, cultivados *in vitro*, das espécies *P. tenuifila* e *P. setacea*, contra *Leishmania amazonenses* e *Trypanosoma cruzi* (Item 3.9.3). De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro relato na literatura, em que foi avaliada a atividade dos extratos hidroalcoólicos das culturas de calos, das espécies vegetais mencionadas acima, em ensaios de atividade leishmanicida e atividade tripanocida.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas, sementes e pericarpos de *P. setacea* e *P. tenuifila* não apresentaram atividade antiprotozoário. Estudo similar desenvolvido por Delmondes *et al.* (2014) demonstrou que os extratos hidroalcoólicos das folhas, casca e sementes da espécie de *Passiflora cincinnata*, também não foram eficazes contra *L. brasiliensis* e *T. cruzi*. Apesar dos extratos oriundos de pericarpos, sementes e folhas das espécies de maracujás analisadas no presente trabalho não terem sido promissores, foi observado que as culturas de

calos apresentaram moderado potencial, como possíveis fontes de produção de substâncias para combater essas espécies de protozoários, que podem ser aumentado através de experimentos subsequentes de elicitação.

Os compostos fenólicos, detectados nos extratos de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* através das análises cromatográficas de LC-ESI-MS/MS podem ser responsáveis pela atividade antiprotozoário. Várias evidências nesse sentido, obtidas a partir de estudos realizados com outras espécies suportam essa hipótese. Por exemplo, nos extratos etanólicos da espécie de *Fumaria densiflora* (Papaveraceae) foram detectados, como compostos majoritários, o ácido *E*-cinâmico e ácido cafeico, aos quais foi atribuída, possivelmente, a atividade antiprotozoário do extrato (ORHAN *et al.*, 2015). Em outro estudo realizado por Borges-Argáez *et al.* (2007), compostos fenólicos, como flavonoides, foram isolados da espécie de *Lonchocarpus xuul* (Fabaceae) e testados com relação à atividade antiparasitária, sendo demonstrado que chalconas e flavonas apresentaram atividade leishmanicida. A análise *in silico* de polifenóis antiparasitários, realizada por Ogungbe *et al.* (2014) também demonstrou que auronas, chalconas, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, lignana e estilbenoide podem ser consideradas promissoras moléculas contra *Leishmania*. Além disso, deve-se considerar que os terpenos detectados nos calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, como o α -pineno, podem também estar envolvidos na atividade antimicrobiana e antiprotozoário, como discutido anteriormente.

Os estudos preliminares descritos acima demonstraram moderado potencial dos extratos de folhas e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* na inibição contra o fungo *P. brasilensis*. Além disso, as culturas *in vitro* de calos oriundos de epicótilo de *P. setacea* foram uma promissora fonte de moléculas contra infecções provocadas por *S. aureus* e as culturas de calos, originadas de diferentes tipos de explante de *P. tenuifila* e *P. setacea* puderam ser otimizadas em termos das condições de cultivo, demonstrando serem fontes promissoras de compostos inibidores de doenças parasitárias. Até o presente momento, a produção de moléculas bioativas pelas culturas de calos foi otimizada, através da exploração dos tipos de explantes, do tempo de cultivo dos calos, das fontes de carbono e da utilização de ácido salicílico, mas novas manipulações, com outros elicitores bióticos e abióticos, poderão contribuir para otimizar ainda mais o processo de biossíntese, indicando o potencial dessa estratégia biotecnológica para a produção de moléculas bioativas.

5.5 Tempo de cultivo de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* e metabólitos secundários, atividade antioxidante e biológica.

A influência do tempo de cultivo dos calos de ambas as espécies na produção dos metabólitos secundários, na atividade antioxidante e na atividade biológica pode ser explicada pelo fato do metabolismo dos calos variarem, de acordo com as alterações das quantidades de nutrientes no meio de cultura. Em geral o crescimento acelerado das culturas e a produção de metabólitos secundários ocorrem em etapas diferentes do ciclo de crescimento dos calos, que inclui a fase inicial de adaptação dos explantes ao meio de cultura, a fase de proliferação celular intensa e crescimento rápido e a fase estacionária, em que começa a haver a diminuição do crescimento, devido à exaustão dos nutrientes do meio de cultura. Normalmente, é na fase estacionária, em que começam a ser produzidas as enzimas para o metabolismo secundário (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2016), mas os dados obtidos no presente trabalho mostram que isso pode não ter ocorrido com os terpenos, uma vez que foi observado a produção destes compostos nas fases iniciais e nas fases mais avançadas do cultivo.

Os resultados do presente trabalho mostraram que, em calos de caule de *P. tenuifila*, em sacarose, ficou caracterizada a produção de fenólicos e flavonoides, entre 50 e 60 dias do ciclo, de luteína, aos 71 dias de cultivo e de terpenos, entre a primeira e a terceira semanas de cultivo. Isto pode sugerir que as condições para a produção de determinados grupos de compostos podem já estar presentes, desde as primeiras fases do ciclo de cultivo. E nesse contexto, a produção de terpenos pelos calos de *P. setacea* também ocorreu em todas as seis semanas do ciclo de cultivo, assim como a atividade biológica dos calos, também foi decorrente da produção de moléculas bioativas, em fases específicas do ciclo de cultivo.

É importante considerar que as células dos calos estão constantemente sendo produzidas, na fase de proliferação celular, mas a senescência e morte celular estão ocorrendo, durante todo o decorrer da cultura. Neste sentido, a degradação das moléculas nitrogenadas, como proteínas, gera subprodutos, que podem ser utilizados novamente, para a síntese de auxinas, aminas e alcaloides. Os produtos de degradação dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos pirimidina, estão envolvidos na síntese de citocininas. Assim, o metabolismo dos calos envolve uma reciclagem dinâmica de moléculas, com a possibilidade de biossíntese de moléculas de hormônios, como as citocininas, auxinas e poliaminas, (DURZAN,

1987). Essas moléculas podem estar atuando na modulação da produção de metabólitos secundários.

Além disso, elicitores endógenos podem ser originados a partir da degradação de componentes estruturais da célula vegetal, como a parede celular, como por exemplo, os ácidos oligo-urônicos, em especial o ácido oligo-galacturônico e compostos semelhantes à lignina, que podem promover a biossíntese e a secreção de metabólitos importantes (AOYAGI, 2011). Segundo esse autor, resíduos de ácido oligo-galacturônico podem estar sendo produzidos, pela ação das enzimas endopoligalacturonase e pectinase sobre os polissacarídeos pécticos da parede celular. Isso poderia explicar, ao lado da possível ativação do mecanismo antioxidativo, gerado pelo estresse nutricional do meio de cultura, a produção de certas moléculas importantes, nas etapas finais do ciclo de cultivo dos calos, como observado para os calos de *P. setacea*, com atividade biológica antiprotozoário, ou a produção de luteína pelos calos de *P. tenuifila*, no final do ciclo de cultivo.

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo da produção de metabólitos secundários e avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoária de extratos de culturas *in vitro* de calos, em diferentes condições de cultivo, e dos extratos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, pode-se concluir:

1. Em relação as culturas de calos *in vitro* de *P. tenuifila* e *P. setacea*:

Passiflora tenuifila:

- ❖ O teor de compostos fenólicos aumentou nas culturas de calos oriundos de sementes imaturas com fonte de carbono sacarose e nos calos originados de segmentos caulinares com frutose. Além disto, a frutose em combinação com ácido salicílico, por 21 dias, promoveu significativamente o aumento nos níveis de fenólicos totais, em relação à sacarose e em relação aos calos de sementes imaturas.

- ❖ A frutose teve efeito promotor, em relação à sacarose, na produção de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e luteína pelos calos originados de segmentos de caules. Em frutose esses calos produziram concentrações muito superiores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante do que os calos de sementes imaturas.
- ❖ O extrato metanólico das culturas de calos de segmentos caulinares cultivados aos 50 dias de idade, suplementado com frutose apresentou o maior incremento de fenólicos totais. Nesse mesmo período de cultivo aos calos de caule cultivados com sacarose ou frutose atingiram maiores níveis de produção de flavonoides.
- ❖ Em relação aos teores de compostos fenólicos da cultura de calos de caule, o melhor tempo de exposição ao ácido salicílico foi de 21 dias, com a fonte de carbono frutose. O melhor tratamento para o aumento de flavonoides nos calos de caule foi no tempo de 14 dias com e sem ácido salicílico e com a presença de frutose no meio de cultura.
- ❖ Os calos oriundos de segmento caulinar tratado com fonte de carbono frutose apresentou maior capacidade de biossíntese de xantofila luteína. O ácido salicílico teve efeito inibitório sobre a produção de luteína, nos calos expostos por 21 dias.

Passiflora setacea:

- ❖ Os calos oriundos de cotilédones, elicitados com ácido salicílico foram os melhores na produção de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante e os calos de nó cotiledonar, os mais adequados para a produção de luteína.
- ❖ A exposição das culturas de calos de cotilédone ao ácido salicílico na concentração de 145 μM promoveu a produção de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.
- ❖ A fonte de carbono sacarose e o tempo de cultivo de 30 dias foram as melhores condições para a produção de fenólicos

totais, flavonoides e atividade antioxidante, nos calos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone.

- ❖ A cultura de calos de nó cotiledonar apresentou-se adequada para a produção de luteína, quando exposta ao ácido salicílico.
- ❖ Os resultados mostram que sacarose e o tempo de cultivo de 30 dias foram as melhores condições para a produção de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, nos calos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone, com exceção, para flavonoides, cuja produção pelos calos de cotilédone, em sacarose e de hipocótilo, em frutose, não diferiu entre os tempos de cultivo.
- ❖ As culturas de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* apresentaram o menor teor de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante quando comparados ao material vegetal (folhas e sementes). Também observou-se que o nível de fenólicos das culturas de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* foi superior aos encontrados nos pericarpos de ambas as espécies avaliadas.

2. Em relação aos diferentes métodos de extração do material vegetal (folhas, pericarpos e sementes) e das culturas de calos *in vitro* de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

- ❖ Os resultados encontrados no trabalho permitem concluir que a extração por líquido pressurizado foi o melhor método para extrair compostos fenólicos. Ao extrair as amostras com CO₂ supercrítico e integrar com uma nova extração com líquido pressurizado, demonstrou-se ser um método adequado para a extração de flavonoides presentes nas culturas de calos de cotilédone de *P. setacea*. Deste modo o modelo de extração apresentado, permite obter uma extração rápida dos analitos num ambiente inerte, sob alta pressão, aumentando a solubilidade e melhorando a cinética de desorção dos compostos bioativos a partir das matrizes.

3. Em relação ao estudo de identificação dos compostos fenólicos no material vegetal (folhas, pericarpos e sementes) e dos calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

- ❖ Os principais ácidos fenólicos presentes em extratos hidroalcoólicos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* foram ácido salicílico, ácido protocatecuico e ácido p-cumárico. O ácido cafeico e ácido gálico só não foram encontrados em sementes de *P. setacea*. Os flavonoides C-glicosilados vitexina e eriodictiol foram encontrados nos extratos de pericarpo e folhas e nos extratos de pericarpos e sementes das duas espécies vegetais.
- ❖ Em extratos hidroalcoólicos de calos originados de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone de *P. setacea*, cultivados em sacarose e em frutose foram encontrados os ácidos salicílico, protocatecuico, cafeico e vanílico, enquanto os ácidos cumárico e ferúlico somente não foram encontrados em extratos de calos de cotilédone cultivados em frutose e de hipocótilo cultivados em frutose, respectivamente. O flavonoide vitexina foi encontrado somente em extratos de calos de hipocótilo e nó cotiledonar cultivados em frutose.
- ❖ Os ácidos salicílico, protocatecuico, cafeico e vanílico também foram os ácidos fenólicos encontrados em extratos hidroalcoólicos de calos originados de segmentos de hipocótilo, nó cotiledonar e cotilédone de *P. setacea*, cultivados em frutose e acrescidos ou não de ácido salicílico.

4. Em relação ao estudo dos terpenos dos calos de *P. tenuifila* e *P. setacea*.

- ❖ Os calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* demonstraram potencial para a produção de compostos terpênicos. As culturas de calos de nó foliar e hipocótilo de *P. setacea* foram as melhores fontes de α -pineno, enquanto que os calos de epicótilo foram os únicos a produzirem *E*-cariofileno, em relação aos calos de *P. tenuifila* e as culturas de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*, as únicas a biossintetizar o hidrocarboneto monoterpênico α -tujona.

5. **Em relação ao estudo das atividades biológicas dos extratos do material vegetal (folhas, pericarpos e sementes) e dos calos *in vitro* de *P. tenuifila* e *P. setacea*.**

- ❖ **Atividades antibacteriana:** Os extratos hidroalcoólicos de partes da planta e os calos de *P. setacea*, de maneira geral, não apresentaram atividade antibacteriana, exceto o extrato das sementes que mostrou atividade moderada para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e os calos de epicótilo na ausência de ácido salicílico que apresentou boa atividade para *S. aureus* e moderada atividade para *E. coli* e *P. aeruginosa*.
- ❖ **Atividades antifúngica:** Os extratos hidroalcoólicos de folhas, pericarpos e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea* não apresentaram atividade contra as oito espécies de fungos testadas, exceto os extratos de folhas e sementes de ambas as espécies vegetais, que apresentaram atividade boa e moderada respectivamente para *Paracoccidioides brasiliensis*.
- ❖ **Atividade leishmanicida:** Apenas o extrato hidroalcoólico de sementes de *Passiflora setacea* mostrou uma inibição do crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses*, os extratos do pericarpo e das folhas desta espécie não apresentaram inibição frente ao protozoário. Nenhum dos extratos hidroalcoólicos de *Passiflora tenuifila* apresentou atividade leishmanicida. Entre os extratos hidroalcoólicos de calos cultivados em frutose e sacarose de *P. tenuifila*, apenas os caules cultivados em frutose por 45 e 75 dias foram inativos, os extratos de sementes imaturas e caules cultivados em frutose e sacarose por 45, 60 e 75 dias apresentaram atividade leishmanicida. A maioria dos diferentes tipos de calos de *P. setacea* inibiram o crescimento da forma promastigota de *Leishmania amazonenses* quando cultivados por 30, 45 e 60 dias.
- ❖ **Atividades tripanocida:** Dos extratos das folhas, sementes e pericarpos de *P. tenuifila* e *P. setacea*, apenas os extratos de pericarpos das duas espécies vegetais apresentaram inibição do crescimento da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Entre os calos *Passiflora tenuifila*, os extratos das sementes imaturas, caules cultivados em sacarose por 60 dias e os extratos de sementes imaturas e caules cultivados em sacarose e frutos por 45 dias apresentaram atividade tripanocida. Já os calos de *Passiflora setacea*, tais como nó foliar, hipocótilo, nó cotiledonar, raiz e epicótilo cultivados por 45 dias, hipocótilo cultivado por 30 dias e cotilédone cultivado por 60 dias apresentaram atividade tripanocida, mostrando que o tempo de cultivo de 60 dias é o mais indicado para a produção de compostos com atividade para *Passiflora setacea*.

O presente trabalho relata, pela primeira vez, o potencial promissor das culturas *in vitro* de calos de *P. tenuifila* e *P. setacea* para a produção, em condições controladas, de diferentes classes de metabólitos secundários e de moléculas com atividade antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoário. A utilização desses sistemas de cultura *in vitro* para a produção de metabólitos secundários apresenta algumas características vantajosas, como a produção rápida de biomassa, dependendo da espécie e tipo de explante, e a possibilidade de manipulação, em estudos futuros, de vários outros fatores como os reguladores de crescimento, fornecimento de precursores e a utilização de vários outros tipos de elicitores, além do ácido salicílico, que poderão otimizar ainda mais a produção das diferentes classes de metabólitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. P. *et al.* *Passionflower* hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, p. 307-315, 2009.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy**. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.

AFFONSO, V. R.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; SATO, A. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L.. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 57, p. 6392-6395, 2009.

AHMAD, N.; RAB, A.; AHMAD, N. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, n. 154, p. 51–56, 2016.

AHMADI-SAKHA, S.; SHARIFI, M.; NIKNAM, V. Bioproduction of phenylethanoid glycosides by plant cell culture of *Scrophularia striata* Boiss.: from shake-flasks to bioreactor. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 275–281, 2016.

ALAM, P.; ALAJMI, M. F.; ARBAB, A. H.; PARVEZ, M. K.; SIDDIQUI, N. A.; ALQASOUMI, S. I.; AL-REHAILY, A. J.; AL-DOSARI, M. S.; BASUDAN, O. A. Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves of different *Acacia* species grown in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p.715-723, 2017.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; SILVA, J. R. A.; JUNIOR, V. F. V. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* madrinan (Lauraceae). **Acta amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.

ALEXANDRE, E. M. C *et al.* Experimental design, modeling, and optimization of high-pressure-assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate peel. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 5, p. 886-900, 2017.

ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409-20, 2008.

ALI, M.; ABBASI, B. H.; ALI, G. S. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 120, p. 1099–1106, 2015.

ALIA, H.; KHANA, M. A.; ULLAHA, N.; KHAN, R. S. Impacts of hormonal elicitors and photoperiod regimes on elicitation of bioactive secondary volatiles in cell cultures of *Ajuga bracteosa*. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 183, p. 242–250, 2018.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508–1516, 2012.

ALVAREZ-YELA, A. C.; CHIQUIZA-MONTAÑO, L. N.; HOYOS, R.; OROZCO-SÁNCHEZ, F. Rheology and mixing analysis of plant cell cultures (*Azadirachta indica*, *Borojoa patinoi* and *Thevetia peruviana*) in shake flasks. **Biochemical Engineering Journal**, 2016.

ALWIS, R. D.; FUJITA, K.; ASHITANI, T.; KURODA, K. Volatile and non-volatile monoterpene produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* culture cells. **Journal of Plant Physiology**. V. 166, p. 720–728, 2009.

AMARAL, R. G.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T. H.; COUTO, J. C. M.; POSSER, C. P et al. Combination of the essential oil constituents α -pinene and β -caryophyllene as a potentiator of trypanocidal action on *Trypanosoma evansi*. **Journal of Applied Biomedicine**. v. 14, n. 4, p. 265–272, 2016.

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.

ANVISA, **Resolução ANVISA/MS nº 19/99, 1999.**

<[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_bk.htm#RESOLUÇÕES ANVS/MS n.º 16, 17, 18 e 19/99](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_bk.htm#RESOLUÇÕES%20ANVS/MS%20n.%2016,%2017,%2018%20e%2019/99)>. Acesso junho de 2016.

AOYAGI, H. Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 1–8, 2011.

ARABSHAHI-DELOUEE, S.; DEVI, V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1100–1105, 2007.

ARAÚJO, M. H.; SILVA, I. C. V.; OLIVEIRA, P. F.; ARIELLY, R. R. *et al.* Biological activities and phytochemical profile of *Passiflora mucronata* from the Brazilian restinga. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. *Staphylococcus aureus* Bacteremia—Consider the Source. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 55-56, 2001.

ARORA, J.; GOYAL, S.; RAMAWAT, K. G. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. **In Vitro Cellular & Developmental Biology —Plant**, v. 46, p. 430–436, 2010.

ASKARI, E, EHSANZADEH, P. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 4, p. 1-14, 2015.

AYRES, A. S. F. S. J.; DE ARAÚJO, L. L. S.; SOARES, T. C.; COSTA, G. M.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A *et al.* Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 499–505, 2015.

BABEL, P.; DEVPURA, V.; PUROHIT, S.D. Salicylic acid induced changes in growth and some biochemical characteristics in in vitro cultured shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. Et Fernand.

International Journal of Recent Scientific Research. v. 5, n. 4, p. 774-779, 2014.

BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, A. D. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. **Molecules**, v. 19, p.13541-13563, 2014.

BAKASATAEA, N.; KUNWORARATHA, N.; YUPANQUIB, C. T.; VORAVUTHIKUNCHAIC, S. P.; JOYCHARAT, N. Bioactive components, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the wood of *Albizia myriophylla*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 444-450, 2018.

BENDINI, A.; CERRETANI, L.; PIZZOLANTE, L.; TOSCHI, T. G.; GUZZO, F.; CEOLDO, S.; MARCONI, A. M.; ANDRETTA, F.; LEVI, M. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. **Europen Food Research Technology**, v. 223, p. 102-109, 2006.

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

BENÍTEZ-GARCÍA, I.; VANEGAS-ESPINOZA, P. E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; HEREDIA, F. J.; PAREDES-LÓPEZ, O.; DEL VILLAR-MARTÍNEZ, A. A. Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 107-113, 2014.

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.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Espécies de maracujá:**

caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, FG.; JUNQUEIRA, NTV, BRAGA MF (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. Cap. 22, p.558-586, 2005.

BEZERRA, J. A.; CAMPOS, A. C.; VASCONCELOS, P. R.; NICARETA, J. R.; RIBEIRO, E. R.; SEBASTIAO, A. P.; URDIALES, A. I.; MOREIRA, M.; BORGES, A. M. Extract of *Passiflora edulis* in the healing of colonic anastomosis in rats: A tensiometric and morphologic study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p.16–25, 2006.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998.

BOIÇA Jr, A. L.; LARA, F. M.; OLIVEIRA, J. C. Efeito de genótipos de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e da densidade larval na biologia de *D.juno junio* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, p. 41-47, 1999.

BORGES-ARGÁEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERSB, A.; GIMÉNEZ-TURBAC, A.; RUIZC, G.; WATERMANB, P. G.; PEÑA-RODRÍGUEZA, L. M. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. **Phytomedicine**, v. 14, p. 530–533, 2007.

BORRELLI, F.; PINTO, L.; IZZO, A. A.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; MERCATI, V.; TOJA, E.; AUTORE, G. Anti-inflammatory activity of *Passiflora incarnata* L. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. S104–S106, 1996.

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.

BRAVO, K.; DUQUE, L.; FERRERES, F.; MORENO, D. A.; OSORIO, E. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 168, p. 78-88, 2017.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **Rockville: American Society of Plant Physiologists**, 2000.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C.L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-7, 1996.

BUJOR, O.-C.; GINIES, C.; POPA, V. I.; DUFOUR, C. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. **Food Chemistry**, v. 252, p. 356-365, 2018.

BULGAKOV, V. P.; TCHERNODED, G. K.; MISCHENKO, N. P.; KHODAKOVSKAYA, M. V.; GLAZUNOV, V. P.; RADCHENKO, S. V et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 213– 21, 2002.

CAI, Z.; ANJA KASTELL, A.; INGA MEWIS, I.; DIETRICH KNORR, D.; SMETANSKA, I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 108, p. 401–409, 2012a.

CAI, Z.; KASTELL, A.; SMETANSKA, I. Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus × domestica* Borkh. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 93–99, 2014.

CALEVO, J.; GIOVANNINI, A.; DE BENEDETTI, L.; BRAGLIA, L.; DELLA CUNA, F. S. R.; TAVA, A. Chemical composition of the volatile oil from flowers and leaves of new *Passiflora* hybrids.

International Journal of Applied Research in Natural Products, v. 9, n. 4, p. 21-27, 2016.

CARASEK, E.; PAWLISZYN, J. Screening of Tropical Fruit Volatile Compounds Using Solid-Phase Microextraction (SPME) Fibers and Internally Cooled SPME Fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 8688-8696, 2006.

CARVALHO, M. V. O.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA, A. M. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah, **Food Chemistry**, v. 266, p. 350–358, 2018.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. **Ecofisiologia de fruteiras tropicais**: abacaxizeiro, maracujazeiro, mangueira, bananeira e cacauero. São Paulo: Nobel, 1998.

CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G et al. Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2, 4, 6 trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 75–586, 2015.

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. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQuerria**, v. 45, p. 1-92, 1997.

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.

CHAWLA, H. S. **Introduction to Plant Biotechnology**. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. 2nd Edition. p. 538, 2002.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; DE LIMA, T. C. M. CUNHA, A. P.

Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents.

Phytotherapy Research, v. 20, p. 1067-1073, 2006.

COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARINB, C. B. B.; SCHUMACHER, N.; MARÓSTICA JR., M. R.; MELETTI, L. M. M.; ZOLLNER, R. L. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, 2013.

CONCEIÇÃO, L. F. R.; FERRERES, F.; TAVARES, R. M.; DIAS, A. C. P. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. **Phytochemistry**, n. 67, p. 149–155, 2006.

CONSTABEL, P.C.; YOSHIDA, K.; WALKER, V. 2014. **Diverse ecological roles of plant tannins: Plant defence and beyond**. In: JOHN WILEY & SONS. Recent advances in polyphenol research, Chichester, UK, V. 4, p. 115-142, 2014.

COSTA, G. M.; CÁRDENAS, P. A.; GAZOLA, A. C.; ARAGÓN, D. M.; CASTELLANOS, L.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. Isolation of C-glycosylflavonoids with α -glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 104–110, 2015.

COUÈE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 449-459, 2006.

COURA, J. R. **Paracoccidioidomycose**. In: Coura, J. R (ed), Síntese das doenças infecciosas e parasitárias, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008, p. 105-108.

CROVADORE, J.; SCHALK, M.; LEFORT, F. Selection and Mass Production of *Santalum Album* L. Calli for Induction of Sesquiterpenes.

Biotechnology & Biotechnological Equipment. v. 26, n. 2, p. 2870-2874, 2012.

DA SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *in vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882-890, 2013.

DAAYF, F.; BELLAJ, M. El.; HASSNI, M. El.; AITI, F.J.; HADRAMI, E. El. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture medium. **Environmental and Experimental Botany**, n. 49, p. 41-47, 2003.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 397-412, 2011.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, 2005.

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.

DEGINANI, N. B.; ESCOBAR, A. Chromosome number of species of *Passiflora* (Passifloraceae). **Hickenia**, v. 3, n. 36, p. 143-144, 2002.

DEHGHAN, S.; MAHNAZ SADEGHI, M.; PÖPPEL, A.; FISCHER, R.; LAKES-HARLAN, R.; KAVOUSI, H. R.; VILCINSKAS, A.; RAHNAMAEIAN, M. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. **Bioscience Reports**, v. 34, 2014.

DELMONDES, G. A. *et al.* Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* Mast L. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 1, p. 31-38, 2014.

DELMONDES, G. A.; FIGUÊIREDO, F. R. S. D.; TINTINO, S. R.; OLIVEIRA, L. R. avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* mast L. **Caderno de Cultura e Ciência**, v.13, n.1, 2014.

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

DHAWAN, K.; KUMAR, R.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Correct identification of *P. incarnata* Linn. - a promising anxiolytic and sedative of the future. **Journal of Medicinal Food Fall**, p. 137–144, 2001a.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *P. incarnata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 922–926, 2001b.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *P. incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 698–702, 2001c.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Supression of alcoholcessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 81, p. 239-244, 2002.

DHAWAN, K.; SHARMA, A. Antitussive activity of the methanol extract of leaves of *P. incarnata*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 399–401, 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.

DIVYA, P.; PUTHUSSERI, B.; NEELWARNE, B. The effect of plant regulators on the concentration of carotenoids and phenolic compounds in foliage of coriander. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 101-110, 2014.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Press Syndicate of the University of Cambridge, Melbourne, 1995.

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

DONNEZ D.; KIM, K. H.; ANTOINE, S.; CONREUX, A.; DE LUCA, V.; JEANDET, P. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1056–1062, 2011.

DURZAN, D. J. **Its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis**. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. Cell and Tissue Culture in Forestry: Volume 2 Specific Principles and Methods: Growth and Developments. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 92-136, 1987.

EMBRAPA CERRADOS. **Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento industrial, ornamental e funcional**. In.: D.t.d.p.s. PASSITEC (Ed.), v. 4, p. 2, 2015.

EMEA, **Community Herbal Monograph on Salix, Cortex**. London. EMEA/HMPC/295338/2007, 2009.

EPO - **European Patent Office** .

<https://worldwide.espacenet.com/searchResults?search=passion+fruit&DB=EPODOC&submitted=true&locale=en_EP&ST=singleline&compact=false&DB=EPODOC&query=passion+fruit> Acesso em janeiro de 2018.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; ROCA, W. M.; SANCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v. 101, p. 341–347, 1998.

FARAG, M. A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C. G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Anal Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1-19, 2016.

FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; AHMAD, N.; ALI, M.; ALI, S. Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, p. 573–581, 2016.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alphahumulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenácea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; GIL IZQUIERDO, A. New C-Deoxyhexosyl Flavones and Antioxidant Properties of *Passiflora edulis* Leaf Extract. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n. 55, p.10187–10193, 2007.

FEUILLET, C. **Passifloraceae (passionflower family)**. In: SMITH, N.; MORI, S. A; HENDERSON A; STEVENSON, D. W; HELD, S. V. Flowering Plants of the Neotropics, Princeton University Press, Oxford, MS, USA, p. 286–287, 2004.

FIGUEIREDO, D.; COLOMEU, T. C.; SCHUMACHER, N. S. G.; STIVANIN-SILVA, L. G.; CAZARIN, C. B. B et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). **International Immunopharmacology**, v. 35, p. 127–136, 2016.

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

FUHRMANN, E.; VILELA JUNQUEIRA, N. T.; BLUM, L. E. D. B.; BRAGA, M. W.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P. Reação de híbridos interespecíficos de *Passiflora* spp. à *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, 2014.

FURMAN, B. L. Salicylic Acid. **Acid Reference Module in Biomedical Sciences**, p. 1-7, 2018.

GADZOVSKA, S.; MAURY, S.; DELAUNAY, A.; SPASENOSKI, M.; HAGÉGE, D.; COURTOIS, D.; JOSEPH, C. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 113, p. 25–39, 2013.

GALAL, A. Improving effect of salicylic acid on the multipurpose tree *Zizifus spina-christi* (L.) Willd tissue culture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 947-952, 2012.

GAOA, Z.; MENGA, C.; ZHANG, X.; XUB, D.; MIAOA, X.; WANGA, Y.; YANGA, L.; LVA, H.; CHENC, L.; YE, N. Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 225–230, 2012.

GARCIA-MENDOZA, M. Del P. *et al.* Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9-16, 2017.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**, The Background, 3 ed, v. 1, p. 503, 2008.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Jornal of Microscopy**, v. 132, p. 81-85, 1983.

GHANATI, F.; KHATAMI, F.; BEMANI, E. Effects of UV B and UVC radiation on viability, growth, and major natural compounds of *Malve neglecta* L. cells. Iranian. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 4, n. 1, p. 881–887, 2013.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

GHORPADE, R. P.; CHOPA, A.; NIKAM, T. D. Influence of biotic and abiotic elicitors on four major isomers of boswellic acid in callus culture

of *Boswellia serrata* Roxb. **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 4, p.169-176, 2011.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a skyeye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, p. 1–18, 2016.

GIRISH, H. V.; SATISH, S. Antibacterial activity of important medicinal plants on human pathogenic bacteria – a comparative analysis. **World Application of Science Journal**, v. 5, n. 3, p. 267-271, 2008.

GOMES, S. V. F. **Aplicação do planejamento box-behnken na utilização 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 f. tese (Doutor em Química Orgânica). Universidade Federal da Bahia, 2013.

GOMES, S.; PORTUGAL, L.; ANJOS, J.; JESUS, O.; OLIVEIRA, E.; DAVID, J.; DAVID, J. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, 2016.

GOMEZ, K. A.; GOMEZ, A. A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2º Edição, New York: John Wiley and Sons, 1984.

GUIMARÃES, T. G.; DIANESE, A. C.; MADALENA, J. O. M.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; LIMA, H. C.; CAMPOS, G. A. **Recomendações técnicas para o cultivo de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado**. In.: Embrapa (Ed.), p. 6, 2013.

GUO, R.; YUAN, G.; WANG, Q. Sucrose enhances the accumulation of anthocyanins and glucosinolates in broccoli sprouts. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1080–1087, 2011.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia**

Electronica, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

< http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm > Acesso em julho de 2015.

HAJJI, T.; MANSOURI, S.; VECINO-BELLO, X.; CRUZ-FREIRE, J. M.; REZGUI, S.; FERCHICHI, A. Identification and characterization of phenolic compounds extracted from barley husks by LC-MS and antioxidant activity *in vitro*. **Journal of Cereal Science**, v. 81, p. 83-90, 2018.

HELDT, H-W.; PIECHULLA, B. **Pflanzenbiochemie**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 4 ed, 2008.

HILAL, M.; PARTADO, M. F.; ROSA, M.; GALLARDO, M.; ORCE, L.; MASSA, E. D. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. **Photochem Photobiol**, v. 79, p. 205-10, 2004.

HO, T-T.; LEE, K-J.; LEE, J-D.; BHUSHAN, S.; PAEK, K-Y.; PARK, S-Y. Adventitious root culture of *Polygonum multiflorum* for phenolic compounds and its pilot-scale production in 500 L-tank. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 130, n. 1, p. 167–181, 2017.

HOON KIM, J.; YOUNG KIM, H.; YOUNG YANG, S.; KIM, J.-B., HYUN JIN, C.; HO KIM, Y. Article in press G model inhibitory activity of (-)-epicatechin-3,5-O-digallate on α -glucosidase and *in silico* analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

HOU, S.; SUN, Z.; LINGHU, B.; WANG, Y.; HUANG, K.; XU, D.; HAN, Y. Regeneration of buckwheat plantlets from hypocotyl and the influence of exogenous hormones on rutin content and rutin biosynthetic gene expression *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 120, n. 3, p. 1159–1167, 2014.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

<<http://www.inpi.gov.br/>> Acesso em janeiro de 2018.

JAIN, D. C; MATHUR, A. K; GUPTA, M. N; SINGH, A. K; VERMA, R. K; GUPTA, A.P; KUMAR, S. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 993-1001, 1996.

JANZANTTI, N. S.; MACORIS, M. S.; GARRUTI, D. S.; MONTEIRO, M. Influence of the cultivation system in the aroma of the volatile compounds and total antioxidant activity of passion fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 511-518, 2012.

JAWDAT, D.; AL-FAOURY, H.; ODEH, A.; AL-RAYAN, R.; AL-SAFADI, B. Essential oil profiling in callus of some wild and cultivated *Daucus* genotypes. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 848-855, 2016.

JIANG, Y. J.; PIAO, X. C.; LIU, J. S.; JIANG, J.; LIAN, Z. X.; KIM, M. J.; LIAN, M. L. Bioactive compound production by adventitious root culture of *Oplomanax elatus* in balloon-type airlift bioreactor systems and bioactivity property. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 123, p. 413-425, 2015.

H. MEDINA JIN, P.; WANG, H.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHENG, Y. UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 106-111, 2017.

JOHNSON, M.; MARIDASS, M.; IRUDAYARAJ, V. "Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Passiflora edulis*," **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, p. 425-432, 2008.

JÚNIOR, J. T. C.; MORAIS, S. M.; GOMEZ, C. V.; MOLAS, C. C.; ROLON, M. *et al.* Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast "Cerrado". **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 434-440, 2016.

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.

KANG, S. M.; JUNG, H. Y.; KANG, Y. M.; YUN, D. J.; BAHK, J. D.; YANG, J *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in

adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. **Plant Science**, v. 166, p.745–51, 2004.

KANNAN, S.; DEVI, B. P.; JAYAKAR, B. Antibacterial Evaluation of the methanolic extract of *Passiflora edulis*. **Journal For Drugs and Medicines**, v. 3, n. 1, p. 46-49, 2011.

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

KEMPERMAN, R. A.; BOLCA, S.; ROGER, L. C.; VAUGHAN, E. E. Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities, **Microbiology**, v. 156, p. 3224–3231, 2010.

KEUNEN, E.; PESHEV, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DEN ENDE, W.; CUYPERS, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 1242–1255, 2016.

KHAN, S.; PANDOTRA, P.; MANZOOR, M. M.; KUSHWAHA, M.; SHARMA, R.; JAIN, S.; AHUJA, A *et al.* Terpenoid and flavonoid spectrum of in vitro cultures of *Glycyrrhiza glabra* revealed high chemical heterogeneity: platform to understand biosynthesis. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, p. 507–516, 2016.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

KITE, G. C.; PORTER, E. A.; DENISON, F. C.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C.; BUTLER, I.; SIMMONDS, M. S. J. Data-directed scan sequence for the general assignment of C-glycosylflavone O-glycosides in plant extracts by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 123–131, 2006.

KLIEBENSTEIN, J. D. Making new molecules-evolution of structures for novel metabolites in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 112–117, 2013.

KU, S. K.; ZHOU, W.; LEE, W.; HAN, M. S.; NA, M.; BAE, J. S. Anti-inflammatory effects of hyperoside in human endothelial cells and in mice. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 784-799, 2015.

KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; CAMPESTRINI, L. H *et al.* Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 1548-1553, 2010.

KWON, Y.; APOSTOLIDIS, E.; KIM, Y.; SHETTY, K. Over-expression of proline-linked antioxidant pathway and modulation of phenolic metabolites in long life span clonal line of *Origanum vulgare* in response to ultraviolet radiation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p. 649-673, 2009.

LEAL, S. M.; PINO, N.; STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; ESCOBAR, P. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper* spp. grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**. v. 25, p. 512-519, 2013.

LEÃO, K. M. M.; SAMPAIO, K. L.; PAGANIA, A. A. C.; APARECIDA, M.; SILVA, M. A. A. P. Odor potency, aroma profile and volatiles composition of cold pressedoil from industrial passion fruit residues. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 280-286, 2014.

LI, F.; LI, S.; LI, H.-B.; DENG, G.-F.; LING, W.-H.; WU, S.; XU, X.-R.; CHEN, F. Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p.1298-1309, 2013.

LI, HONGWEI.; ZHOU, PENG.; YANG, QIQI.; SHEN, YAN.; DENG, JUN.; LI, LI.; DE ZHAO. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa' Hongwei. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, p. 1085-1090, 2011.

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

LIMA, N. G. P. B.; DE SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C. F.; ALVES, M. F.; DE SOUZA, F. S et al. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 450–454, 2013.

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 Organ Culture**. v. 118, p. 339–346, 2014.

MACHADO, A. K.; ANDREAZZA, A. C.; SILVA, T. M.; BOLIGON, A. A.; NASCIMENTO, V. et al. Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone *In Vitro* Exposure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 14, 2016.

MACHADO, A. P.; Da F *et al.* Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675-683, 2015.

MACHADO, K. E.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLM ANN, C.; MEYRE-SILVA, C.; BELLA CRUZ, A. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 636-639, 2005.

MACHADO, M. W.; NETO, C. S.; SALGADO, J et al. Search for alkaloids on callus culture of *Passiflora alata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 901–910, 2010.

MANAF, H. H.; KAWTHAR, A. E.; MONA, S. R.; EL-AAL, A. Impact of UV-B radiation on some biochemical changes and growth parameters in *Echinacea purpurea* callus and suspension culture. **Annals of Agricultural Science**, v. 62, n. 2, p. 207-216, 2016.

MARCORIS, M. S.; JANZANTTI, N. S.; GARRUTI, D. S.; MONTEIRO, M. Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* f. var *flavicarpa* Deg.) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 430-435, 2011.

MARCUS, Y. Extraction by Subcritical and Supercritical Water, Methanol, Ethanol and Their Mixtures. **Separations**, v. 5, n. 4, p. 1-18, 2018.

MARTÍNEZ-BONFIL, B. P.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-LAREDO, A. R.; TREJO-TAPIA, G.; TREJO-ESPINO, J. L. Effects of culture medium and auxins on growth of adventitious root cultures of *Cuphea aequipetala* Cav. and their ability to produce antioxidant compounds. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 118, p. 401–408, 2014.

MASTEIKOVA, R.; BERNATONIENE, J.; BERNATONIENE, R.; VELZIENE, S. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 65, n. 5, p. 577-83, 2008.

MEDINA, S.; COLLADO-GONZÁLEZ, J.; FERRERES, F.; LONDOÑO-LONDOÑO, J.; JIMÉNEZ-CARTAGENA, C.; GUY, A.; DURAND, T.; GALANO, J-M.; GIL-IZQUIERDO, A. Quantification of phytoprostanes - bioactive oxylipins -1 and phenolic compounds of *Passiflora edulis* Sims shell using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 229, n. 15, p. 1-8 2017.

MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização**. São Paulo, Campinas: IAC, 1995. (Boletim técnico, n. 158).

MENDES, M. D.; FIGUEIREDO, A. C.; OLIVEIRA, M. M.; TRINDADE, H. Influence of culture media and fungal extracts on essential oils composition and on terpene synthase gene expression in *Thymus caespititius*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 118, p. 457-469, 2014.

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, p. 577–599, 2000.

MEWIS, I.; SMETANSKA, I.; MULLER, C.; ULRICHS, C. Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fre aux. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 164, n. 2, p. 148–161, 2011.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, 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.

MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; UMEMOTO, K.; KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3431-3434, 1998.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; NITIRUANGJARAS, A.; REANMONGKOL, W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 901–908, 2013.

MOARES, M. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical Fluid Extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.

MONTERO, D. A. V.; MARQUES, M. O. M.; MELETTI, L. M. M.; KAMPEN, M. H. V.; POLOZZI, S. C. Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, n. 3, p. 1191-1200, 2016.

MONTERO, D. A. V.; MING, L. C.; BORGUINI, M. G.; CAVALCANTE, M.; LIMA, G. P. P.; FABIAN, S.; MELETTI, L. M. M. *In vitro* Antioxidant Activity between Bioactive Compounds from Nine Species of *Passiflora*. **Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences**. v.4, p. 20-25, 2015.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I.R.A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW.

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. v. 12, n. 1, p. 38–43, 2013.

MORESCO, H. H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L. C.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI M. G.; BRIGHENTE I. M. C. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 1-7. 2014.

MORESCO, H. H.; QUEIROZ, G. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical constituents and avaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 319-324. 2012.

MORONE-FORTUNATO, I.; AVATO, P. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 93, p. 139–149, 2008.

MOYO, M.; AMOO, S. O.; AREMU, A. O.; GRUZ, J.; ŠUBRTOVÁ, M.; DOLEŽAL, K et al. Plant regeneration and biochemical accumulation of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in *Hypoxis hemerocallidea* organ and callus cultures. **Plant Science**, 227:157–64, 2014.

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**, v. 118, p. 1–16, 2014.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; DE ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, S. A.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Med.** v. 72, p. 81–83, 2006.

NAMEDO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p.69–79, 2007.

NAMITHA, K. K.; NEGI, P. S. Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 728–760, 2010.

- NISAR, N.; LI, L.; LU, S.; KHIN, N. C.; POGSON, B. J. Carotenoid Metabolism in Plants. **Molecular Plant**. v. 8, n. 1, p. 68-82, 2015.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.
- OCAMPO, J.; D'EECKENBRUGGE, J. C.; JARVIS, A. Distribution of the genus *Passiflora* L. diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity management in the coffee growing zone. **Diversity**, n. 2, p. 1158–1180, 2010.
- OCHOA-VILLARREAL, M.; HOWAT, S.; HONG, S.; JANG, M.; JIN, Y-W.; LEE, E-K.; LOAKE, G. J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**. v. 49, n. 3, p. 149-158, 2016.
- OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; FASINU, P. S. Antimicrobial and antiprotozoal activities of twenty-four Nigerian medicinal plant extracts. **South African Journal of Botany**, v.117, p. 240-246, 2018.
- OGUNGBEA, I. V.; ERWINB, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 48, p. 105–117, 2014.
- OLAFSDOTTIR, E. S.; THORGEIRSDOTTIR, E.; JAROSZEWSKI, J. W. Isolation and identification of cyclopentene cyanohydrin bis-glycosides from three *Passiflora* species, **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 5, 1997.
- OLGUNSOY, P.; ULUSOY, S.; AKCAY, U. C. Metabolite Production and Antibacterial Activities of Callus Cultures from *Rosa damascena* Mill. Petals. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, p. 590-597, 2017.
- OLIVEIRA, D. A. ANGONESE, M.; GOMES C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 111, p. 55–62, 2016.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; FERREIRA, S. R. S.; GOMES, C. L. Nanoencapsulation of passion fruit by-product extracts for enhanced antimicrobial activity. **Food and bioproducts processing**, v. 104, p. 137–146, 2017.

OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S. R. S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.

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.

ORHAN, I. E.; OZTURK, N.; SENNER, B. Antiprotozoal assessment and phenolic acid profiling of five *Fumaria* (fumitory) species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 283-286, 2015.

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.

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

PAES, JULIANA *et al.* Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8-16, 2014.

PASSINHO-SOARES, C. H.; DAVID, J. P.; DE SANTANA, J. R. F.; DAVID, J. M.; RODRIGUES, F. M.; MESQUITA, P. R. R.; OLIVEIRA, F. S.; BELLINTANI, M. C. Influence of growth regulators on distribution of trichomes and the production of volatiles in

micropropagated plants of *Plectranthus ornatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 679–690, 2017.

PATEL, H.; KRISHNAMURTHY, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v. 2, n. 2, p. 60-65, 2013.

PAULA et al. Volatile compounds in passion fruit seed oil (*Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado and *Passiflora alata* BRS Doce Mel). **Chemical Engineering Transactions**, v. 44, 2015a.

PAULA, R. C. M. **Óleo de semente de maracujá (*Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado e *Passiflora alata* BRS Doce Mel): Propriedades químicas e efeito do processamento no perfil de compostos voláteis**. 2015, 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2015b.

PEIXOTO M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO F.G., JUNQUEIRA N.T.V., BRAGA M.F. (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.456-464, 2005.

PELEGRINI, P. B.; E.F. NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A. R.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; FRANCO, O. L. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1141–1146, 2006.

PERASSOLO, M.; QUEVEDO, C. V.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. M. Stimulation of the proline cycle and anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures in the presence of glutamate and two proline analogs. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 106, p. 153–159, 2011.

PEREIRA, C. A. M. *et al.* A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 152, p. 241-248, 2004.

PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J. H. Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P.*

edulis Sims e *P. incarnata* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 3, p. 1-12, 2000.

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.

PERRICONE, M.; ARACE, E.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 76, p. 1-7, 2015.

PERRY, N. S.; HOUGHTON, P. J.; THEOBALD, A.; JENNER, P.; PERRY, E. K. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. **Journal Pharm Pharmacol**, v. 52, n. 7, p. 895-902, 2000.

PESHEV, D.; VERGAUWEN, R.; MOGLIA, A.; HIDEG, E.; VAN DEN ENDE, W. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans?. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1025–1038, 2013.

PETRY, R. D.; REGINATTO, F. H.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B *et al.* Comparative pharmacological study of hydroethanol Standardisierung und Wirkung-extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 162–164, 2001.

PINTO, A. P. C. *et al.* *In vitro* organogenesis of *Passiflora alata*. **In vitro Cell Development**. São Paulo: ESALQ/USP, p. 28-33, 2010.
PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos: a aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 4, p. 12-15. 1998.

POLSKA X. Farmakopea, Salicis corticis extractum siccum - Wyciąg suchy z kory wierzby. **Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne**. Warszawa. Tom I, p. 1591–1593, 2014.

PRAVEEN, N.; THIRUVENGADAM, M.; YANG, Y. S.; KIM, S. H.; MURTHY, H. N.; CHUNG I. M. Production of gymnemic acid from hairy root cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. as influenced by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**. v. 54, p. 54–61, 2014.

PRAVEENA, N.; THIRUVENGADAMA, M.; YANGA, Y. S.; KIMA, S. H.; MURTHYB, H. N.; CHUNGA, I. M *et al.* Production of gymnemic acid from hairy root cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. as influenced by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 54–61, 2014.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I, H, C.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plan Physiology**. v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.

PU, G-B.; MA, D-M.; CHEN, J-J.; MA, L-Q.; WANG, H.; LI, G-F.; YE, H-C.; LIU, B-Y. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Plant Cell Reports**, v. 28, p.1127–1135, 2009.

PURICELLI, L.; AICAB, I. D.; SARTORB, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 302-304, 2003.

RAFFAELLI, A.; MONETI, G.; MERCATI, V.; TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnate*. **Journal of Chromatography A**, n. 777, p. 223–231, 1997.
RAI MAURYA RAI, R. P.; MAURYA, M.S. Synthesis and evaluation of antibacterial activity of vanillin derivatives. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, p. 275–276, 1996.

RAM, M.; PRASAD, K. V.; SINGH, S. K.; HADA, B. S.; KUMAR, S. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, p. 459–467, 2013.

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

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-53, 2002.

RAO, S.; ABISHEK, B.; KENNETH, A. S.; WU, C. G.; JOHNSON, S. K.; BLANCHARD, C. L. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in *Sorghum grains*. **Journal of Cereal Science**, 2018.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REA, G.; ANTONACCI, A.; LAMBREVA, M.; PASTORELLI, S.; TIBUZZI, A et al. Integrated plant biotechnologies applied to safer and healthier food production: the Nutra-Snack manufacturing chain. **Trends in Food Science & Technology**. v. 22, p. 353–366, 2011.

RIBEIRO, S. M.; ALMEIDA, R. G.; PEREIRA, C. A. A.; MOREIRA, J. S.; PINTO, M. F. S et al. Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins. **Peptides**, v. 32, p. 868–874, 2011.

RIBEIRO, V. A. R.; RIBEIRO, H. B.; SALGUEIRO, C. L.; SATO, A. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6392-6395, 2009.

RIZZELLO, F.; DE PAOLIS, A.; DURANTE, M.; BLANDO, F.; MITA, G.; CARETTO, S. Enhanced Production of Bioactive Isoprenoid Compounds from Cell Suspension Cultures of *Artemisia annua* L. Using β -Cyclodextrins. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 15, p. 19092-19105, 2014.

ROCHA, A. S.; ROCHA, E. K.; ALVES, L. M.; MORAES, B. A.; CASTRO, T. C.; ALBARELLO, N.; SIMÕES-GURGEL, C. Production and optimization through elicitation of carotenoid pigments in the *in vitro* cultures of *Cleome rosea* Vahl (Cleomaceae). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. v. 24, n. 1, p. 105–113, 2015.

RODRIGUES, K. A. D. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M. P., CARVALHO, F. A. D. A.

Syzygiumcumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal Ethnopharmacol.** v. 160, p. 32–40, 2015.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODASSA, G.; INTERDONATO, R.; JUAN, A.; HILAL, G. M.; PRADO, F. E. Soluble-sugars-metabolism, sensing and biotic stress. **Plant Signaling & Behaviour**, v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009.

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

SAINI, S. S.; TEOTIA, D.; GAID, M.; THAKUR, A.; BEERHUES, L.; SIRCAR, D. Benzaldehyde dehydrogenase-driven phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated *Pyrus pyrifolia* cell cultures. **Journal of Plant Physiology**, v. 215, p. 154–162, 2017.

SÁK, M.; DOKUPILOVÁ, I.; MIHÁLIK, D.; LAKATOŠOVÁ, J.; GUBIŠOVÁ, M.; KRAIC, J. elicitation of phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* l. by phaeomoniella chlamydospora. **Nova biotechnological chimica**, p. 13-2, 2014.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* Genus.

Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 22, n. 6, p.1219-1232, 2012.

SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 112-117, 2010.

SANTOS, K. C.; KURTZ, S. M. T. F.; MULLER, S. D.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R. M. M. W.; SANTOS, C. A. M. Sedative and anxiolytic effects of methanolic extract from the leaves of *Passiflora actinia*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p.565-573, 2006.

SANTOS-GOMES, P. C, FERNANDES-FERREIRA, M. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2260-2266, 2003.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, MARGARET, M.; ATHERTON, C; MCMICHEN, M. P, GRACE; ROWNTREE, J. K. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. n. 42, p. 206-214, 2006.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, p. 56–64, 2014.

SARKATE, A.; BANERJEE, S.; MIR, J. I; ROY, P.; SIRCAR, D. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 641–649, 2017.

SASIKALA, V.; SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Passiflora foetida* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 600-603, 2011.

SAW, N. M. M. T.; RIEDEL, H; KÜTÜK, O.; RAVICHANDRAN, K.; SMETANSKA, I. Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures. **Energy Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 189–192, 2010.

SCHIAVON, M.; MORO, I.; PILON-SMITS, E. A. H.; MATOZZO, V.; MALAGOLI, M.; VECCHIA, F. D. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. **Aquatic Toxicology**. p. 122–231, 2012.

SCHMIDT, T.; KHALID, S.; ROMANHA, A.; ALVES, T.; BIAVATTI, M.; BRUN, R.; DA COSTA, F.; DE CASTRO, S.; FERREIRA, V.; DE LACERDA, M et al. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads against Protozoan Neglected Diseases–Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128-75, 2012.

SCHULZ, M.; BILUCA, F. C.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. S. C.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; GOIS, J. S.; ALMEIDA, T. S.; BORGES, D. L. G.; MILLER, P. R. M.; COSTA, A. C. O.; FETT, R.

Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of açara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447–454, 2017.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,2,5-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 555-61, 1996.

SETYANINGSIH, W *et al.* Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. **Food Chemistry**, v. 192, p. 452-459, 2016.

SGHAIER, M. B.; SKANDRANI, I.; NASR, N.; FRANCA, M. D.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 336–348, 2011.

SHANMUGAM, S.; GOMES, I. A.; DENADAI, M.; LIMA, B. DOS S.; ARAÚJO, A. A. S *et al.* UHPLC-QqQ-MS/MS identification, quantification of polyphenols from *Passiflora subpeltata* fruit pulp and determination of nutritional, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase key enzymes inhibition properties. **Food Research International**, v. 108, p. 611–620, 2018.

SHANMUGAM, S.; MURUGAIYAN, I.; DOS SANTOS LIMA, B.; SERAFINI, M. R.; DE SOUZA ARAÚJO, A. A.; NARAIN, N.; THANGARAJ, P. HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

SHANMUGAM, S.; MURUGAIYAN, I.; LIMA, B. S.; SERAFINI, M. R *et al.* HPLC–DAD–MS identification of polyphenols from *Passiflora leschenaultii* and determination of their antioxidant, analgesic, anti-

inflammatory and antipyretic properties. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

SHANNON, J. C. A procedure for extraction and fractionation of Carbohydrates from immature *Zea mays* Kernels. **Research bulletin**. p. 1-8, 1968.

SHARMA, N.; CHANDEL, K. P. S.; SRIVASTAVA, V. K. *In vitro* propagation of *Coleus forskohlii* Briq, a threatened medicinal plant. **Plant Cell Reports**. v. 10, p. 67-70, 1991.

SHI, G. F.; AN, L. J.; JIANG, B.; GUAN, S.; BAO, Y. M. Alpinia protocatechuic acid protects against oxidative damage *in vitro* and reduces oxidative stress *in vivo*. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 403, p. 206-210, 2006.

SHUAYPROM, A.; SANGUANSEMSRI, D.; SANGUANSEMSRI, P.; FRASER, I. H.; WONGKATTIYA, N. Quantitative determination of vitexin in *Passiflora foetida* Linn. leaves using HPTLC. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2016.

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

SIEBRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. R.; MARTINS, A. O. B. P. B.; SIEBRA, D. C et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.

SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, v. 17, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G.; MELETTI, L. M. M et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *In vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, p. 882–890, 2013.

- SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R. K. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, p. 273-279, 2012.
- SLESÁK, I.; HALDAS, W.; SLESÁK H. Influence of exogenous carbohydrates on superoxide dismutase activity in *Trifolium repens* L. explants cultured *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 48, n. 1, p. 93-98, 2006.
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v. 132, p. 1-45, 1996.
- SOARES, A. G. **Antioxidantes, fenólicos, flavonoides e voláteis**. Palestra In: II Workshop da Rede Passitec—Avanço tecnológico para uso funcional de Passifloras comerciais e silvestres, 18 a 20/05/2011. p. 8, 2011.
- SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; CARNEIRO VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing brazilian species. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 51, p. 247–258, 2008.
- 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)**. 2014, 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina –UFSC, 2014.
- SOZO, J. S.; CRUZ, D. C.; PAVEI, A. F.; PEREIRA, I. M. C.; WOLFART, M.; RAMLOV, F.; MONTAGNER, D. F.; MARASCHIN, M.; VIANA, A. M. *In Vitro* Culture and Phytochemical Analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). 2 ed, p. 13-30, 2016. In: Walker, J. M. *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2016, p. 460.
- SPELMAN, K.; DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J. The synergy principle at work with plants, pathogens, insects, herbivores and

humans. In.: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B. (eds.) **Natural Products from Plants**, Second Editions, Sara Warber, James A Duke, Harry L Brielmann. CRS Press, Taylor & Francis Group, Lic, FL, USA, p. 475-500, 2016.

SPELMAN, K.; DUKE, J. A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M. J. **The synergy principle at work with plants, pathogens, insects, herbivores and humans**. In.: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B. (eds.) **Natural Products from Plants**, Second Editions, Sara Warber, James A Duke, Harry L Brielmann. CRS Press, Taylor & Francis Group, Lic, FL, USA, p. 475-500, 2016.

STEŠEVIĆ, D.; BOŽOVIĆ, M.; TADIĆ, V.; RANČIĆ, D.; STEVANOVIĆ, Z. D. Plant part anatomy related composition of essential oils and phenolic compounds in *Chaerophyllum coloratum*, a Balkan endemic species. **Flora**, v. 220, p. 37–51, 2016.

SUDRIÁ, C.; PIÑOL, M. T.; PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R. M.; VILA, R.; MORALES, C.; BONFILL, M.; CAÑIGUERAL, S. Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 58, p. 177-184, 1999.

SUJANA, N.; RAMANATHAN, S.; VIMALA, V.; MUTHURAMAN M. S.; PEMAIHAH, B. Antitumour potential of *Passiflora incarnata* L. against Ehrlich ascites carcinoma. **International Journal de Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4 (Suppl 2): 17-20, 2012.

SULIMA, P.; KRAUZE-BARANOWSKA, M.; PRZYBOROWSKI, J. A. Variations in the chemical composition and content of salicylic glycosides in the bark of *Salix purpurea* from natural locations and their significance for breeding. **Fitoterapia**, v. 118, p. 118–125, 2017.

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

SZOPA, A.; EKIERT, H.; SZEWCZYK, A.; FUGAS, E. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams.

under different light conditions. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, n. 110, p. 329–336, 2012.

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

TAKSHAK, SWABHA.; 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 B: Biology**. v. 140, p. 332–343, 2014.

TANAKA, T.; TANAKA, T.; TANAKA, M. Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 3, n. 1, p. 27-33, 2011.

TASHACKORI, H.; SHARIFI, M.; CHASHMI, N. A.; SAFAIE, N.; BEHMANESH, M. Induced-differential changes on lignan and phenolic acid compounds in *Linum album* hairy roots by fungal extract of *Piriformospora indica*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 127, p. 187–194, 2016.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 182 p., 2005.

THANHA, N. T.; MURTHYA, H. N.; PAEK, K. Y. Optimization of ginseng cell culture in airlift bioreactors and developing the large-scale production system. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 343–348, 2014.

THIRUVENGADAM, M.; CHUNG, I-M. Phenolic compound production and biological activities from *in vitro* regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.). **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295-301, 2015.

THIRUVENGADAM, M.; PRAVEEN, N.; KIM, E-H.; KIM, S-H.; CHUNG, I-M. Production of anthraquinones, phenolic compounds and biological activities from hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. **Protoplasma**, v. 251, p. 55-566, 2014.

TONINI, L. M. **Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade Leishmanicida de compostos utilizando *Leishmania amazonensis* expressando a enzima beta-galactosidase.** 2013, 119 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Biociências). Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa Produção de informação; Embrapa Hortaliças, v. 1, p. 509, 1999.

TRETHEWEY, R. N. Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 196-201, 2004.

TUAN, P *et al.* Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10911-10917, 2010.

UDOMSUK, L.; JARUKAMJORN, K.; TANAKA, H.; PUTALUN, W. Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. **Biotechnol Lett**, v. 33, p.369–374, 2011.

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

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R, H. **Method for glucose determination and other sugars.** Manometric techniques, Burgess Publishing Co, Red Lion, PA, USA, 1964.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN DEN ENDE, W. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides, **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-11, 2013.

VANEGAS-ESPINOZA, P. E.; RAMOS-VIVEROS, V.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. R.; LÓPEZVILLEGAS, O *et al.* Plastid analysis of pigmented undifferentiated cells of marigold *Tagetes erecta* L. by transmission electron microscopy. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, p. 596–603, 2011.

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

VARMA, R. S.; SHUKLA, A. Evaluation of vanillic acid analogues as a new class of antifilarial agents. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, n. 10, 1993.

VARMA, R. S.; SHUKLA, A.; CHATTERJEE, R.K. Evaluation of vanillic acid analogues as a new class of antifilarial agents. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 31, p. 819–821, 1993.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant Cell and Tissue Culture**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 17-36, 1994.

VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyldopamine induced neurotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 501, p. 106-111, 2010.

VEERASHREE, V.; ANURADHA, C. M.; KUMAR, V. Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, n. 108, p. 27–35, 2012.

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

VICTÓRIO, C. P.; LEAL-COSTA, M. V.; TAVARES, E. S.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Effects of Supplemental UV-A on the Development, Anatomy and Metabolite Production of *Phyllanthus tenellus* Cultured *In Vitro*. **Photochemistry and Photobiology**, n. 87, p. 685–689, 2011.

VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp.** 2013, 102 f, Dissertação (Mestrado em ciências de alimentos e nutrição experimental) Univerdidade de São Paulo, 2013.

VIGANÓ, J.; AGUIAR, A. C.; MORAES, D. R.; JARA, J. L. P.; EBERLIN, M. N.; CAZARIN, C. B. B.; MARTÍNEZ, J. Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. **Food Research International**, v. 85, p. 51–58, 2016.

VINOTHIYA, K.; ASHOKKUMAR, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 640–652, 2017.

VINOTHIYA, K.; ASHOKKUMAR, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 640–652, 2017.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v. 60, p. 289–293, 2002.

WANG, G. R.; CHEN, Q. Z.; TANG, N.; LI, B. L.; FAN, D. L.; TANG, K. X. A split airlift bioreactor for continuous culture of *Glycyrrhiza inflata* cell suspensions. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 121, p. 121–126, 2015.

WIPO- World intellectual property organization. <http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling_the_neglect_of_leishmaniasis_infographic.pdf?ua=1> Acesso em outubro de 2018.

WIPO- World intellectual property organization. <<https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=US160392826&recNum=1&office=&queryString=FP%3A%28passiflora%29&prevFilter=&sortOption=Data+pub+ordem+inversa&maxRec=233>> Acesso em junho de 2016.

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

WOLFART, M. R. **Calos de Passifloras Silvestres: Indução, Caracterização morfo-histológica, metabólica e ultraestrutural**. 2015, 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2015.

WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; PALADINI, A.; DAJAS, F.; MEDINA, J. H. Possible Anxiolytic Effects of Chrysin, a Central Benzodiazepine Receptor Ligand Isolated From *Passiflora Coerulea*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, p. 1-4, 1994.

WOSCH, L.; SANTOS, K. C.; IMIG, D. C.; SANTOS, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 40–49, 2017.

XU, A; ZHAN, JI-C; HUANG, W-D. Combined elicitation of chitosan and ultraviolet C enhanced stilbene production and expression of chitinase and β -1,3-glucanase in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 124, p. 105–117, 2015a.

XU, A; ZHAN, JI-C; HUANG, W-D. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 122, p. 197–211, 2015b.

YANG, Z.; CAO, S.; CAI, Y.; ZHENG, Y. Combination of salicylic acid and ultrasound to control postharvest blue mold caused by *Penicillium expansum* in peach fruit. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 310–314, 2011.

YEH, C. T.; YEN, G. C. Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 561– 569, 2006.

YEOMAN, M. M.; YEOMAN, C. L. Manipulating secondary metabolism in cultures of plant cells. **New Phytologist**, n. 90, v.134, p. 553–569, 1996.

YOUSEFZADI, M.; SHARIFI, M.; BEHMANESH, M.; GHASEMPOUR, A.; MOYANO, E.; PALAZON, J. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis. **Biotechnol Lett.** v. 32, p. 1739–1743, 2010.

YU, Z-Z.; FU, C-X.; HAN, Y-S.; LI, Y-X.; ZHAO, D-X. Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of *Saussurea medusa*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p.1027–1031, 2006.

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

ZAFAR, N.; MUJIB, A.; ALI, M.; TONK, D.; GULZAR, B. Aluminum chloride elicitation (amendment) improves callus biomass growth and reserpine yield in *Rauvolfia serpentina* leaf callus. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 130, p. 357–368, 2017.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, v. 71, p. S117-S123, 2000.

ZENI, A. L. B.; CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P. Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice, **Steroids**, 2017.

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.

ZERAIK, M. L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J-N.; TITS, M.; YARIWAKE, J. H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and

myeloperoxidase activity assays. **Food Chemistry**, v. 128, p. 259–265, 2011.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Advances**, v. 23, p. 283–333, 2005.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. **Planta Med**, v. 58, n. 4, p. 338-41, 1992.

ZHUANG, X.; KOLLNER, T. G.; ZHAO, N.; LI, G.; JIANG, Y.; ZHU, L.; MA, J.; DEGENHARDT, J.; CHEN, F. Dynamic evolution of herbivore-induced sesquiterpene biosynthesis in sorghum and related grass crops. **The Plant Journal**, v. 69, p. 70–80, 2012.

ZIBADI, S. et al. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, n. 7, p-408-416, 2007.

ZIELIŃSKA, S.; PIĄTCZAK, E.; KALEMBA, D et al. Influence of plant growth regulators on volatiles produced by *in vitro* grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & C.A.Meyer) O. Kuntze. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 161-167, 2011.

ZUANAZZI, J. A. Z.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 576-614, 2003.

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

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

ANEXO A – Tabelas dos resultados da ANOVA

Tabela 45. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito dos tratamentos elicitação (EL) e tipos de explante (E) e suas interações.

Fonte de variação	g. l.	Fenólicos		Flavonoides		Luteína		Açúcares solúveis		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Elic (EL)	1	195,08***	2,22E-10	32,92***	3,06E-05	147,67***	1,95E-06	54,57***	8,34E-06	43,15***	6,46E-06
Expl (E)	1	1,95	0,181	522,98***	1,2E-13	21,44**	0,0017	162,25***	2,48E-08	97,91***	3,18E-08
Elic X Expl	1	30,28***	4,82E-05	57,84***	1,06E-06	14,25**	0,0054	118,98***	1,39E-07	71,83***	2,6E-07
g.l. Resíduo		16		16		8		12		16	

Elic= elicitação. Expl= explante. **=p<0,01. ***=p<0,001. n=5 repetições por tratamento, para fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante. n=3 repetições por tratamento, para luteína. n=4 repetições por tratamento para açúcares totais.

Tabela 46. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito dos tratamentos tempo de cultivo e tipos de fontes de carbono e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Luteína		Açúcares solúveis		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
TC	2	448,42***	9,82E-20	138,91***	6,39E-14	130,36***	7,26E-09	17,86***	5,32E-05	107,82***	1,02E-12
FC	1	3520,90***	1,45E-27	49,44***	2,86E-07	5,74*	0,034	170,08***	1,31E-10	4754,41***	4,16E-29
TC x FC	2	199,15***	1,14E-15	5,37	0,0118	5,99*	0,016	13,66***	0,00025	105,33***	1,31E-12
g.l. Resíduo		24		24		12		18		24	

TC= Tempo de cultivo. FC= fonte de carbono. *=p<0,05. ***=p<0,001. n=5 repetições por tratamento, para fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante. n=3 repetições por tratamento, para luteína. n=4 repetições por tratamento para açúcares totais.

Tabela 47. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, no controle não elicitado, o efeito dos tratamentos tempo de exposição e tipos de fontes de carbono e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Luteína		Açúcares solúveis		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
TE	1	471,35***	2,69E-13	451,57***	3,75E-13	136,54***	2,6E-06	35,21***	0,00034	343,05***	3,12E-12
FC	1	2785,01***	2,23E-19	314,32***	6,08E-12	6,45*	0,035	251,09***	2,52E-07	5495,31***	9,92E-22
TExFC	2	496,45***	1,8E-13	33,28***	2,87E-05	5,74*	0,044	46,79***	0,00013	368,21***	1,81E-12
g.l. Resíduo		16		16		8		8		16	

TC= Tempo de cultivo. FC= fonte de carbono. *= $p < 0,05$. ***= $p < 0,001$. n=5 repetições por tratamento, para fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante. n=3 repetições por tratamento, para luteína. n=3 repetições por tratamento para açúcares totais.

Tabela 48. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, nos tratamentos elicitados, o efeito dos tratamentos tempo de exposição e tipos de fontes de carbono e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Luteína		Açúcares solúveis		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
E	1	169,04***	6,93E-10	341,14***	3,25E-12	38,04***	0,0003	149,50***	1,86E-06	3,78	0,069
FC	1	3614,65***	2,8E-20	580,34***	5,34E-14	3,68	0,091	373,81***	5,31E-08	1017,24***	6,54E-16
TExFC	2	281,68***	1,4E-11	220,58***	8,87E-11	0,028	0,87	5,28	0,051	12,56**	0,003
g.l. Resíduo		16		16		8		8		16	

TE= Tempo de exposição. FC= fonte de carbono. **= $p < 0,01$. ***= $p < 0,001$. n=5 repetições por tratamento, para fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante. n=3 repetições por tratamento, para luteína. n=3 repetições por tratamento para açúcares totais.

Tabela 49. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito dos tratamentos elicitação (EL) e tipos de explantes (E) e suas interações.

Fonte de variação	g. l.	Fenólicos		Flavonoides		Luteína		Açúcares solúveis		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Elic (EL)	1	1226,31***	7,77E-36	0,90	0,35	114,86***	1,25E-10	853,34***	1,12E-26	1661,09***	6,74E-39
Expl (E)	5	1324,68***	3,5E-50	77,07***	9,38E-22	137,13***	7,74E-17	525,33***	1,42E-32	600,81***	4,89E-42
EL x E	5	600,51***	4,95E-42	9,67***	1,95E-06	81,57***	2,91E-14	433,78***	4,22E-31	88,87***	4,47E-23
g.l. Resíduo		48		48		24		36		48	

Elic = elicitação. Expl= explante. ***=p<0,001. n=5 repetições por tratamento, para fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante. n=3 repetições por tratamento, para luteína. n=4 repetições por tratamento para açúcares totais.

Tabela 50. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito do tipo de explante (E) x concentrações de 2,4-D e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p
Expl (E)	2	127,39***	3,83E-29	56,36***	1,73E-17	911,26***	2,39E-68
2,4-D	3	240,05***	1,32E-47	26,58***	5,96E-13	122,91***	1,11E-34
E x 2,4-D	6	194,04***	1,86E-55	99,02***	1,4E-41	435,34***	3,09E-73
g.l. Resíduo		108		108		108	

Expl= explante. ***=p<0,001. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 51. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com sacarose, o efeito do tempo de cultivo e do tipo de explante e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p
TC	1	971,17***	3,37E-36	102,66***	4,29E-14	5159,97***	2,8E-55
Expl (E)	2	1326,0***	1,26E-46	55,61***	7,7E-14	1436,89***	1,51E-47
TC x Expl	2	278,12***	3,68E-29	73,69***	3,69E-16	450,78***	2,03E-34
g.l.		54		54		54	
Resíduo							

TC= tempo de cultivo. Expl= explante. ***=p<0,001. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 52. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com frutose, o efeito do tempo de cultivo e do tipo de explante e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p
TC	1	1433,19***	1,45E-40	216,93***	1,47E-20	10433,16***	1,79E-63
Expl (E)	2	688,83***	3,69E-39	4,97*	0,010	2170,41***	2,6E-52
TC x Expl	2	819,80***	3,95E-41	45,55***	2,57E-12	3795,86***	8,36E-59
g.l. Resíduo		54		54		54	

TC= tempo de cultivo. Expl= explante. * = p<0,05. ***=p<0,001. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 53. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com 30 dias de cultivo, o efeito de tipos de fonte de carbono e de tipos de explante e suas interações.

Fonte de variação	de g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
FC	1	5,41*	0,024	298,54***	1,17E-23	3093,36***	2,33E-49
Expl (E)	2	125,11***	5,35E-21	79,47***	8,16E-17	5015,56***	4,73E-62
FC x Expl	2	1861,96**	1,54E-50			92,06***	3,00E-18
		*		172,64***	3,47E-24		
g.l. Resíduo		54		54		54	

FC= fonte de carbono. Expl= explante. *= $p < 0,05$. ***= $p < 0,001$. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 54. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com 51 dias de cultivo, o efeito de tipos de fonte de carbono e de tipos de explante e suas interações.

Fonte de variação	de g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
FC	1	157,78***	1,18E-17	143,80***	7,53E-17	577,36***	1,66E-30
Expl (E)	2	298,51***	6,42E-30	0,94	0,395074	72,62***	4,19E-16
FC x Expl	2	88,42***	9,23E-18	36,10***	1,11E-10	370,62***	2,89E-32
g.l. Resíduo		54		54		54	

FC= fonte de carbono. Expl= explante. ***= $p < 0,001$. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 55. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com sacarose, o efeito de elicitação (EL) e tipos de explante (E) e suas interações.

Fonte de variação	de g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p
Elic (EL)	1	87,86***	6,42E-13	5,39*	0,02	50,55***	2,73E-09
Expl (E)	2	412,52***	1,93E-33	186,43***	7,71E-25	847,79***	1,64E-41
EL x E	2	67,48***	2,05E-15	5,62**	0,006	122,45***	8,62E-21
g.l. Resíduo		54		54		54	

FC= fonte de carbono. Expl= explante. *= p<0,05. **= p<0,01. ***=p<0,001. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 56. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar, para o tratamento com frutose, o efeito de tipos de elicitação (EL) e tipos de explante (E) e suas interações.

Fonte de variação	de g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Atividade Antioxidante	
		F	p	F	p	F	p
Elic (EL)	1	40,14	4,92E-08	105,42***	2,67E-14	848,15***	1,07E-34
Expl (E)	2	871,18	8,05E-42	3,18*	0,049	216,91***	1,56E-26
EL x E	2	93,17	3,11E-18	154,29***	4,68E-23	1085,51***	2,49E-44
g.l. Resíduo		54		54		54	

FC= fonte de carbono. Expl= explante. *= p<0,05. ***=p<0,001. n=10 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante.

Tabela 57. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito do tipo de espécie e dos tipos de materiais vegetais e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		CE ₅₀		Poder redutor	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Espécie (E)	1	1478,18***	6,17E-14	390,24***	1,61E-10	1119,76***	3,22E-13	18,16***	0,001
Material (M)	2	72146,56***	8,09E-25	888,03***	9,14E-14	2629,85***	1,39E-16	489,83***	3,14E-12
E x M	2	1089,66***	2,70E-14	199,18***	6,25E-10	436,91***	6,18E-12	43,92***	3,01E-06
g.l. Resíduo		12		12		12		12	

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides, DPPH e poder redutor. .

Tabela 58. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito da idade das culturas no momento da elicitação e dos tipos de explante (E) e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Poder redutor	
		F	p	F	p	F	p
Idade (I)	1	53,86***	8,09E-05	9,04E+15***	1,68E-61	34,18***	0,0004
Expl (E)	1	135,61***	2,69E-06	6,12E+15***	7,98E-61	241,12***	2,95E-07
I x E	1	0,660	0,44	9,04E+15***	1,68E-61	82,29***	1,76E-05
g.l. Resíduo		8		8		8	

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 59. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito de fontes de carbono e tempo de cultivo e suas interações. *P. tenuifila* QMC (dados da Tabela 12).

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Poder redutor	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
FC	1	1,30	0,28	2,24E+09***	5,34E-51	709,11***	4,83E-12
TC	2	186,50***	9,7E-10	4,53E+10***	5,42E-60	47,69***	1,95E-06
FC x TC	2	146,50***	3,7094E-09	6,95E+08***	4,15E-49	197,94***	6,49E-10
g.l. Resíduo		12		12		12	

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 60. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito de tipo de explante e elicitação e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Poder redutor	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Expl (E)	1	53,92***	8,04E-05	885,17***	1,77E-09	2028,03***	6,5E-11
Elic (EL)	1	119,04***	4,41E-06	5891,79***	9,25E-13	2200,93***	4,71E-11
E x EL	1	29,48***	0,00062	9653,78***	1,29E-13	426,50***	3,17E-08
g.l. Resíduo		8		8		8	

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 61. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito de tipo de explante (E) e elicitação (EL) e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		DPPH CE ₅₀		Poder redutor	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Expl (E)	5	294,84***	1,01E-20	436,96***	9,67E-23	26,64***	4,64E-09	11,82***	7,6E-06
Elic (EL)	1	1023,66***	3,4E-21	140,91***	1,56E-11	329,57***	1,59E-15	25,49***	3,68E-05
E x EL	5	137,93***	7,2E-17	353,33***	1,2E-21	12,12***	6,25E-06	20,34***	6,38E-08
g.l.	24			24		24		24	
Resíduo									

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 62. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito, em sacarose, de tipo de explante (E) e elicitação (EL) e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		DPPH CE ₅₀		Poder redutor	
		F	p	F	p	F	p	F	p
Expl (E)	2	207,61***	4,91E-10	768,67***	2,16E-13	53,96***	1E-06	15,58***	0,0005
Elic (EL)	1	110,44***	2,09E-07	0,185	0,67	107,13***	2,47E-07	0,229	0,641
E x EL	2	58,08***	6,74E-07	1190,07***	1,59E-14	1,37	0,291702	14,46***	0,0006
g.l. Resíduo		12		12					12

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 63. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito, em frutose, de tipo de explante (E) e elicitação (EL) e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		Poder redutor	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Expl (E)	2	160,21***	2,21E-09	3136***	4,85E-17	34,96***	9,8E-06
Elic (EL)	1	28,09***	0,000018	400***	1,49E-10	4,56	0,054
E x EL	2	116,38***	1,39E-08	1516***	3,75E-15	23,95***	6,46E-05
g.l. Resíduo		12		12			

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.

Tabela 64. Sumário dos resultados da ANOVA fator duplo para examinar o efeito da idade das culturas no momento da elicitação e tipo de explante e suas interações.

Fonte de variação	g.l.	Fenólicos		Flavonoides		DPPH CE ₅₀		Poder redutor	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Idade (I)	1	197,98***	6,48E-10	556***	1,48E-12	73,46***	1,853E-07	126,58***	8,59E-09
Expl (E)	2	432,20***	8,87E-11	9***	1,43E-05	1,65	0,2232458	37,35***	5,24E-05
I x Expl	2	67,23***	3,02E-07	76***	1,53E-07	40,19***	4,807E-06	118,75***	1,24E-08
g.l. Resíduo		12		12		12		12	

***=p<0,001. n= 3 repetições por tratamento para fenólicos, flavonoides e poder redutor.