



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Raphaella Reis dos Santos Tierno

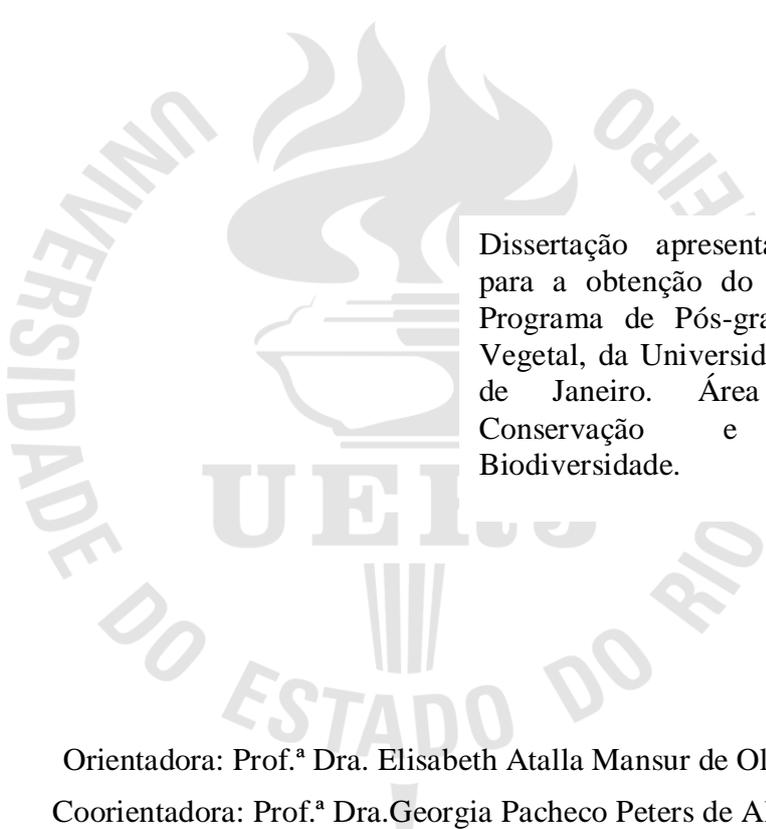
Cultura *in vitro* de *Arachis repens* Handro: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz

Rio de Janeiro

2017

Raphaela Reis dos Santos Tierno

Cultura *in vitro* de *Arachis repens* Handro: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz



Dissertação apresentada, como requisito para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Conservação e Utilização da Biodiversidade.

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

Coorientadora: Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Rio de Janeiro

2017

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

T564 Tierno, Raphaela Reis dos Santos
Cultura *in vitro* de *Arachis repens* Handro: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz/ Raphaela Reis dos Santos Tierno. – 2017.
96 f. : il.

Orientador.: Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira
Coorientador.: Georgia Pacheco Peters de Almeida
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Leguminosa - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 3. Fenóis – Teses. 4. Antioxidantes. I. Oliveira, Elisabeth Atalla Mansur de. II. Almeida, Georgia Pacheco Peters de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV Título.

CDU 582.736

Patrícia Bello Meijinhos – CRB7/5217 - responsável pela elaboração da ficha catalográfica

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

Assinatura

Data

Raphaela Reis dos Santos Tierno

Cultura *in vitro* de *Arachis repens* Handro: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de julho de 2017

Orientadoras:

Prof.^a Dra. Elisabeth Atalla Mansur de Oliveira (Orientadora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida (Coorientadora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Rachel Fatima Gagliardi Araujo
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.^a Dra. Claudia Simões Gurgel
Universidade do Estado do Rio de Janeiro- UERJ

Prof. Dr. André Marques Mesquita
Fundação Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Simone e Raimundo, pela dedicação e carinho.
Ao meu esposo, pelo amor, companheirismo e imensa paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fôlego de vida de todos os dias.

Ao Pasquale, meu querido esposo, que nesses dois anos de trabalho tem me dado todo apoio de que eu preciso, pelo carinho, dedicação, idas ao cinema para relaxar essa esposa estressada e pela “paciência de Jó” que só você tem. Obrigada, meu anjo da guarda!

Aos meus pais, pelos ensinamentos de caráter e integridade, que me ajudaram a chegar até aqui. Aos meus irmãos pela paciência, apoio e momentos de alegria. E não podia deixar de incluir o novo membro da família, meu 1/3 de genes, que traz vida nova pra mim todos os dias com aquele sorriso lindo de seis dentes. Obrigada, sobrinho Davi (Loloco da tia).

À Profa. Dra. Elisabeth Mansur, pela orientação e ensinamentos desde minha iniciação científica. Por todas as vezes que disse: “Senta aqui e estuda isso” ou “Você precisa ler mais, Raphaela” e principalmente por dizer “Eu sei que você consegue, só precisa focar”. Obrigada, Beth.

À Georgia Pacheco, pela coorientação, amizade, por todo apoio, por todos os dias de companheirismo, risadas, cinema (1 dia) e momentos de descontração que aliviaram a tensão desses dois anos de trabalho.

À Renatinha, pela dedicação de todos os dias não só comigo, mas com todos os alunos. Já disse que a alma do Labmit é você. Anjo da guarda de todos os alunos e sorriso que alegra nossos dias (dá pra saber quando você está chegando ainda no corredor).

À Rachel, por todo carinho, apoio, ajuda, ensinamentos, pelo exemplo de profissional e de pessoa e pelas maravilhosas aulas de biotecnologia vegetal.

À minha dindinha, Dr^a Bianka Soares, acho que por tudo. Pelas fotos deste trabalho (‘Essa foto está fora de foco, me dá isso aqui’), pela pipetagem (‘Eu pipeto mais rápido, me dá isso aqui!’), pelas idas ao Cadeg (‘Aproveito e compro minhas cervejas’), mas principalmente por todo apoio em tudo que preciso, pelo carinho, respeito, momentos de alegria e por todo companheirismo que você tem comigo. Obrigada por me ensinar que tudo que a gente quer pode conseguir com trabalho e força de vontade, por me impulsionar a ser uma pessoa melhor todo dia (mesmo que as vezes eu não consiga). Obrigada, Dinda.

Aos colegas do Labmit: Marcela, Isabela, Ana, Gabriel, Mariela, por toda ajuda, momentos de risadas, pelos congressos e por transformar um pesado dia de trabalho em uma jornada leve e divertida. Mari, obrigada pela trilha sonora de todos os dias de laboratório. Elas alegram nossos dias, apesar da Simone e Simaria.

À Jamine, pelas gargalhadas de todos os dias, pela amizade, carinho, pelos brigadeiros e chocolates que fazem nossa vida feliz até o momento que a gente lembra que vai engordar (o que vale é o momento), pelas cantorias nos nossos momentos de trabalho árduo (morro com essas músicas). Obrigada por estar em todos os momentos importantes nesses anos de convivência (até na forma de papelão). Obrigada.

Aos colegas do Labplan, que dividem conosco o espaço físico, as aflições e angústias de dias de precariedade da Universidade, mas também momentos de alegria e parceria.

Ao Leo Garcia, meu padrinho de casamento, padrinho de Labmit (rs) e ex-pai do ‘*repens*’. Obrigada por todo apoio, carinho e ensinamentos.

Um obrigada especial para Nathalia Falsia, por todo carinho e dedicação que teve com o trabalho, por ter adotado o ‘*repens*’ como afilhado.

Às minhas amigas, Marcia Machado, Ivonilci Lima, Vanderleia Alves e Vanda Nicacio por me fortalecerem na fé, pela amizade e por compreender minha ausência nesse momento.

Às minhas queridas, Kate, Mari e Andressa, por todo carinho, insistência e amizade incondicional, mesmo com toda distancia. Vocês fazem parte da minha historia.

À Profa. Cátia Callado e à Jeane, do laboratório de Anatomia Vegetal, pela colaboração na realização das análises histológicas.

Ao Prof. Davyson Moreira da FIOCRUZ, pelas análises fitoquímicas, fundamentais na conclusão desse trabalho.

Aos farmacêuticos, Eduardo Fonseca e Iranilda Calado, pela ajuda com as amostras de extrato e por todo apoio técnico.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

Ignore seu desânimo e simplesmente faça o que tem que fazer. O ânimo costuma vir logo depois. Mas se não vier, aprenda a seguir sem ele.

Renato Cardoso

RESUMO

TIERNO, R.R.S. **Cultura *in vitro* de *Arachis repens* Handro**: análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos sob diferentes qualidades de luz. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Arachis repens Handro, popularmente conhecida como grama amendoim, é utilizada como planta ornamental, forragem e para cobertura do solo, possuindo reprodução predominantemente vegetativa e escassa produção de sementes. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer sistemas de cultura de calos, assim como caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante de extratos dos materiais cultivados sob diferentes qualidades de luz. O estabelecimento de plantas *in vitro* foi obtido a partir de segmentos caulinares excisados de plantas mantidas em casa de vegetação após pré-tratamento com o inseticida Icon Garden[®] por três dias, seguindo-se a inoculação em meio MS contendo Agrimicina[®] a 300 mg/L, sem adição de reguladores de crescimento. As culturas foram incubadas a 30 ± 2 °C em câmaras de crescimento, sob luz fluorescente branca ou sob LEDs vermelho, azul, branco ou misto (vermelho+azul). A incubação sob LED vermelho resultou em um aumento significativo na altura das plantas. Para a indução de calogênese, segmentos caulinares excisados de plantas obtidas *in vitro* foram cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM e incubados sob as mesmas condições de luminosidade. Segmentos nodais cultivados sob luz fluorescente branca apresentaram formação de calos compactos ou friáveis. Segmentos internodais também originaram calos friáveis, compactos ou mistos, em diferentes frequências. Os calos apresentaram respostas morfogênicas distintas. Na avaliação da produção de calos sob os diferentes tipos de LEDs, foi observado maior percentual de calos compactos a partir de segmentos internodais cultivados sob LED branco. Entretanto, a maior produção de calos friáveis ocorreu em resposta à incubação sob LED vermelho. Por outro lado, o cultivo sob LED azul resultou em maior percentual de formação de calos mistos. A caracterização fitoquímica dos diferentes materiais de *A. repens* foi realizada por meio de análises cromatográficas. A análise por CCD permitiu a identificação do resveratrol, bem como a presença de outros grupos de substâncias. Os resultados obtidos por CLAE confirmaram a presença de *trans*-resveratrol nos extratos de calos incubados nos diferentes tipos de LEDs, sendo o maior teor detectado nos extratos de calos derivados de segmentos nodais incubados sob LED misto. A avaliação do potencial antioxidante dos extratos dos materiais produzidos *in vitro* foi realizada por meio do ensaio de DPPH e o conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu. Os extratos etanólicos de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados sob LED misto mostraram maior concentração de fenóis totais e maior potencial antioxidante. A utilização dos LEDs na cultura de tecidos induziu um aumento na qualidade das plantas e acarretou no acréscimo de substâncias bioativas e atividade antioxidante.

Palavras chaves: Calogênese. Grama amendoim. Antioxidantes. Cromatografia. *Trans*-resveratrol.

ABSTRACT

Tierno, R.R.S. ***In vitro* culture of *Arachis repens* Handro**: phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of materials produced under different light qualities. 2017. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Arachis repens Handro, commonly known as perennial peanut grass, is used as an ornamental, forage and ground cover, with vegetative reproduction and very low seed production. The present work aimed at establishing callus culture systems, as well as the characterization of the phytochemical profile and the antioxidant potential of extracts from *in vitro* materials produced under different light qualities. The establishment of *in vitro* plants was accomplished from stem segments excised from plants grown in greenhouse, after pre-treatment with Icon Garden[®] insecticide for three days, followed by inoculation on MS medium containing Agrimicina[®] at 300 mg/L, without growth regulators. These cultures were incubated at 30 ± 2 ° C in growth chambers under white fluorescent light or under red, blue, white or mixed (red + blue) LEDs. Incubation under red LEDs resulted in a significant increase in plant height. For callus induction, stem segments excised from *in vitro* plants were cultured on MS medium supplemented with 13.6 μ M TDZ and incubated under the same light conditions. Nodal segments maintained under fluorescent white light gave rise to compact or friable calluses. Internodal segments also originated friable, compact or mixed callus, at different frequencies. The callus presented different morphogenic responses. In the evaluation of callus production under different types of LEDs, a higher percentage of compact calluses was observed from internodal segments cultured under white LED. However, the highest production of friable callus occurred in response to the incubation under red LED. On the other side, cultivation under blue LED resulted in a higher percentage of mixed calluses. The phytochemical characterization of the different materials of *A. repens* was performed by means of chromatographic analyzes. The TLC analysis allowed the identification of resveratrol, as well as the presence of other groups of substances. The results obtained by HPLC confirmed the presence of trans-resveratrol in the extracts of callus incubated under the different types of LEDs, and the highest content was detected in the extracts of calluses derived from nodal segments incubated under mixed LED. The evaluation of the antioxidant potential of the extracts of the *in vitro*-derived materials was carried out by DPPH assay and total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method. The ethanolic extracts of calluses derived from nodal and internodal segments incubated under mixed LED showed higher concentration of total phenols and higher antioxidant potential. The use of LED's in tissue culture induced an increase in the quality of the plants and resulted in the addition of bioactive substances and antioxidant activity.

Keywords: Callogenesis. Perennial peanut grass. Antioxidants. Chromatography. *Trans-resveratrol*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Amplitude da distribuição pontual das espécies do gênero <i>Arachis</i> de acordo com as Secções taxonômicas.....	24
Figura 2-	Distribuição geográfica de <i>Arachis repens</i> no Brasil.....	28
Figura 3-	<i>Arachis repens</i>	29
Figura 4-	Fórmula estrutural do resveratrol.....	30
Figura 5-	Isômeros do resveratrol.....	31
Figura 6-	Curva padrão do ácido gálico.....	41
Figura 7-	Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH.....	42
Figura 8-	Plantas de <i>Arachis repens</i> obtidas <i>in vitro</i> a partir de segmentos caulinares cultivados em meio MS0 e mantidos a 30±2°C sob diferentes qualidades de luz.....	45
Figura 9-	Formação de calos a partir de segmentos nodais e internodais de <i>Arachis repens</i> cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM, após 30 dias de cultura sob lâmpadas fluorescentes brancas a 30±2°C.....	46
Figura 10-	Morfogênese <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodais e internodais de <i>Arachis repens</i> cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM por 30 dias sob diferentes fontes de iluminação LED, a 30±2°C.....	48
Figura 11-	Acúmulo de biomassa (g) de calos friáveis derivados de segmentos nodais e internodais de <i>Arachis repens</i> cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM e mantidos sob diferentes qualidades de luz.....	49
Figura 12-	Histologia de calos obtidos a partir de segmentos nodais e internodais de plantas <i>in vitro</i> de <i>Arachis repens</i> inoculados em meio MS suplementado com TDZ a 13,4 µM e incubados sob diferentes tipos de LED.....	50
Figura 13-	Perfil cromatográfico para identificação de resveratrol em materiais de <i>A. repens</i> produzidos <i>in vitro</i> sob diferentes fontes de luz.....	52

Figura 14-	Cromatograma de CLAE-DAD-UV de extrato etanólico de calos derivados de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ 13,6 μ M e incubados sob luz fluorescente branca a 30°C, obtido após maceração por 30 minutos.....	53
Figura 15-	Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED misto (vermelho + azul).....	54
Figura 16-	Sobreposição do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados em diferentes tipos de luz.	55
Figura 17-	Conteúdo fenólico de extratos de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados sob diferentes tipos de luz, expressos em mg de equivalente de ácido gálico.....	56
Figura 18-	Percentual de captura do radical DPPH por extrato de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados em diferentes tipos de luz.....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Estrutura taxonômica do gênero <i>Arachis</i>	25
Quadro 2 -	Produção <i>in vitro</i> de metabólitos secundários em espécies <i>Arachis</i>	34
Tabela 1 -	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de segmentos caulinares de <i>Arachis repens</i> cultivados em meio MS0 e incubados sob diferentes tipos de luz a 30±2°C, por 30 dias.....	45
Tabela 2 -	Calogênese a partir de segmentos nodais e internodais excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>Arachis repens</i> e cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM, após 30 dias de cultura na presença de diferentes qualidades de luz, a 30±2°C	47
Tabela 3 -	Concentração de resveratrol nas amostras de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados sob diferentes tipos de luz....	54
Tabela 4 -	Concentração de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH (CE ₅₀) dos extratos etanólicos de calos derivados de segmentos nodais e internodais produzidos <i>in vitro</i> e incubados sob diferentes tipos de luz	57
Tabela 5 -	Comparação de conteúdo fenólico, atividade antioxidante e teor de <i>trans</i> -resveratrol em extratos de calos de segmentos nodais e internodais obtidos sob diferentes tipos de luz.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	Benzilaminopurina
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
IBA	Ácido indol butírico
LED	<i>Light emitting diode</i>
MS0	Meio de cultura Murashige & Skoog sem reguladores de crescimento
TDZ	Thidiazuron
CE ₅₀	Concentração de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	17
1.1 Produção de Metabólitos secundários.....	20
1.2 Gênero <i>Arachis</i>	22
1.2.1 Características gerais e distribuição geográfica.....	22
1.2.2 Espécies cultivadas.....	26
1.2.3 Produção de metabólitos secundários em <i>Arachis</i>	29
1.2.4 Cultura de tecidos vegetais em <i>Arachis</i>	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 METODOLOGIA.....	36
3.1 Material vegetal.....	36
3.1.1 Meios e condições de cultura.....	36
3.3 Cultura de tecidos Vegetais.....	36
3.3.1 Estabelecimento de plantas <i>in vitro</i>	36
3.3.2 Indução de calogênese.....	37
3.4 Análise histológica.....	38
3.5 Análise Fitoquímica.....	38
3.5.1 Preparo dos extratos.....	38
3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	39
3.5.3 Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
3.6 Determinação do conteúdo fenólico.....	40
3.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	41
3.7.1 Ensaio DPPH.....	41
3.8 Análise estatística	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Cultura de tecidos.....	44
4.1.1 Estabelecimento de plantas <i>in vitro</i>	44
4.1.2 Indução de calogênese a partir de segmentos caulinares de plantas <i>in vitro</i>	46
4.1.3 Caracterização histológica dos calos.....	50

4.2	Análise Fitoquímica	51
4.2.1	<u>Perfil qualitativo das amostras por CCD</u>	51
4.2.2	<u>Perfil quantitativo das amostras por CLAE</u>	52
4.3	Determinação do conteúdo fenólico	56
4.4	Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH	57
4.4.1	Ensaio DPPH	57
5	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES	66
	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE A – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob luz fluorescente branca	89
	APÊNDICE B – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED azul	90
	APÊNDICE C – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED azul.....	91
	APÊNDICE D – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED misto	92
	APÊNDICE E – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED branco	93
	APÊNDICE F – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED branco	94
	APÊNDICE G – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED vermelho	95
	APÊNDICE H – Perfil Cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de entrenó incubados sob LED vermelho	96

INTRODUÇÃO

1 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

A cultura de tecidos baseia-se na totipotência das células vegetais, que consiste na capacidade de uma única célula regenerar indivíduos completos geneticamente idênticos à matriz doadora, em resposta a sinais específicos. Teoricamente, todas as células vegetais possuem essa característica, embora a expressão da totipotencialidade seja dependente do nível de diferenciação do explante (NETO & ANDRADE, 2013). Outro fundamento da cultura de tecidos é a competência celular, que é a habilidade que uma ou mais células tem de responder a um estímulo, visando a um processo de desenvolvimento (GEORGE, 2008; ANDRADE, 2002). A cultura de tecidos vegetais permite o cultivo *in vitro* de pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) em meio nutritivo, sob condições adequadas de assepsia, luminosidade e temperatura (TORRES et al., 2000).

A micropropagação, técnica de cultura de tecidos que visa à produção de plantas completas, inicia-se com a escolha do explante, a descontaminação do material e a inoculação no meio de cultura. A descontaminação é um conjunto de procedimentos que visam à eliminação de micro-organismos (CID, 2001), sendo utilizados agentes descontaminantes, como hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio, álcool, entre outros, isoladamente ou em combinação, variando o tempo e a concentração, conforme a origem do material vegetal (ANDRADE et al., 2005). Após a descontaminação, os explantes são inoculados em meio nutritivo, sendo o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) o mais utilizado.

O processo de morfogênese *in vitro* pode ocorrer de três formas distintas: multiplicação de tecidos meristemáticos pré-existentes, indução de gemas adventícias por organogênese e indução de embriogênese somática (NETO & ANDRADE, 2013). A regeneração proveniente da proliferação de meristemas pré-existentes não ocorre pela desdiferenciação das células, já que o explante segue o curso normal de desenvolvimento através das regiões meristemáticas. Essa via é usada para micropropagação de várias espécies, sendo indicada para programas de conservação *in vitro* (GAGLIARDI et al., 2002a). A organogênese é o processo de formação de órgãos vegetais a partir de uma ou mais células que são desdiferenciadas e induzidas à

rediferenciação, podendo levar à formação de gemas adventícias (SILVA, MENDES & MOURAO FILHO, 2008). Na via organogênica, o sistema vascular das gemas produzidas é conectado com o tecido doador do explante (ANDRADE, 2002). Por outro lado, na embriogênese somática, embora as células vegetais também sofram um processo de desdiferenciação e rediferenciação, dando origem a embriões somáticos sem que tenha havido fusão de gametas (JIMÉNEZ, 2005), os embriões possuem sistema vascular independente do explante de origem e assemelham-se a embriões zigóticos, apresentando estruturas bipolares que possuem meristemas apicais e radiculares (REY & MROGINSKI, 2006).

A embriogênese somática constitui o maior exemplo da expressão da totipotencialidade dos tecidos vegetais, e vários estudos têm sido realizados para otimizar a frequência e qualidade dos embriões somáticos, entre os quais a manipulação das condições físicas da câmara de crescimento (luz, temperatura, umidade, etc.) e da composição do meio de cultura, incluindo o tipo e a concentração de fitorreguladores (PHILLIPS, 2004). Ambos os processos, organogênese e a embriogênese, podem ocorrer diretamente a partir das células dos explantes ou indiretamente, quando há formação de calos, massas desorganizadas de células, a partir das quais podem se formar gemas adventícias ou embriões somáticos (SILVA, MENDES & MOURÃO-FILHO, 2008). As células formadoras dos calos passam por uma fase de desdiferenciação, retornando ao estágio similar ao meristemático, podendo entrar em constante divisão celular, formando mais células de calo, ou sofrer rediferenciação, formando órgãos ou embriões (MANSUR, PACHECO & CARNEIRO, 2009).

A morfogênese *in vitro* é influenciada por vários fatores, incluindo o genótipo, o tipo de explante e as condições de cultura (ANDRADE, 2002), como a composição do meio basal, eo tipo e concentração dos reguladores de crescimento, que são os fatores mais estudados. As principais auxinas utilizadas são ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), picloram (PIC) e ácido 3-indolacético (AIA). Entre as citocininas adotadas mais frequentemente, encontram-se BAP (6-benzilaminopurina), zeatina, cinetina (KIN), além do thidiazuron (TDZ), que apresenta atividade citocinínica (JARDIM et al., 2010). Entretanto, além dos componentes do meio de cultura, devem também ser considerados fatores físicos, como a luz e a temperatura adotadas.

A luz exerce um papel fundamental no processo de fotossíntese, mas também tem uma importante função no desenvolvimento do vegetal, sendo responsável por direcionar seus movimentos (fototropismo). Os comprimentos de onda que correspondem ao vermelho (650-680nm), juntamente com o vermelho longo (710-740nm) são responsáveis por maior eficiência na fotossíntese, enquanto que aqueles que correspondem ao azul (425-490nm), violeta (400-425nm) e ultravioleta (280-400nm), ativam o fototropismo (SORGATO et al., 2015).

O conjunto de efeitos biológicos provocados pela luz nas plantas depende de sua absorção por receptores específicos (GODOI, GRANDIS & TAKAKI, 2009). Os fotorreceptores agrupam-se em três classes, a saber: fitocromos (absorção de vermelho e vermelho longo), criptocromos (absorção de azul e ultravioleta A) e fotorreceptores de UV-B (absorção na faixa de 280-320 nm) (MAJEROWICZ & PERES, 2004).

Nos sistemas *in vitro*, as condições de iluminação às quais as culturas estão expostas também influenciam significativamente a resposta morfogênica, não dependendo apenas da ausência ou presença, mas também da qualidade (comprimento de onda), quantidade (fluxo de fótons) e duração (fotoperíodo) (ROCHA et al., 2010).

As lâmpadas fluorescentes, utilizadas na maioria dos laboratórios (RIBEIRO et al., 2009), emitem comprimentos de onda na faixa entre 350nm e 750nm. Nos últimos anos, tem crescido a utilização dos diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light emitting diodes*), que emitem comprimentos de onda específicos, com baixa produção de calor e longo período de vida útil (NHUT et al., 2005; GUPTA & JATOTHU, 2013). Estudos sobre o efeito da qualidade de luz nas culturas de tecidos vegetais, com a utilização de LEDs, foram realizados em várias espécies, incluindo banana (NHUT et al., 2002), copo-de-leite (CHANG et al., 2003) e morango (ROCHA et al., 2010; NHUT et al., 2003).

A cultura de tecidos vegetais tem aplicação em diversas áreas, incluindo a micropropagação, a conservação, o intercâmbio de germoplasma, o melhoramento genético e a limpeza clonal (ANDRADE, 2002). A micropropagação tem sido utilizada com sucesso, tanto para plantas que normalmente se reproduzem vegetativamente, como para espécies com reprodução difícil. Sua principal vantagem para a produção comercial de plantas deve-se à capacidade de produção rápida e em períodos de tempo e espaços reduzidos (ERGI & SCHUCH, 2005) e à possibilidade de produzir plantas saudáveis e isentas de patógenos (RIBEIRO et al., 2010).

As técnicas de cultivo *in vitro* permitem ainda o estabelecimento de sistemas sustentáveis para a produção de metabólitos secundários, já que as condições de cultura podem ser moduladas para possibilitar maiores níveis de produção, em comparação a plantas crescidas em campo. Culturas de calos, células em suspensão e raízes são as técnicas mais empregadas para esta finalidade. As culturas em suspensão podem ser obtidas a partir de células individuais ou em grupos, dispersas em meio líquido, sob agitação e aeração (FUMAGALI et al., 2008).

1.1 Produção de metabólitos secundários

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas, constituídas por metabolitos primários e metabolitos secundários. Os processos considerados essenciais à vida das plantas tais como divisão e crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução, são definidos como metabolismo primário (FUMAGALI et al., 2008; CHAMPE, HARVEY & FERRIER, 2008).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal (RHODES, 1994). Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente relacionadas a mecanismos que permitem a adaptação das plantas aos seus ambientes, contribuindo para uma interação adequada com seus ecossistemas. Assim, os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência, possuindo uma grande variedade de efeitos biológicos, que incluem atividades antimicrobiana, antiviral ou alelopática (FUMAGALI et al., 2008). Além

disso, alguns constituintes, como flavonoides, são capazes de proteger as plantas dos efeitos danosos dos raios ultravioletas UVB (LI et al., 1993).

Ao contrário do metabolismo primário, as substâncias do metabolismo secundário são geralmente produzidas em pequena escala e podem ser específicas para determinados grupos de plantas (PEREIRA & CARDOSO, 2012). Usualmente, são classificadas segundo sua rota biossintética, sendo agrupadas em terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (FUMAGALI et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Os terpenos são derivados do ácido malônico ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (encontrado nos cloroplastos). São denominados de acordo com o número de isoprenos presentes na sua constituição (BERGAMASCHI, 2010). As substâncias fenólicas são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico, apresentando grupos benzênicos característicos, e tendo como substituintes grupamentos hidroxila (SILVA et al., 2010). Possuem função na dispersão de sementes, polinização, proteção contra patógenos e atividade alelopática (VIZZOTTO, KROLOW & WEBER, 2010). Os compostos nitrogenados, por outro lado, são derivados de aminoácidos aromáticos, como triptofano e tirosina (BERGAMASCHI, 2010). Esta classe é conhecida pela presença de substâncias que apresentam efeitos no sistema nervoso, e podem ser utilizadas como venenos ou alucinógenos (VIZZOTTO, KROLOW & WEBER, 2010).

Sistemas de cultura de tecidos vegetais têm sido amplamente estudados com vistas à produção de metabólitos secundários (CHARLET et al., 2000). As plantas que apresentam algum valor comercial agregado, como as que produzem substâncias bioativas ou com potencial ornamental e econômico, estão sujeitas a problemas decorrentes do extrativismo (VILLAREAL et al., 1997) e, por este motivo, pesquisas visando à biossíntese de metabólitos secundários *in vitro* são importantes dos pontos de vista ecológico e econômico.

Diversas espécies com potencial medicinal têm apresentado um aumento na produção de metabólitos de interesse em sistemas de cultura de células em suspensão, especialmente quando associadas ao uso de eliciadores bióticos ou abióticos. Por exemplo, a produção de antocianinas e ácidos fenólicos pôde ser aumentada na cultura de células em suspensão de uva utilizando-se leveduras (CAI et al., 2012). Fungos foram empregados em culturas de *A. hypogaea* para estimular a produção de estilbenoides (AISYAH et al., 2015) e também empregados em culturas de *Hypericum perforatum* L. para indução de substâncias fenólicas (CONCEIÇÃO et al., 2006). O

ácido salicílico foi aplicado, como eliciador abiótico, em folhas cultivadas *in vitro* de *Alternanthera tenella* para produção de betacianinas (RODRIGUES-BRANDÃO et al., 2014) e em plântulas de *Hypericum brasiliensis* Choisy, para a produção de rutina, quercetina e ácido betulínico (VELLOSO, ABREU & MAZZAFERA, 2009).

1.2 Gênero *Arachis*

1.2.1 Características gerais e distribuição geográfica

O gênero *Arachis* (amendoim) pertence à terceira maior família de Angiospermas, Fabaceae, que agrega cerca de 730 gêneros e 19.400 espécies (COSTA, 2012). O gênero é constituído atualmente por 81 espécies descritas, popularmente chamadas de amendoim (do tupi *mandubi*). Os frutos desenvolvem-se sob o solo, sendo também denominados *maní* (Paraguai, Uruguai, Panamá e Colômbia) e *acahuate* (México) (NASCIMENTO, 2006). No Brasil também é conhecido como mendobi, amendoí, menduí, manobi e midubim (MINI-VOCABULÁRIO TUPI-GUARANI). Em culturas indígenas, o amendoim é plantado e colhido pelas mulheres, que tem a responsabilidade de alimentar a aldeia, cabendo aos homens preparação do solo, antes do plantio (GASPAR, 2013).

O limite entre o Mato Grosso do Sul e o Paraguai, na Serra do Amambaí, é a provável área de origem do gênero. Nessa região, foram encontradas populações nativas de *Arachis guaranítica* Chodat & Hassl., considerada a espécie mais primitiva do gênero (SILVA, 2007; VALLS, 1996). A relevância do gênero *Arachis* na dieta pré-colombiana é evidenciada em achados arqueológicos de mais de 3.700 anos e no cultivo generalizado por populações primitivas (VALLS, 1996). Vestígios arqueológicos identificados como frutos de *Arachis duranensis* Krapov. & W.C. Greg. e *Arachis magna* Krapov, W.C. Greg. & C.E. Simpson no litoral do Peru reforçam a hipótese de que diferentes espécies silvestres podem ter sido levadas pelo homem para regiões fora

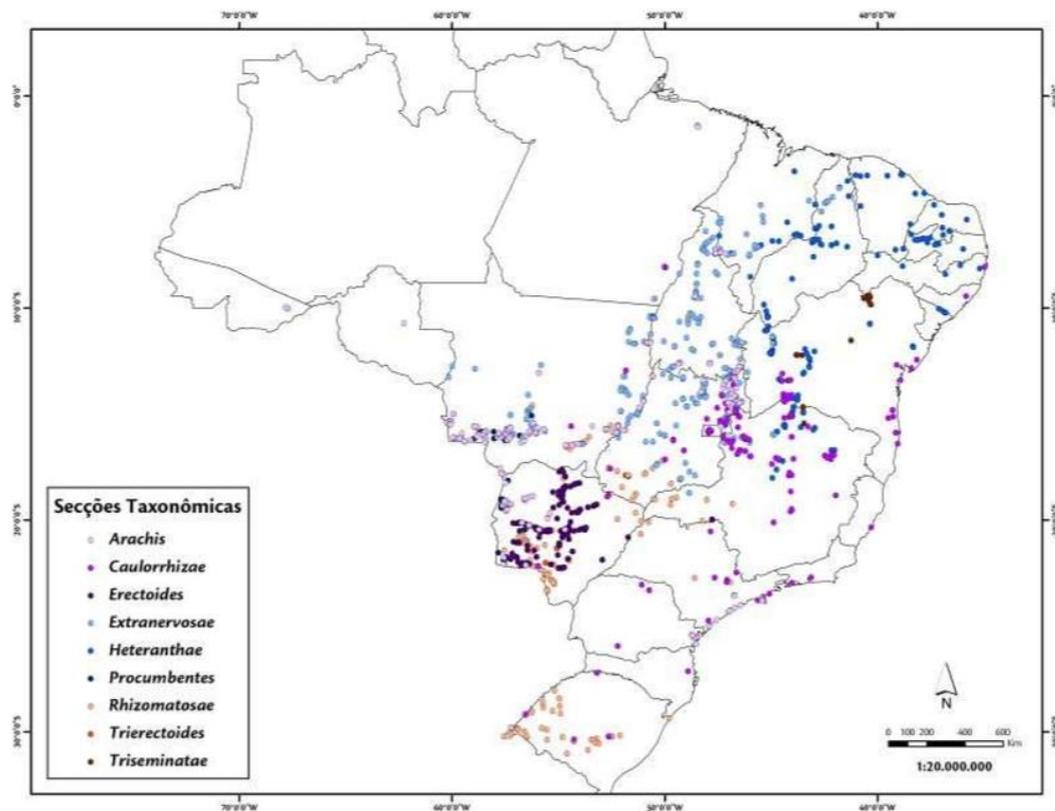
da sua ocorrência natural, criando a possibilidade de cruzamentos entre espécies alopátricas (VALLS, SILVA & MONÇONATO, 2000).

As espécies de *Arachis* estão agrupadas em nove Seções taxonômicas (*Arachis*, *Trirectoides*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Caulorrhizae*, *Extranervosae*, *Triseminatae* e *Heteranthae*), segundo suas características morfológicas, filogenéticas e compatibilidade de cruzamento (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994; VALLS & SIMPSON, 1994; VALLS & SIMPSON, 2005) (Quadro 1).

Todas as Seções ocorrem no Brasil, país onde se encontra o maior número de espécies, incluindo 65 das 81 espécies descritas (Figura 1). Quatro Seções são consideradas endêmicas, abrangendo um total de 47 espécies (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994; VALLS & SIMPSON, 2005), algumas com grande potencial agrícola e comercial (VALLS, SILVA & MONÇONATO, 2000).

Atualmente, o gênero *Arachis* encontra-se distribuído em cinco países da América do Sul (Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Bolívia), mas somente a Seção *Arachis* ocorre em todos eles (VALLS & SIMPSON, 1994). Essa distribuição limitada pode estar relacionada com a baixa capacidade natural de dispersão das espécies, devido à produção subterrânea dos frutos. O afastamento das sementes restringe-se a pouco mais de um metro de onde se encontra a planta mãe, o que resulta em populações com lenta expansão de perímetro e grande isolamento (VALLS, SILVA & MONÇONATO, 2000). Contudo, eventos naturais, como enchentes, podem auxiliar o processo de dispersão, arrastando a cobertura vegetal (VALLS, 2005).

Figura 1–Amplitude da distribuição pontual das espécies do gênero *Arachis* de acordo com as Secções taxonômicas.



Fonte: SCHÄFFER, 2012.

Quadro 1–Estrutura taxonômica do gênero *Arachis*

Seções	Espécies
1. <i>Trirectoides</i>	<i>A. guaranitica</i> , <i>A. tuberosa</i> , <i>A. sesquijuga</i>
2. <i>Erectoides</i>	<i>A. archeri</i> , <i>A. benthamii</i> , <i>A. brevipetiolata</i> , <i>A. cryptopotamica</i> , <i>A. douradiana</i> , <i>A. hermannii</i> , <i>A. major</i> , <i>A. martii</i> , <i>A. oteroi</i> , <i>A. paraguariensis</i> , <i>A. porphyrocalix</i> , <i>A. stenophylla</i> , <i>A. hatschbachii</i> , <i>A. gracilis</i>
3. <i>Extranervosae</i>	<i>A. setinervosa</i> , <i>A. macedoi</i> , <i>A. marginata</i> , <i>A. prostrata</i> , <i>A. lutescens</i> , <i>A. retusa</i> , <i>A. burchellii</i> , <i>A. pietrarellyi</i> , <i>A. villosulicarpa</i> , <i>A. submarginata</i>
4. <i>Triseminatae</i>	<i>A. triseminata</i>
5. <i>Heteranthae</i>	<i>A. giacomettii</i> , <i>A. sylvestris</i> , <i>A. pusilla</i> , <i>A. dardani</i> , <i>A. seridoënsis</i> , <i>A. interrupta</i>
6. <i>Caulorrhizae</i>	<i>A. pintoii</i> , <i>A. repens</i>
7. <i>Procumbentes</i>	<i>A. lignosa</i> , <i>A. kretschmeri</i> , <i>A. matiensis</i> , <i>A. appressipila</i> , <i>A. subcoriacea</i> , <i>A. pflugeae</i> , <i>A. chiquitana</i> , <i>A. rigonii</i> , <i>A. hassleri</i> , <i>A. vallsii</i>
8. <i>Rhizomatosae</i>	<i>A. burkartii</i> , <i>A. pseudovillosa</i> , <i>A. glabrata</i> , <i>A. nítida</i> .
9. <i>Arachis</i>	<i>A. decora</i> , <i>A. diogoi</i> , <i>A. glandulifera</i> , <i>A. gregoryi</i> , <i>A. helodes</i> , <i>A. hoehnei</i> , <i>A. kempff-Mercadoi</i> , <i>A. kuhlmannii</i> , <i>A. lenearifoli</i> , <i>A. magna</i> , <i>A. microsperma</i> , <i>A. palustris</i> , <i>A. praecox</i> , <i>A. simpsonii</i> , <i>A. stenosperma</i> , <i>A. valida</i> , <i>A. duranensis</i> , <i>A. monticola</i> , <i>A. villosa</i> , <i>A. hypogaea</i> , <i>A. batizocoi</i> , <i>A. benensis</i> , <i>A. cardenasii</i> , <i>A. cruziana</i> , <i>A. correntina</i> , <i>A. herzogii</i> , <i>A. ipaensis</i> , <i>A. krapovickasii</i> , <i>A. schininii</i> , <i>A. trinitensis</i> , <i>A. williamsii</i>

1.2.2 Espécies Cultivadas

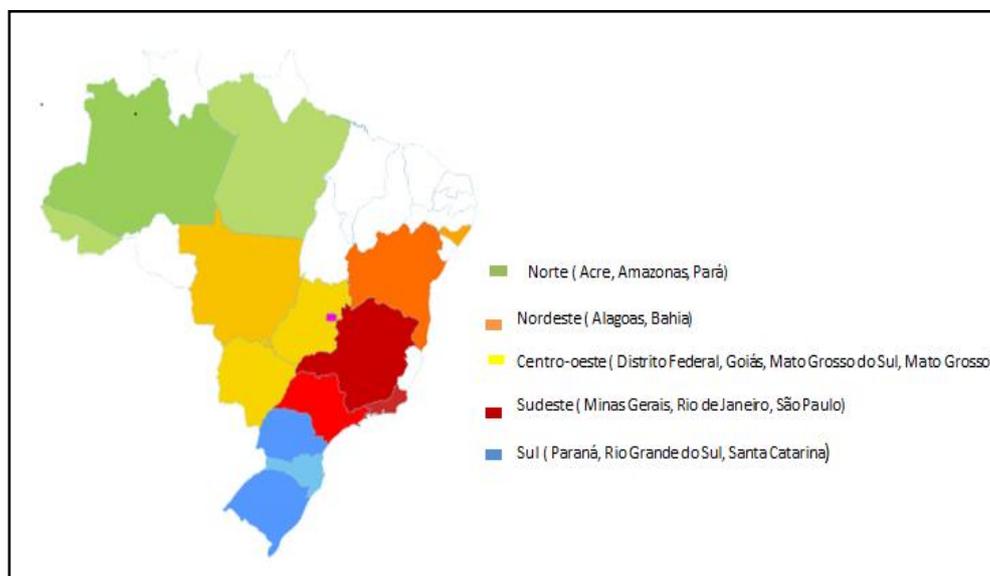
O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., pertencente à Seção *Arachis*, é uma das oleaginosas mais cultivadas no mundo (SILVA et al., 2010). Suas sementes podem ser consumidas *in natura*, torradas e na forma de doces ou pastas (FÁVERO, 2004; OZIAS-AKINS, ANDERSON & HOLBROOK, 1993). Possuem alto valor energético e nutricional, contendo 580 calorias em 100g e altos níveis de ácidos graxos insaturados no óleo. É ainda uma rica fonte de proteínas, vitamina E, vitaminas do complexo B, ácido fólico e minerais como cálcio, fósforo, potássio e zinco (SANTANA, 2013). Apesar de possuir grande importância no Brasil, o amendoim possui uma baixa produção e área cultivada relativamente pequena. Nos anos agrícolas de 2014/15, a área total cultivada ficou em 109,7 mil hectares, com 91,7 mil hectares cultivados em São Paulo, o maior produtor do país. A produção nacional alcançou 337,9 mil toneladas, correspondendo a 22,1 mil toneladas a mais do que a safra anterior. Assim, apenas 0,8% da produção mundial tem a participação do Brasil e 63% concentram-se em três países, China (43,37%), Índia (14,44%) e Estados Unidos (4,84%) (CONAB, 2015).

Além de *A. hypogaea*, outras duas espécies de *Arachis* foram domesticadas para utilização na alimentação. *Arachis villosulicarpa* Hoehne é cultivada por índios da tribo Nambiquara residentes no Parque Indígena do Xingu, na região Nordeste do Mato Grosso, considerada um caso isolado de domesticação (FREITAS, 2004). Suas sementes possuem altos teores de óleo (75%) e o conteúdo de triptofano supera toda variação encontrada no amendoim comum, mas não tem sido utilizada por produtores por causa da dificuldade de cultivo (VALLS, 2005). *Arachis stenosperma* Krapov. & W.C. Greg. é consumida por índios Guaranis, na costa Atlântica do Paraná (FREITAS; PEÑALOZA & VALLS, 2003), possuindo sementes com teores elevados de lipídios (GROSSO, NEPOTE & GRUZMÁN, 2000). Essa característica pode ser potencialmente transferida para o amendoim cultivado, visto que *A. stenosperma* é considerada uma fonte de genes para o melhoramento genético por sua estreita relação com *A. hypogaea* (GUIMARÃES et al., 2010).

Outros representantes do gênero também possuem valor agrícola. *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. e *A. glabrata* Benth. e *A. kretschmeri* Krapov. & W.C. Greg. são as espécies utilizadas para formação de pastagens, cobertura de pomares, prevenção de processos erosivos e paisagismo (SILVA, 2008). *Arachis pintoi* (Seção *Caulorrhizae*) é especialmente adequada para áreas de pastejo intenso e contínuo, apresentando elevada produção de matéria seca de boa qualidade (LUDWIG et al. 2010). Tanto *A. pintoi* como *A. glabrata* (Seção *Rhizomatosae*) têm sido utilizadas como fonte de proteínas para alimentação animal, como alternativa para diversificar a produção de forragem em sistemas pecuários tradicionais (CAVALCANTE, SHARMA & VALENTIM, 2001). A utilização dessas espécies como forrageiras vem conferindo vantagens ao produtor rural, devido ao alto valor proteico, à capacidade de absorção de nitrogênio, à redução dos efeitos negativos da atividade pecuária e à diminuição da necessidade de adubação química nitrogenada, reduzindo a poluição de lençóis freáticos causada pela lixiviação do excesso de nitrogênio aplicado ao solo. Além disso, desenvolvem-se sob sombreamento e formam densa camada de estolões que protegem o solo (LIMA et al., 2015; LUDWIG et al. 2010). Entretanto, a utilização de espécies de *Arachis* como novas possibilidades agronômicas não estão restritas ao uso forrageiro, estendendo-se ao uso ornamental e cobertura do solo, para controle de erosão e ervas daninhas (VEIGA et al. 2003).

1.2.3 *Arachis repens*

Arachis repens Handro, a espécie estudada neste trabalho, é uma planta herbácea perene popularmente chamada grama-amendoim. O primeiro acesso da espécie (GKP10538) foi coletado em 1941, em Jequitaiá em Minas Gerais (CAMPOS et al., 2015) e sua distribuição geográfica abrange todas as regiões do Brasil (Figura 2) (VALLS, 2015). *Arachis repens* produz poucas sementes, reproduzindo-se majoritariamente por meio de estolões (CARVALHO, PIZZARO & VALLS, 2009). Possui um belo efeito em jardins e canteiros (Figura 3 A), devido ao formato de suas folhas verde-escuras, e à produção de flores amarelas no verão (Figura 3 B).

Figura 2– Distribuição geografia de *Arachis repens*

Fonte: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB29478&action=prin>

A espécie também é utilizada como forrageira, desempenhando um papel importante na produção de alimentos, pois é capaz de suprir as necessidades nutricionais de animais herbívoros, especialmente os ruminantes, melhorando a qualidade da carne e do leite produzidos (VALENTIM, 1996). Entretanto, a expansão do uso do *A. repens* depende dos avanços no conhecimento da variabilidade genética, do seu potencial de sobreviver em diferentes ambientes, da sua capacidade em recuperar solos degradados e da sua utilização em sistemas pecuários (AZEVEDO et al., 2011).

Estudos biotecnológicos já foram realizados com diferentes materiais de *A. repens*, tanto *in vitro* como em condições naturais objetivando a micropropagação, avaliação fitoquímica e biológica (GARCIA, 2012; 2015) e a avaliação do efeito da qualidade de luz na morfogênese *in vitro* (SANTOS, 2015).

Figura 3 –*Arachis repens*.



Legenda: A) Canteiro utilizado em paisagismo urbano; B) Detalhe das folhas e flores.

Fonte: <http://www.minhasplantas.com.br/plantas/grama-amendoim/>

1.2.4 Produção de metabólitos secundários em *Arachis*

A produção de substâncias bioativas já foi descrita em diversas espécies de *Arachis* (LOPES et al., 2013), sendo as substâncias fenólicas a principal classe encontrada. Esses constituintes podem ser observados em todas as partes da planta e são produzidos em resposta a injúrias mecânicas ou danos provocados por insetos, patógenos, radiação ultravioleta, dentre outros. Derivados de fenilpropanoides, principalmente estilbenos e flavonoides, já foram detectados no gênero *Arachis* (LEE et al., 2008; LOPES et al., 2013).

Os flavonoides são metabólitos especiais da classe dos polifenóis que possuem estrutura adequada para o sequestro de radicais livres, sendo bons antioxidantes (SILVA et al., 2010). São amplamente distribuídos em partes aéreas, como folhas e flores e também encontrados em sementes, estando presentes em plantas saudáveis ou doentes. Entre os derivados de flavonoides encontrados em *Arachis*, foram identificados a quercetina, a medicarpina e o cresoeriol (LOPES et al., 2011).

Os fitoesteróis, como campesterol, estigmasterol, campestanol e Δ^5 -avenasterol podem ser encontrados em sementes do amendoim e derivados, como manteiga e óleo. O beta-sitosterol, por exemplo, é substância abundante no óleo de *A. hypogaea* (SHIN et

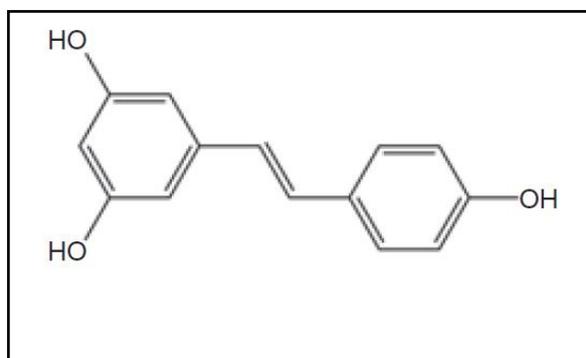
al.,2010). Esteróides com composição similar foram descritos em *A. sylvestris*, *A. pintoi*, *A. villosa*, *A. stenosperma*, *A. diogoi*, *A. valida* e *A. matiensis* (GROSSO et al., 1997).

Tanto os esteróides quanto os triterpenos são sintetizados por uma mesma rota metabólica. Os triterpenos mais encontrados no gênero são cicloartenol, cicloartanol, ciclobranol, 24-metilenocicloartenol, β -amirin e lupeol (BANSAL, SATIJA; AHUJA, 1993). Outros constituintes descritos são o ácido metilbutanóico, limoneno, compostos de enxofre, entre outros.

Os estilbenos são metabólitos derivados da via dos fenilpropanoides e sintetizados por um grande grupo de espécies vegetais. Esta classe está associada a resposta a patógenos, como a contaminação fúngica que afeta o amendoim (CHONG, POUTARAUD & HUGUENEY, 2009). Entre os derivados de estilbenos em *Arachis* encontram-se o resveratrol, arachidina-1, arachidina-2, arachidina-3, piacetanol, pteroesstilbeno (CASSIDY, HANLEY & RAVENTOS, 2000).

O resveratrol (C₁₄H₁₂O₃) (Figura 4) é uma substância fenólica da classe dos estilbenos, sendo a substância mais estudada no gênero *Arachis* (SOBOLEV, 2008). Já foi detectado em raízes de diversas variedades de *A. hypogaea* (KIM, LEE & PARK, 2008), em hipocótilos, em resposta a infecção fúngica (INGHAM, 1976), em cotilédones, em resposta a injúrias mecânicas (ARORA & STRANGE, 1991; SOBOLEV, 2008) e em folhas expostas à radiação ultravioleta (CHUNG et al., 2003).

Figura 4– Fórmula estrutural do resveratrol.

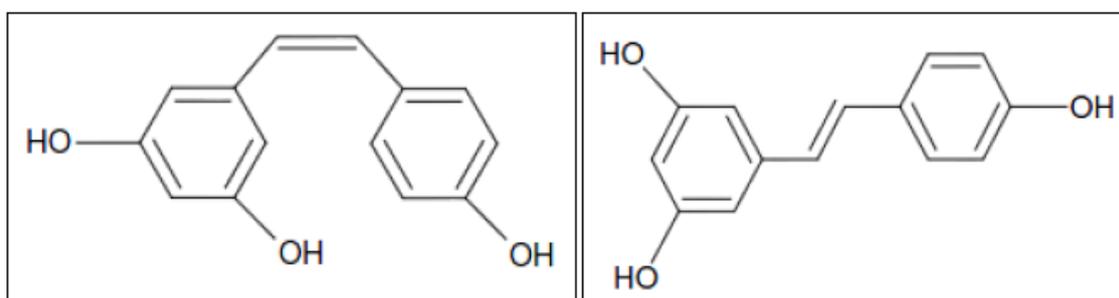


Fonte: AHUJA, KISSEN & BONES, 2012.

O resveratrol é considerado como ponto de partida para síntese de outros estilbenoides com atividade biológica nas espécies de *Arachis* (AHUJA, KISSEN & BONES, 2012).

Pode ser encontrado sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 5). O *trans*-resveratrol é convertido para a forma *cis*, considerada a mais estável, em presença de luz visível (SAUTTER et al., 2005). O teor de resveratrol pode ser influenciado pelo genótipo, estação do ano, condições climáticas e maturidade da planta. Também pode variar entre os diferentes órgãos do vegetal, sendo encontrado em maior quantidade em sementes e embriões (KING, BOMSER & MIN, 2006).

Figura 5—Isômeros do resveratrol.



Legenda: Forma *cis* (esquerda) e *trans* (direita).Fonte: KING, BOMSER & MIN, 2006.

O resveratrol é um potente antioxidante e antimutagênico, com efeito preventivo e terapêutico contra câncer (CHEN, WU & CHIOU, 2002), e arteriosclerose, reduzindo o colesterol e coágulos, além de possuir ação neuroprotetora (CHUNG et al., 2003; VUONG, FRANCO & ZHANG, 2014; LUCAS-ABELLÁN et al., 2007; CHAO et al., 2005). Possui ainda propriedade antifúngica e vários outros benefícios à saúde humana, como a inibição da peroxidação lipídica e efeito vasodilatador (PINTO, GARCÍA-BARRADO & MACÍAS, 2003; AHUJA, KISSEN & BONÉS, 2012). Como está associado a uma diversidade de benefícios à saúde humana, diversos estudos têm sido realizados com plantas que produzem estilbenos, como o amendoim cultivado e outras espécies do gênero, em especial aquelas que possuem alta resistência a pragas e doenças (SOBOLEV et al., 2011).

1.2.5 Cultura de tecidos em *Arachis*

Sistemas de cultura de tecidos vem sendo estabelecidos para espécies cultivadas e silvestres do gênero *Arachis*, especialmente com os objetivos de transformação genética e conservação de germoplasma para uso em programas de melhoramento genético. A obtenção de plantas a partir da cultura de meristemas preexistentes foi obtida a partir de ápices caulinares, segmentos nodais ou eixos embrionários de espécies das Seções *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Triseminatae*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Arachis eExtranervosae* (GAGLIARDI et al, 2000, 2002b; REY & MROGINSKI, 2003; PACHECO et al., 2007a).

A regeneração através de organogênese foi obtida a partir de anteras em *A. villosa* (BAJAJ et al., 1981), *A. lignosa* (MROGINSKI & FERNANDEZ, 1980) e *A. major* (PRADO, SECCHI & MROGINSKI, 1988). Explantes foliares foram utilizados em *A. correntina*, *A. glabrata*, *A. stenosperma* (MROGINSKI et al., 2004; VIDOZ et al., 2006; PACHECO et al., 2008) e em *A. villosa* (FONTANA, MROGINSKI & REY, 2009). A organogênese foi estudada a partir de estames e protoplastos em *A. paraguaniensis* (STILL et al., 1987; LI et al., 1993; ZHIJIAN et al., 1993), nós cotiledonares em *A. diogoi*, *A. stenosperma*, *A. duranensis*, *A. cardenasii* e *A. correntina* (SRINAVASAN, KUMAR & KIRTI, 2010) e cotilédones e folíolos embrionários de espécies das Seções *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Triseminatae*, *Erectoides*, *Procumbentes*, *Arachis eExtranervosae* (RANI & REDDY, 1996; GAGLIARDI et al., 2000; PACHECO et al., 2007a).

A embriogênese somática foi obtida em resposta a picloram (PIC) e ácido naftaleno acético (ANA), isolados ou em combinação com benzilaminopurina (BAP) em *A. correntina* (VIDOZ et al., 2006), *A. glabrata* (VIDOZ et al., 2004) e *A. pintoii* (REY et al., 2000; REY & MROGINSKI, 2006). Além disso, sistemas embriogênicos foram estabelecidos a partir em eixos e folíolos embrionários de *A. porphyrocalix*, *A. archeri* e *A. appressipila*, em resposta a BAP utilizado isoladamente (PACHECO et al., 2007b), assim como a partir de eixos embrionários de *A. paraguariensis* cultivados em meio MS suplementado com ANA e BAP, isolados ou em combinação (SELLARS, SOUTHWARD, & PHILLIPS, 1990).

Trabalhos de cultura de tecidos para *A. repens* foram realizados em número relativamente limitado. A obtenção de plantas através de organogênese foi alcançada a partir de folíolos maduros, cultivados em meio com baixas concentrações de ANA (DUNBAR & PITTMAN, 1992). O estabelecimento de culturas de calos a partir de segmentos nodais e internodais, visando à produção de metabólitos secundários, foi descrito em resposta a TDZ (GARCIA, 2012). No entanto, o interesse por essa espécie tem aumentado devido ao seu potencial forrageiro e à grande variabilidade genética (GIMENES et al., 2000; VEIGA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2011), estimulando a realização de estudos visando à conservação e à agregação de valor às culturas.

Sistemas sustentáveis para produção de metabólitos secundários, como cultura de calos e de células em suspensão, já foram estabelecidos para o amendoim cultivado (Quadro 2). Dessa forma, tendo em vista os resultados já alcançados anteriormente no Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ com o estabelecimento *in vitro* de *A. repens* e a determinação do potencial farmacológico do amendoim cultivado, este trabalho visa ao estabelecimento de sistemas de cultura de calos, além da caracterização do perfil fitoquímico e da avaliação do potencial antioxidante de materiais de *A. repens* obtidos *in vitro*.

Quadro 2– Produção *in vitro* de metabólitos secundários em espécies de *Arachis*.

Espécie	Sistema de cultura	Substância detectada	Referência
<i>A. hypogaea</i>	Cultura de células	Resveratrol	ROLFS <i>et al.</i> , 1981
	Calogênese	Estilbenos	FRITZEMEIER <i>et al.</i> , 1982
	Células em suspensão	Estilbenos	SCHÖPPNER & KINDL, 1984
	Células em suspensão	Estilbenos	ROLFS <i>et al.</i> , 1987
	Células em suspensão	Resveratrol	LANZ, SCHRODER & SCHRODER, 1990
	Células em suspensão	Resveratrol e Piceatanol	KU <i>et al.</i> , 2005
	Cultura de raiz	Resveratrol	MEDINA-BOLIVAR <i>et al.</i> , 2007
	Cultura de raiz	Resveratrol	KIM & PARK, 2007
	Cultura de raiz	Resveratrol	KIM, LEE & PARK, 2008
	Cultura de raiz	Resveratrol	MEDINA-BOLIVAR <i>et al.</i> , 2008
	Cultura de raiz	Resveratrol, Arachidina-1 e Arachidina -3	CONDORI <i>et al.</i> , 2010
	Calogênese	Trans-resveratrol e Trans-piceatannol	YANG <i>et al.</i> , 2010a
	Cultura de raiz	Estilbenos	MEDINA-BOLIVAR <i>et al.</i> , 2010 a
	Cultura de raiz	Resveratrol, Arachidina-1 e Arachidina -3	ABBOTT <i>et al.</i> , 2010
	Cultura de raiz	Resveratrol	MEDINA-BOLIVAR <i>et al.</i> , 2010b
	Calogênese	Resveratrol e Pineatanol	YANG <i>et al.</i> , 2010b
<i>A. villosulicarpa</i>	Calogênese	Resveratrol	ARAÚJO, 2011
	Cultura de raiz	Resveratrol	ATWILL, NOPO-OLAZABAL & MEDINA-BOLIVAR, 2012
	Cultura de raiz	Resveratrol	YAO <i>et al.</i> , 2012
<i>A. repens</i>	Calogênese	Resveratrol	GARCIA, 2012
<i>A. hypogaea</i>	Cultura de raiz	Estilbenos	OGUTU, NOPO-OLAZABAL & MEDINA-BOLIVAR, 2013
	Cultura de raiz	Resveratrol	TOLLETT, NOPO-OLAZABAL & MEDINA-BOLIVAR, 2014
	Cultura de raiz	Resveratrol, Piceatanol, Arachidin-1 e Arachidin-3	YANG <i>et al.</i> , 2015
	Cultura de raiz	trans-resveratrol	HALDER & JHA, 2015
<i>A. pintoi</i>	Cultura de raiz	trans-resveratrol	SOUSA, 2015
<i>A. hypogaea</i>	Cultura de raiz	Estilbenos	YANG <i>et al.</i> , 2016
	Calogênese	Estilbenos	SANTOS, 2016

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estabelecer sistemas de culturas de calos, caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial antioxidante de materiais obtidos *in vitro* de *A. repens*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas de indução de calos a partir de segmentos nodais e internodais de plantas obtidas *in vitro*, avaliando o efeito da qualidade de luz;
- Analisar histologicamente os diferentes tipos de calos obtidos;
- Caracterizar o perfil fitoquímico de extratos dos materiais obtidos *in vitro*, por meio de análises cromatográficas;
- Determinar o conteúdo fenólico de extratos obtidos a partir dos diferentes materiais vegetais;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir dos diferentes materiais vegetais.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

Mudas de *A. repens* foram obtidas comercialmente no Centro de Abastecimento do Estado da Guanabara (CADEG), sendo uma amostra depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ 12.504). Para o estabelecimento das culturas *in vivo*, as mudas foram transplantadas para vasos contendo substrato Plantmax® e mantidas notelado do NBV/UERJ.

3.1.1 Meios e condições de cultura

Para a cultura *in vitro* foi utilizado o meio basal MS contendo sacarose a 3% e solidificado com ágar a 0,7%. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 e os reguladores de crescimento foram acrescentados antes da esterilização em autoclave (15 min a 121°C e 1,0 atm), em diferentes concentrações. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h, com intensidade luminosa média de $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes (do tipo luz branca fria) ou utilizando LEDs nas cores vermelha, azul, branca e mista (vermelha + azul), com intensidade luminosa de $47 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $43 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente.

A intensidade luminosa foi mensurada utilizando o Fotômetro Li. 250 A Light Meter.

3.3 Cultura de Tecidos Vegetais

3.3.1 Estabelecimento de plantas *in vitro*

Plantas mantidas em telado foram submetidas a pré-tratamento com pulverização do inseticida ICON GARDEN® a 0,5% durante três dias consecutivos. Posteriormente, segmentos caulinares de cinco centímetros, contendo três nós, foram excisados e lavados com escova, detergente neutro e água corrente. Em seguida, os explantes foram

imersos por 20 minutos em solução do fungicida AMISTAR a 0,1% contendo 100 µL de tween 80, e transferidos para solução de cloreto de mercúrio (HgCl₂) a 0,1%, sobagitação, por seis minutos (SANTOS, 2015).

Após a descontaminação, os explantes foram lavados três vezes com água deionizada estéril em câmara de fluxo laminar e inoculados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento (MS0), contendo Agrimicina® a 300 mg/L, e incubados a 30±2°C em câmara de crescimento sob luz fluorescente branca ou LEDs vermelho, azul, branco ou misto (vermelho + azul), por 30 dias. Foram utilizados 40 segmentos caulinares por condição de incubação e os experimentos foram repetidos três vezes. O material foi inoculado verticalmente em tubos de ensaio (20 cm altura x 2,4 cm largura) com tampa de polipropileno transparente, contendo 14 mL de meio de cultura. Após o período de 30 dias, as plantas foram avaliadas quanto à altura, quantidade e tamanho de raízes, número de nós e número de folhas.

3.3.2 Indução de calogênese

Segmentos nodais e internodais foram excisados assepticamente de plantas *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM (GARCIA, 2012) e incubados sob luz fluorescente branca ou LEDs vermelho, azul, branco ou misto, a 30±2°C, com fotoperíodo de 16h. Foram utilizados 15 explantes em cada condição, com duas repetições cada. O material foi inoculado horizontalmente em frascos de cultura (11,5 cm altura x 5,5 cm largura) com tampa de polipropileno transparente, contendo 30 mL de meio de cultura. A percentagem de calogênese avaliada após 30 dias de cultura. Os calos obtidos foram submetidos a subculturas mensais, sendo transferidos para meio fresco com mesma composição.

O acúmulo de biomassa de calos obtidos a partir dos dois tipos de explante foi determinado pela quantificação dos pesos de matéria fresca (PF) e seca (PS), após 30 dias de cultura. A massa seca foi obtida após secagem a 48±2°C em estufa Tecnal® TE-393/1, até atingir peso constante.

3.4 Análise histológica

Estudos anatômicos foram realizados em amostras de calos contendo estruturas que se assemelhavam morfológicamente a gemas ou embriões, provenientes de explantes de segmentos noais ou internodais excisados de plantas *in vitro* cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 μ M e incubados sob diferentes qualidades de luz, a 30 \pm 2°C.

O material foi fixado em uma solução contendo glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 50 μ M (pH 7,2), e armazenado a 4°C. Em seguida, as peças foram submetidas à desidratação em série etílica ascendente, infiltradas e incluídas em parafina, segundo os métodos da microtécnica vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1958). Os cortes com espessura de 12 μ m foram realizados em micrótomo rotativo. Após desparafinização e hidratação, foram submetidos à coloração pela combinação de fucsina básica e azul de astra (KRAUS & ARDUIN, 1997). As lâminas resultantes foram montadas em Enterllan e analisadas sob microscópio Olympus BH, sendo as fotomicrografias realizadas com fotomicroscópio Olympus BX51 com o software Image Pro Express.

3.5 Análise Fitoquímica

3.5.1 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos, foram utilizados caules e folhas de plantas mantidas *in vivo*, além de calos oriundos de segmentos nodais e internodais inoculados em meio suplementado com TDZ a 13,6 μ M e mantidos a 30 \pm 2°C sob diferentes fontes de luz, por 90 dias. O material foi seco em estufa a 48°C por três dias, sendo em seguida triturado com auxílio de almofariz e pistilo. As amostras foram submetidas à maceração em metanol (Vetec®) a 80 % (v/v), utilizando 50 mL/g de material seco por diferentes períodos (30, 60 e 120 minutos). Os extratos foram filtrados em papel filtro e colocados em frascos âmbar, filtrados, evaporados sob pressão reduzida (Evaporador Rotativo Marconi – M120) a 40 °C para retirada do solvente, e armazenados a - 20 °C.

3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de CCD foi realizada segundo Araújo (2011), com modificações. Os extratos de *A. repens* foram ressuspensos em metanol (30 mg/mL) e aplicados em placa de cromatografia de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV_{254nm} Alugram® Xtra Sil G/UV254 (Marcherey-Nagel), juntamente com o padrão de resveratrol (1mg/mL) adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co®. (Milwaukee, WI, USA), com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, em temperatura ambiente, e a fase móvel foi constituída de butanol:etanol:água destilada:ácido acético glacial (60:10:20:0,5 v/v). Em seguida, a placa foi aquecida por 2 minutos a 105° e imediatamente revelada com NP:PEG (Natural Products – Polietilenoglicol). A visualização foi realizada em câmara de UV_{365nm}. O fator de retenção (R_F) foi calculado pela razão entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela fase móvel.

3.5.3 Determinação quantitativa do *trans*-resveratrol por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de ultravioleta em rede de diodos (DAD-UV)

A quantificação do *trans*-resveratrol nas amostras foi realizada em CLAE-DAD-UV, em um cromatógrafo Shimadzu® Nexera XR, equipado com controlador CBM20A, degaseificador DGU20A, bomba binária LC20AD, forno CTO20A, injetor automático SILA20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS SPDM20A. A área do sinal foi integrada automaticamente pelo programa Shimadzu LabSolutions.

Os melhores parâmetros analíticos para dosagem *trans*-resveratrol foram alcançados com coluna analítica Supelco Ascentis® Phenyl (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm). A fase móvel foi composta por água ultrapura (MiliQ) acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) (A), acetonitrila grau espectroscópio (Tedia®, Brasil) (B) e metanol grau espectroscópio (Tedia®, Brasil) (C), em sistema gradiente: inicial 90% de A, 2% de B e

8% de C; 0 a 3 minutos de 80% de A, 12% de B e 8% de C; 3 a 9 minutos de 5% de A, 95% de B e 0% de C; 9 a 11 minutos 90% de A, 2% de B e 8% de C. O fluxo de fase móvel foi ajustado em 1mL/min e a temperatura do forno em 50°C. O monitoramento foi feito em 304 nm. Esta metodologia foi desenvolvida e validada pelo Dr. Davyson Moreira, no Laboratório de Toxicologia Ambiental da ENSP/FIOCRUZ (dados não publicados).

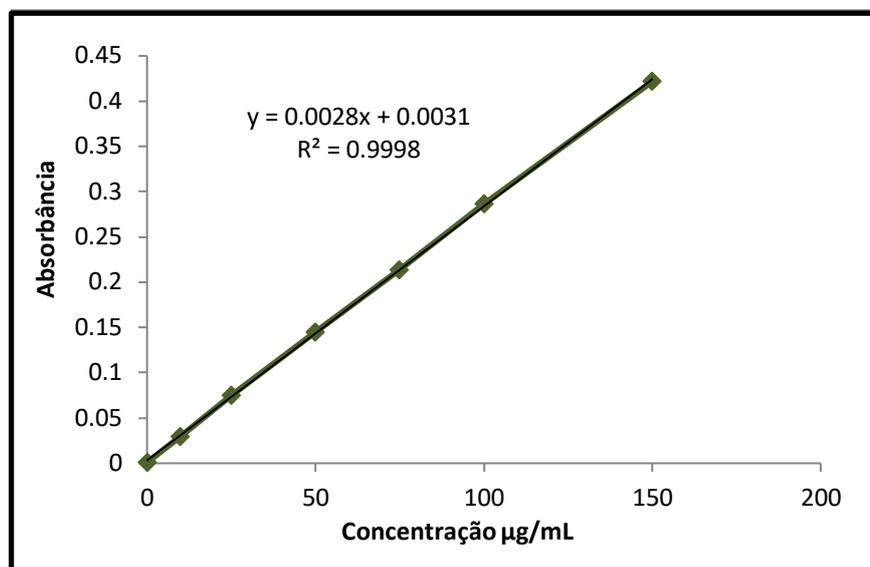
As amostras (10 mg) foram solubilizadas em 1 mL de metanol grau cromatográfico, submetidas ao ultrassom por 15 minutos para completa solubilização e, em seguida, filtradas em filtro 0,45 µm. O volume de injeção foi de 20 µL.

3.6 Determinação do conteúdo fenólico

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada por quantificação espectrofotométrica, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, com modificações (HOLLAND *et al.*, 2011). A metodologia de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngico e fosfomolibdico a óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, que possuem coloração azulada, sendo possível a quantificação pela medida da absorvância da solução em 765nm (SINGLETON, ORTHOFER & LAMUELA-RAVENTOS, 1999; FOLIN & DENIS, 1912). Extratos das diferentes amostras (90 µL) a 0,5 mg/mL foram misturados a uma solução do reagente Folin-Ciocalteu (180 µL) a 10% em água destilada. Após 5 min, foram adicionados 730 µL de uma solução de Na₂CO₃ (2%) e a reação foi incubada por 2 h no escuro, seguindo-se a leitura da absorvâncias em espectrofotômetro a 765nm.

O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão de ácido gálico (Figura 6), e expresso em mg de EAG (Equivalência do Ácido Gálico) por g de extrato.

Figura 6–Curva padrão do ácido gálico.



3.7 Avaliação da atividade antioxidante

3.7.1 Ensaio DPPH

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada utilizando-se o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), no qual é determinada a capacidade do extrato de sequestrar o radical livre DPPH, reduzindo-o a hidrazina, com base no método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998).

Os extratos foram ressuspensos em metanol 100% e diluídos em diferentes concentrações (1 - 30 mg/mL). Amostras de 25 µL foram incubadas com 975 µL de solução metanólica do radical DPPH (Sigma-Aldrich®, Milwaukee, Wisconsin, EUA) na concentração de 0,6 mM por 1 hora no escuro, em triplicata. Em seguida, as leituras de absorbância foram efetuadas a 515 nm, em espectrofotômetro UV-Vis BioMate 3S

(Thermo Scientific). A porcentagem de captura do radical foi determinada pela equação abaixo:

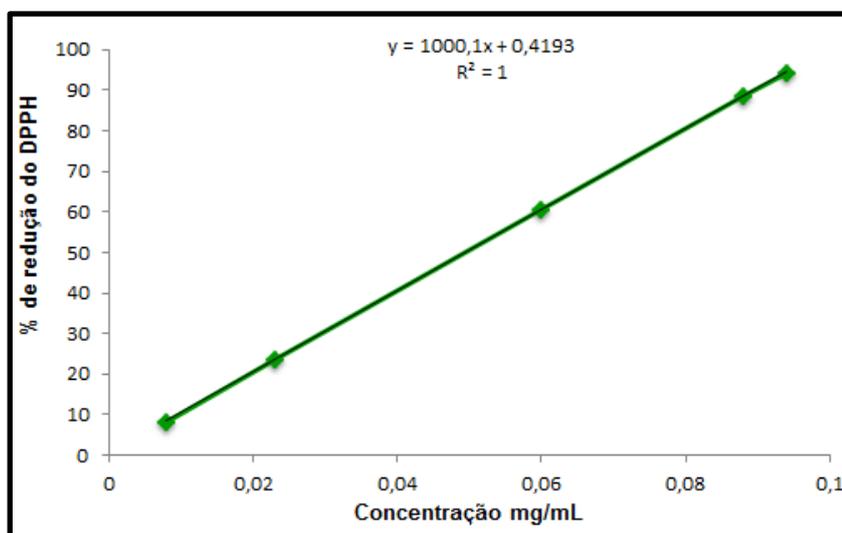
$$\% \text{ DPPH sequestrado} = \left(\frac{Ac - Aa}{Ac} \right) \times 100$$

Onde: Ac = absorvância do controle negativo

Aa = absorvância da amostra.

Os valores de CE₅₀(concentração de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH (foram calculados a partir de curva analítica, obtida por regressão linear. Como controle positivo, foi determinada a curva padrão da quercetina e calculado o seu valor de CE₅₀ (Figura 7).

Figura 7–Curva padrão de atividade antioxidante da quercetina avaliada pelo método de captura do radical DPPH.



3.8 Análise estatística

A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação de Turkey-kramer, com auxílio do programa *Graphpad InStat*. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Cultura de tecidos

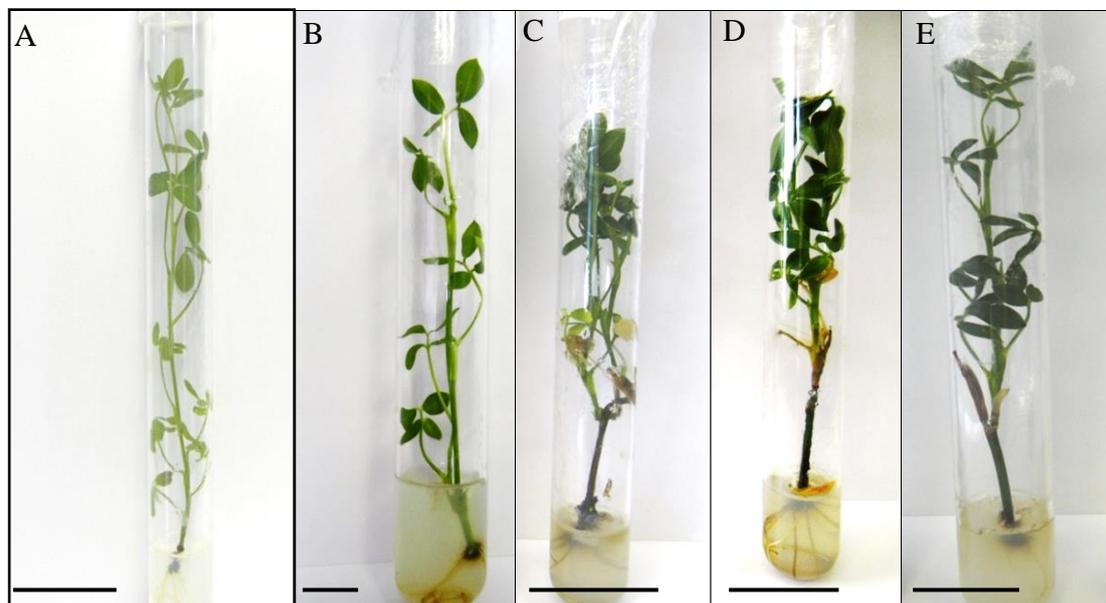
4.1.1 Estabelecimento de plantas *in vitro*

A eficiência de descontaminação obtida com o protocolo utilizado foi de 96%. O desenvolvimento *in vitro* de plantas completas a partir dos segmentos caulinares inoculados em meio MS0 e mantidos sob luz fluorescente branca a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ foi observado após 30 dias de cultura (Figura 8 A).

Após o estabelecimento do protocolo de descontaminação, foi avaliado o efeito da qualidade de luz (LEDs vermelho, azul, branco ou misto - azul+vermelho) sobre o desenvolvimento das plantas *in vitro*. Os segmentos caulinares incubados sob LED vermelho exibiram plantas com maior altura ($11,8\pm 0,6$) e com maior número de nós ($4,95\pm 0,3$ nós/explante) em relação às demais condições de iluminação (Tabela 1). Além disso, os segmentos mantidos sob LED vermelho apresentaram um desenvolvimento mais rápido, em torno de 15 dias, enquanto que nas culturas mantidas sob os outros LEDs, assim como sob luz fluorescente branca, as plantas só atingiram uma altura equivalente após 30 dias de cultura (Tabela 1, Figura 8).

Segmentos caulinares incubados sob os LEDs azul ou misto apresentaram maior número de folhas ($12,6\pm 0,3$ e $10\pm 0,6$, respectivamente). O maior número de raízes foi observado nas plantas oriundas de segmentos mantidos sob LED vermelho ($1,85\pm 0,5$ raízes/por explante) ou LED azul ($1,8\pm 0,33$). Plantas com raízes mais longas foram observadas sob os LEDs azul e vermelho ($4,33\pm 0,75$ e $3,6\pm 0,86$, respectivamente), em relação aos outros LEDs testados (Tabela 1).

Figura 8—Plantas de *Arachis repens* obtidas *in vitro* a partir de segmentos caulinares cultivados em meio MS0 e mantidos a $30\pm 2^\circ\text{C}$ e diferentes qualidades de luz.



Legenda: A- Luz fluorescente branca; B- Led vermelho; C - LED branco; D - LED azul; E - LED misto (vermelho+azul). Barra= 1cm.

Tabela 1—Desenvolvimento *in vitro* de segmentos caulinares de *Arachis repens* cultivados em meio MS0 e incubados sob diferentes tipos de luz a $30\pm 2^\circ\text{C}$, por 30 dias.

Tipo de luz	Parâmetros avaliados				
	Altura	Número de folhas	Número de nós	Raízes	Tamanho das raízes
LF	$7,5\pm 0,5^{bc}$	$8,05\pm 1,09^b$	$3,85\pm 0,4^b$	$0,6\pm 0,2^b$	$0,77\pm 0,3^c$
LeV	$11,8\pm 0,6^a$	$8,4\pm 0,5^b$	$4,95\pm 0,3^a$	$1,85\pm 0,5^a$	$3,6\pm 0,86^{ab}$
LeA	$8,08\pm 0,2^{bc}$	$12,6\pm 0,3^a$	$4,20\pm 0,2^{ab}$	$1,80\pm 0,33^a$	$4,33\pm 0,75^a$
LeM	$7,2\pm 0,3^b$	$10,0\pm 0,6^{ab}$	$3,75\pm 0,2^b$	$0,9\pm 0,32^{ab}$	$1,14\pm 0,60^c$
LeB	$4,9\pm 0,7^d$	$5,8\pm 1,1^c$	$2,30\pm 0,42^c$	$0,3\pm 0,20^b$	$0,3\pm 0,20^c$

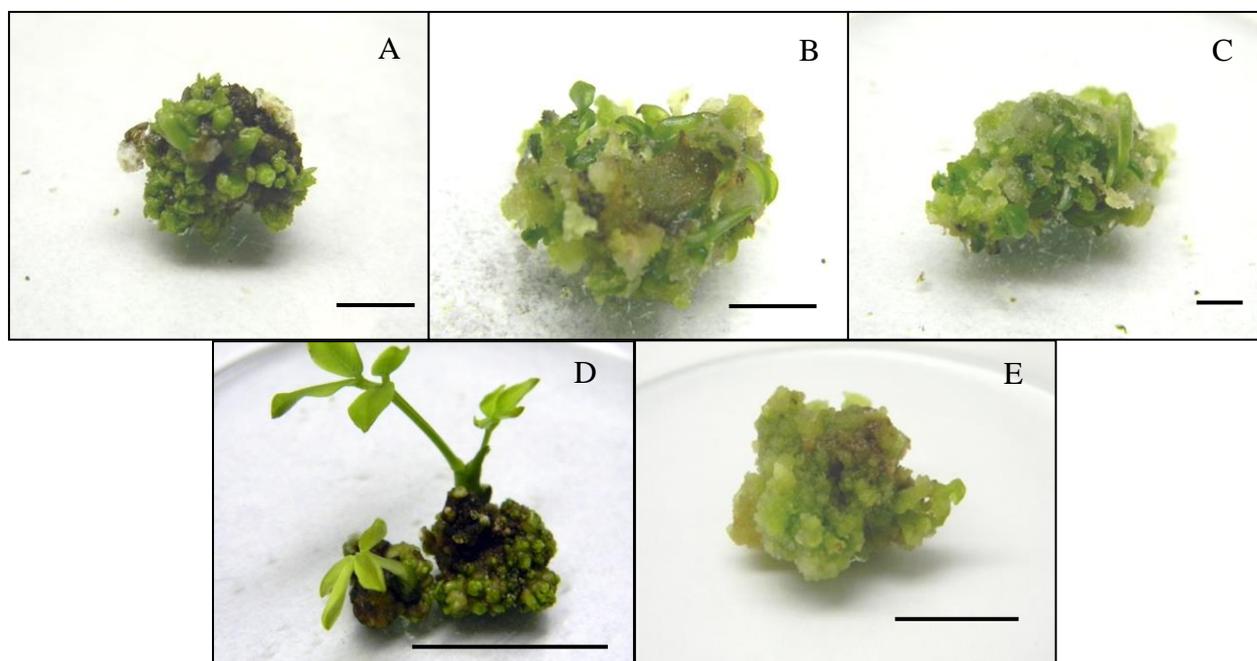
Legenda: LF- Luz fluorescente branca; LeV- Led vermelho; LeA- Led azul; LeM- Led Misto (vermelho + azul); LeB- Led branco. Os dados representam média \pm desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.1.2 Indução de calogênese a partir de segmentos caulinares de plantas *in vitro*

Segmentos nodais e internodais cultivados sob luz fluorescente branca apresentaram formação de calos compactos ou friáveis, em diferentes frequências (Tabela 2, Figura 9). A formação de calos mistos (45%), com regiões compactas e friáveis, só foi observada a partir de segmentos internodais (Tabela 2, Figura 9).

Quando incubados na presença de LEDs, os maiores percentuais de indução de calos compactos foram observados a partir de segmentos internodais cultivados sob os LEDs branco (76,6%), misto (63,3%) ou vermelho (63,3%). O maior percentual de calos friáveis (28,3%) ocorreu sob LED vermelho, enquanto que a maior taxa de produção de calos mistos foi observada sob LED azul (16,6%)(Tabela 2, Figura 10).

Figura 9–Formação de calos a partir de segmentos nodais e internodais de *Arachis repens* cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 μ M, após 30 dias de cultura sob lâmpadas fluorescentes brancas, a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$.

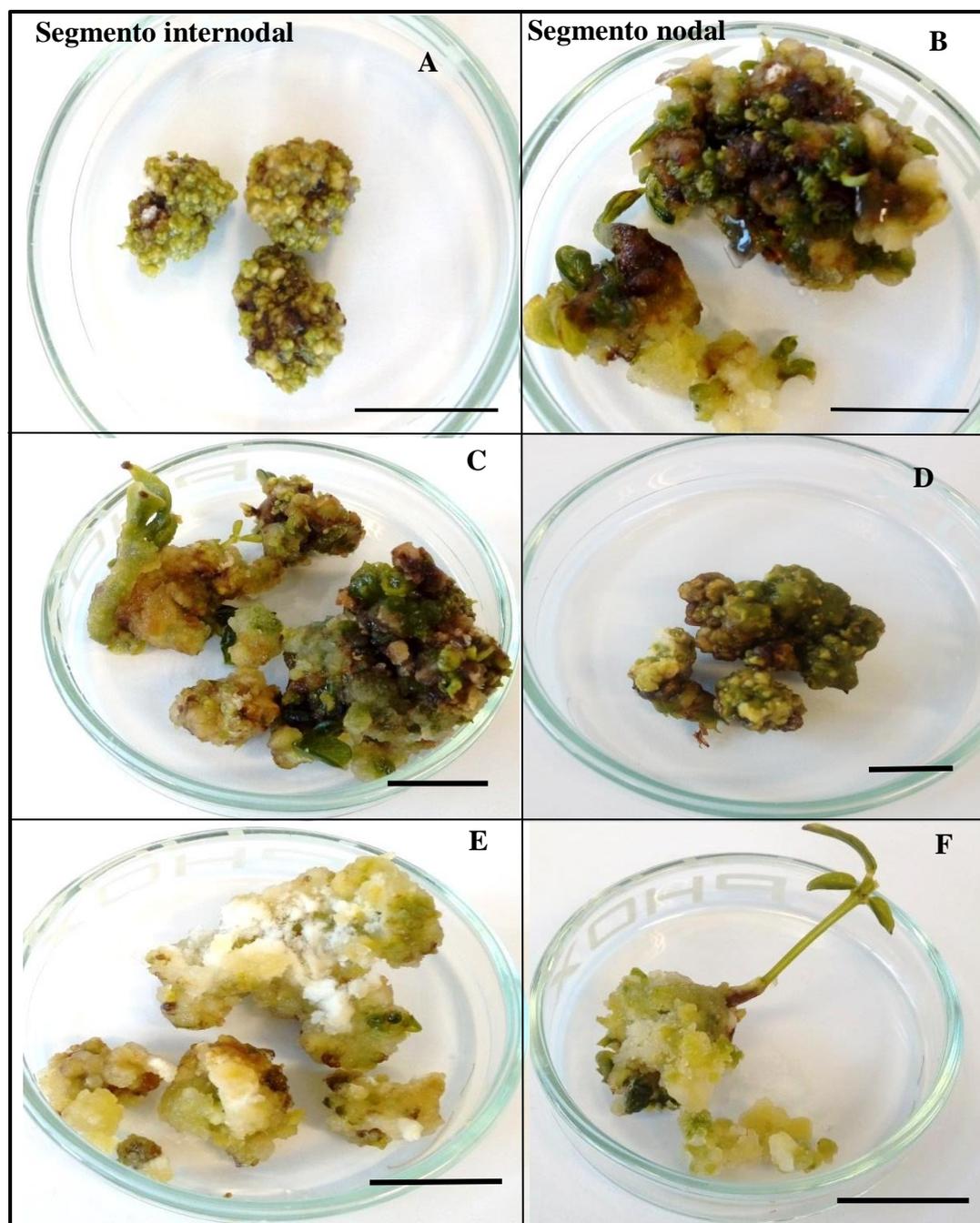


Legenda: Desenvolvimento de calo compacto (A), misto (B) e friável (C) a partir de segmentos internodais e desenvolvimento de calo compacto (D) e friável (E) a partir de segmentos nodais. Barra = 1cm.

Tabela 2–Calogênese a partir de segmentos nodais e internodais excisados de plantas *in vitro* de *Arachis repense* cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 µM, após 30 dias de cultura na presença de diferentes qualidades de luz, a 30±2 °C.

Tipo de calo	Calogênese (%)									
	LED vermelho		LED branco		LED azul		LED misto		Luz fluorescente branca	
	Segmento nodal	Segmento internodal	Segmento nodal	Segmento internodal						
Friável	28,3	10	14,9	3,3	8,3	10	15,8	16,6	20	25
Compacto	21,65	63,3	22,4	76,6	47,4	60	53,3	63,3	65	25
Misto	1,65	3,3	1,65	6,6	2,4	16,6	4,15	10	-	45

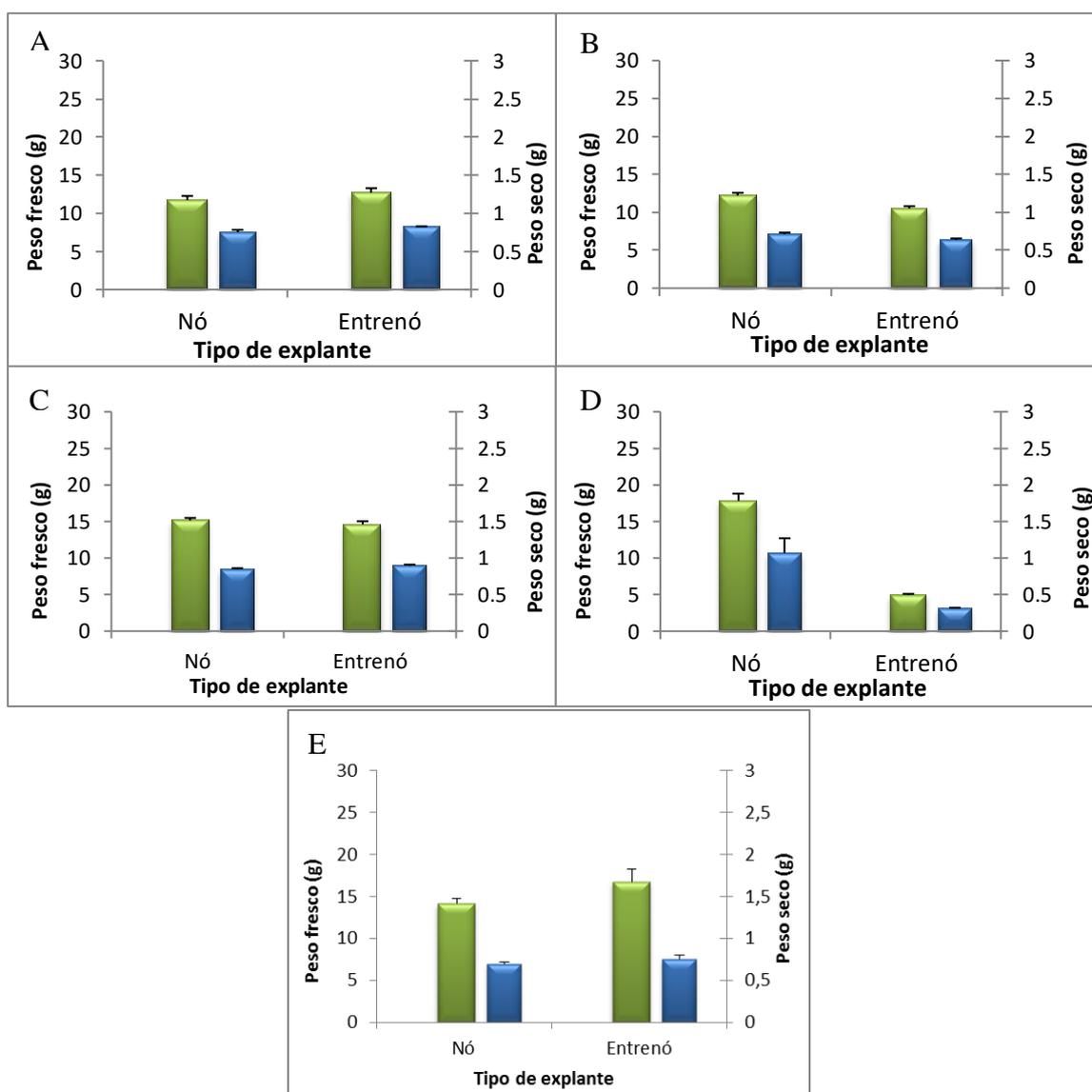
Figura 10–Morfogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais e internodais de *Arachis repens* cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 μ M por 30 dias sob diferentes fontes de iluminação LED, a 30 \pm 2°C.



Legenda:Desenvolvimento de calos a partir de segmentosinternodais e nodais e incubados sob diferentes qualidades de luz. A e B - LED branco;C e D –LEDmisto; E- LED azul e F- LED vermelho. Barra = 1cm.

A produção de biomassa dos calos friáveis formados a partir de segmentos caulinares mantidos sob as diferentes qualidades de luz por 60 dias não apresentou variações significativas (Figura 11), exceto pelo material produzido a partir de segmento internodal mantido sob LED vermelho, que teve menor produção de biomassa (Figura 11 D).

Figura 11–Acúmulo de biomassa (g) de calos friáveis derivados de segmentos nodais e internodais de *Arachis repens* cultivados em meio MS suplementado com TDZ a 13,6 μ M e mantidos sob diferentes qualidades de luz.

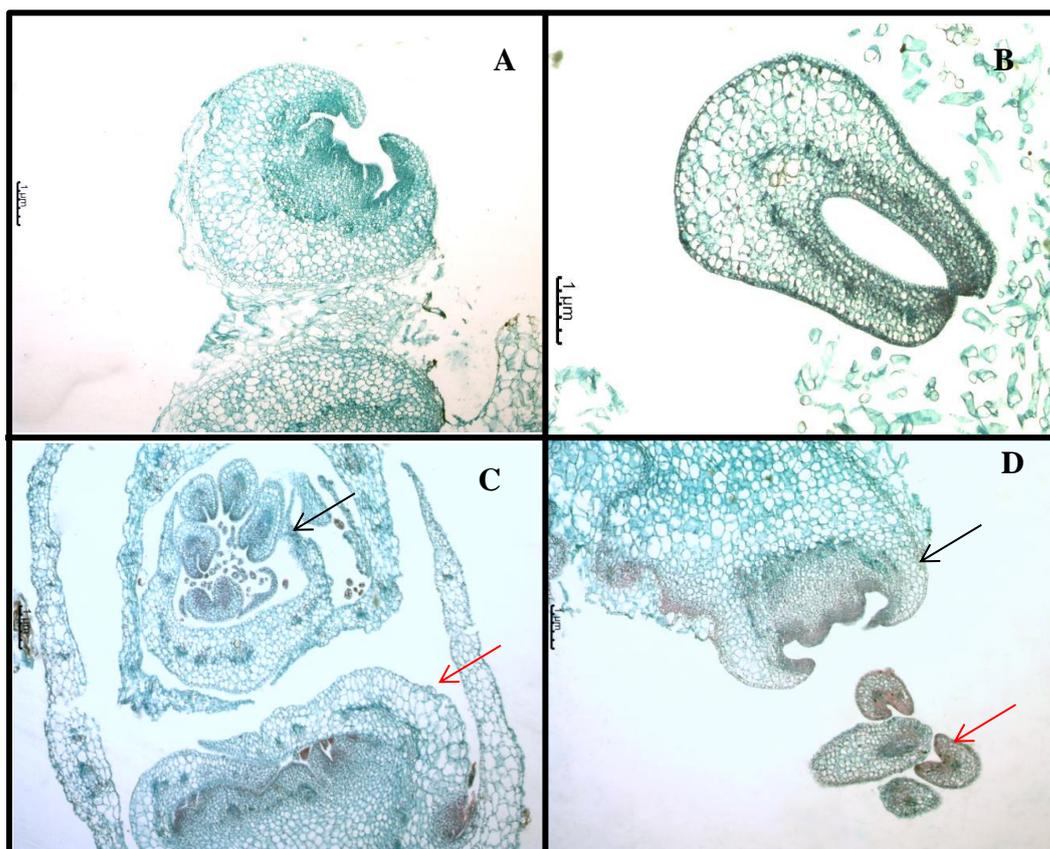


Legenda: Calos mantidos sob LEDs azul (A), branco (B), misto (C), vermelho (D) ou luz fluorescente branca (E). Peso Fresco ■ Peso Seco ■

4.1.3 Caracterização histológica dos calos

A análise histológica realizada nos calos obtidos a partir de segmentos nodais e internodais excisados de plantas *in vitro* após 30 dias de cultura mostrou formação de gemas adventícias (Figura 12 A) e embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figuras 12 B-D). Algumas vezes, os dois processos foram observados simultaneamente no mesmo calo, com exceção dos calos incubados sob LED misto, que apresentaram somente a formação de gemas adventícias (Figura 12 B).

Figura 12–Histologia de calos obtidos a partir de segmentos nodais e internodais de plantas *in vitro* de *Arachis repens* inoculados em meio MS suplementado com TDZ a 13,4 μM e incubados sob diferentes tipos de LED.



Legenda: A - Embrião em estágio cotiledonar produzido em calo formado a partir de segmento nodal sob LED vermelho; B - Gema formada em calos oriundos de segmento nodal sob LED misto; C- Embriogênese com embriões em estágio cotiledonar (seta preta) e gema (seta vermelha) formada em calos oriundos de segmento nodal sob LED azul; D - Gemas (seta preta) e embriões em estádiocotiledonar (seta vermelha) formado em calos oriundos de segmento internodal sob LED branco Barra = 1 μm .

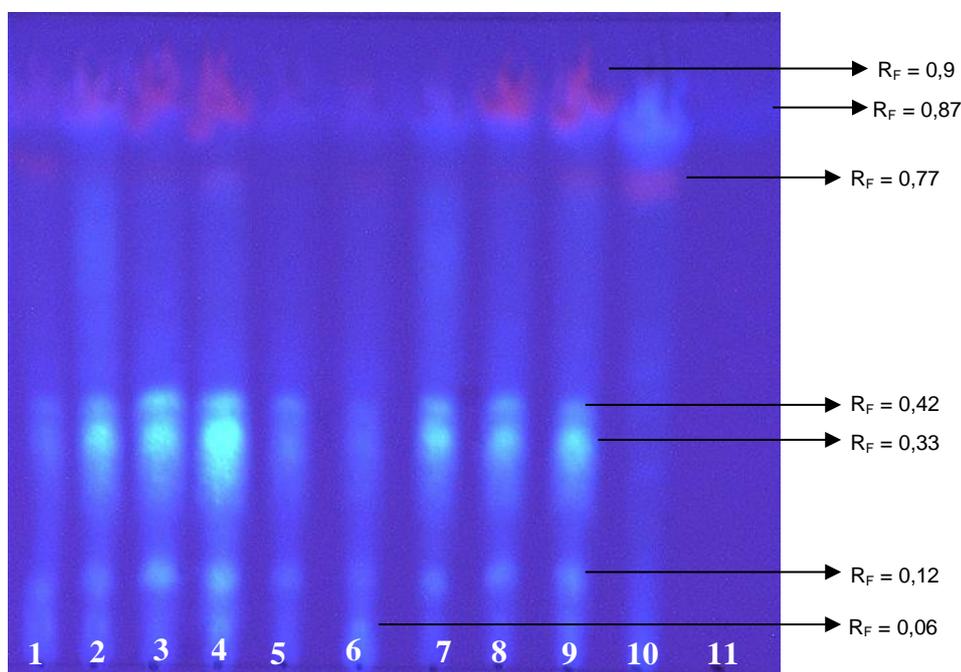
4.2 Análise Fitoquímica

4.2.1 Cromatografia de Camada Delgada

Os extratos etanólicos de *A. repens* foram analisados por CCD, utilizando o resveratrol (1mg/ml) como padrão. Quando a solução reveladora NP/PEG foi utilizada com visualização sob UV_{365nm}, foi observada a formação de bandas alaranjadas nas amostras 1, 9 e 10, correspondendo aos extratos de calos derivados de segmento nodal sob luz fluorescente branca e de calos derivados de segmento internodal sob LEDs branco e vermelho, respectivamente. Bandas azuis foram obtidas em todas as amostras, com maior intensidade nas amostras de 2 a 4 e de 7 a 9, correspondentes a extratos derivados de segmentos nodais e internodais incubados sob LEDs azul, misto ou branco (Figura 13).

Em todas as amostras foram detectadas bandas com R_F equivalente ao do resveratrol, com menor intensidade nas amostras 1, 5 e 6, correspondendo aos extratos de calos derivados de segmento nodal sob luz fluorescente branca e LED vermelho, de calos derivados de segmento internodal sob luz fluorescente branca, respectivamente.

Figura 13– Perfil cromatográfico para identificação de resveratrol em materiais de *A. repens* produzidos *in vitro* sob diferentes fontes de luz.



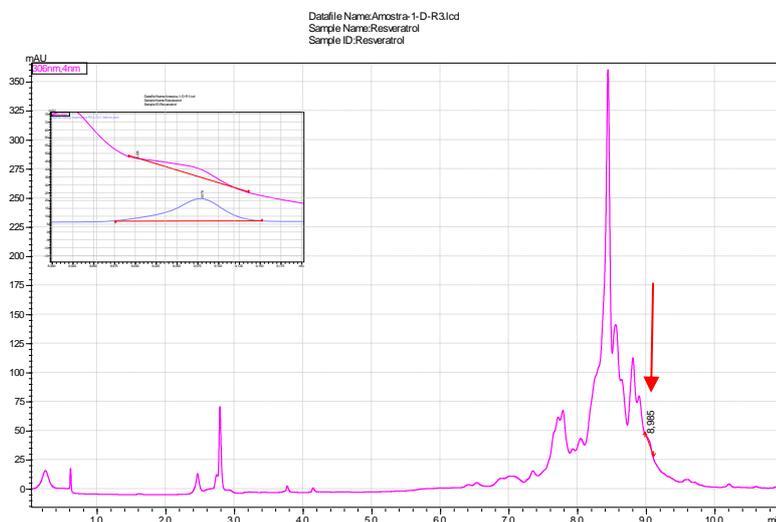
Legenda: Calos derivados de segmentos nodais cultivados sob diferentes tipos de luz: (1) Luz fluorescente branca; (2) Led azul; (3) Led misto; (4) Led branco; (5) Led vermelho; Calos derivados de segmento internodal em diferentes tipos de luz: (6) Luz fluorescente branca; (7) Led azul; (8) Led misto; (9) Led branco; (10) Led vermelho; (11) Padrão comercial de resveratrol ($R_F = 0,87$).

4.2.2 Análises por CLAE-DAD-UV

Para as análises dos extratos por CLAE-DAD-UV foram, inicialmente, testados diferentes tempos de maceração (30, 60 120 min), com o objetivo de determinar as melhores condições para a extração do *trans*-resveratrol.

O teor mais elevado de *trans*-resveratrol (139,33 ng/mL) foi encontrado nos extratos etanólicos de calos derivados de segmentos nodais incubados sob luz fluorescente branca, obtidos após maceração por 30 min (Figura 14). Os extratos obtidos em tempos maiores de maceração não apresentaram sinal referente ao *trans*-resveratrol, provavelmente devido isomerização do mesmo a *cis*-resveratrol. Sendo assim, o tempo de maceração de 30 minutos foi adotado para os extratos obtidos a partir do material *in vitro* incubado sob os diferentes LEDs.

Figura 14–Cromatograma de CLAE-DAD-UV de extrato etanólico de calos derivados de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com TDZ 13,6 μM e incubados sob luz fluorescente branca a 30°C, obtido após maceração por 30 minutos.

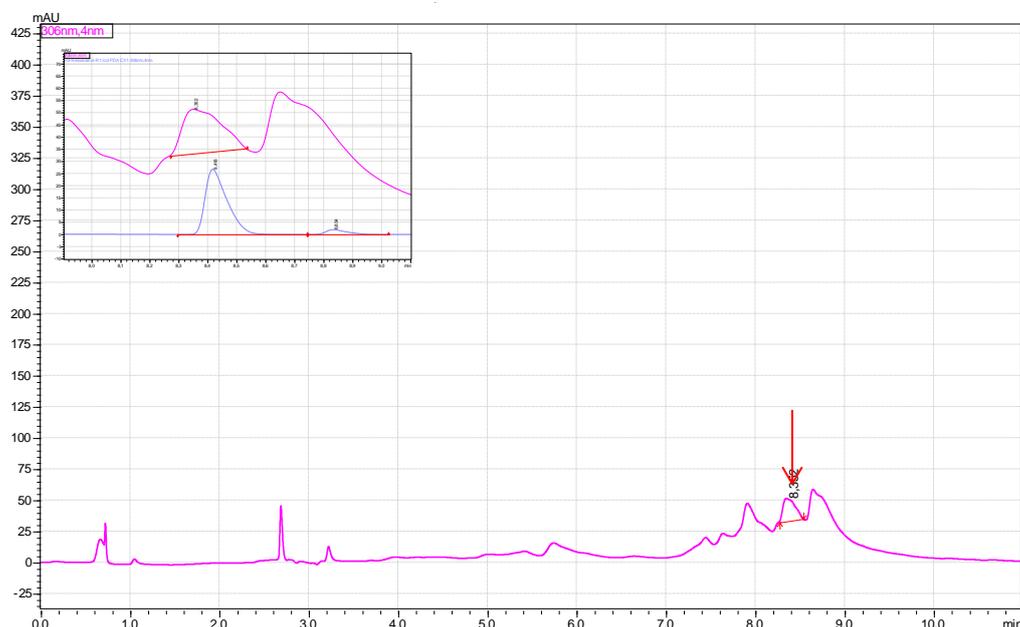


Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólicos de calos de *A. repens*. Seta vermelha indicando o sinal encontrado característico do *trans*-resveratrol.

Os extratos de calos obtidos sob diferentes qualidades de luz foram avaliados quanto à produção de *trans*-resveratrol. As amostras derivadas de calos obtidos sob LEDs apresentaram um aumento na produção de *trans*-resveratrol, em relação ao material produzido sob a luz fluorescente branca. A incubação sob LED misto induziu uma produção de *trans*-resveratrol significativamente maior do que o observado nas amostras mantidas sob os LEDs azul ou vermelho, isoladamente (Figura 15, Tabela 3).

A análise cromatográfica também indicou a presença de outras substâncias com tempos de retenção de 7 a 9 minutos, próximos aos do *trans*-resveratrol ($t_R = 8,6$ min), sugerindo a existência de outros estilbenos nos extratos de *A. repens* (Figura 16). Os cromatogramas das diferentes amostras que apresentaram valor significativo de *trans*-resveratrol encontram-se em anexo.

Figura 15– Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED misto (vermelho + azul).



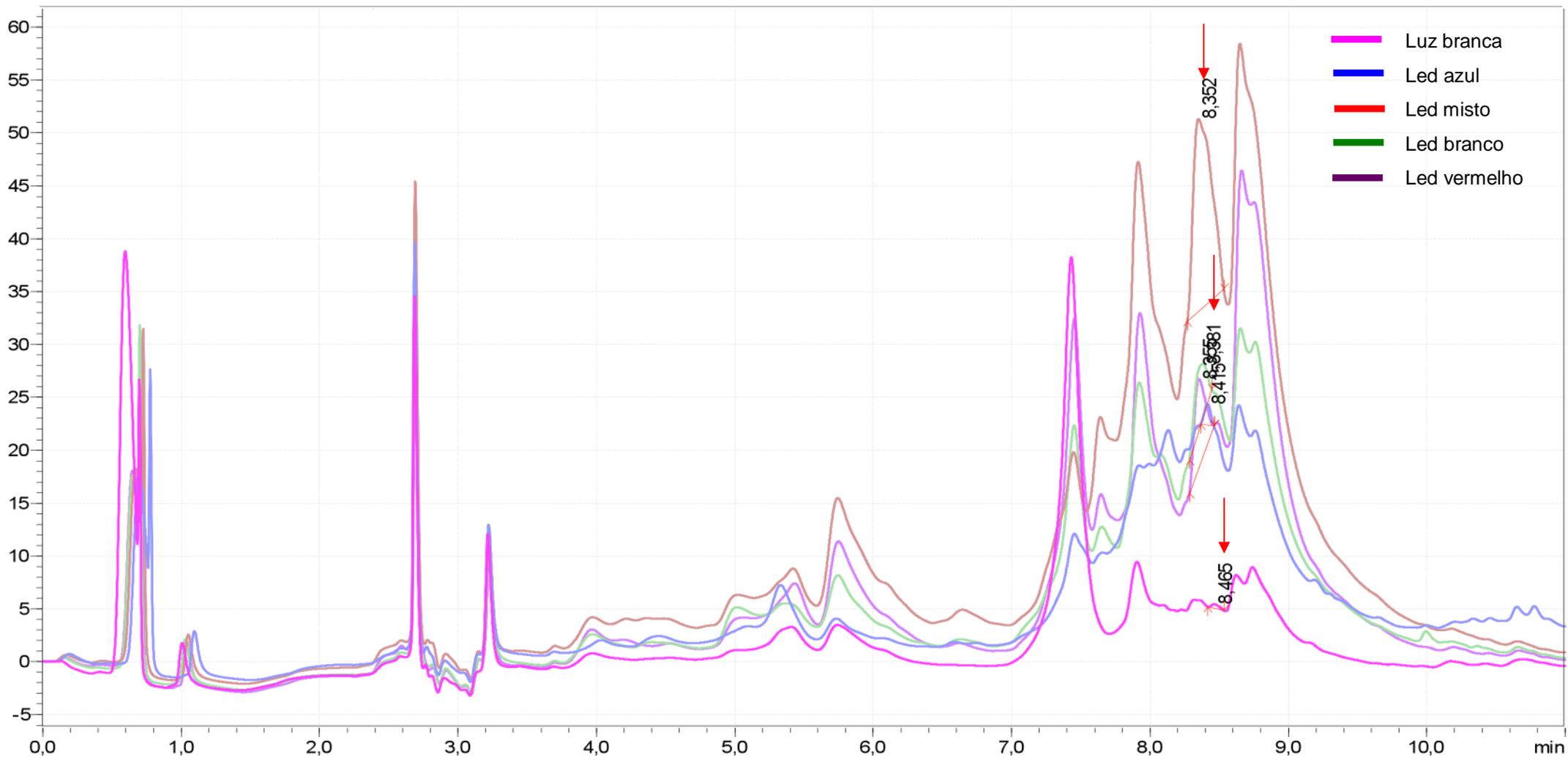
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*. Seta vermelha indicando o sinal encontrado característico do *trans*-resveratrol.

Tabela 3 – Concentração de *trans*-resveratrol nas amostras de calos derivados de segmentos nodais e internodais de *A. repens* incubados sob diferentes tipos de luz.

Extrato bruto	Concentração de <i>trans</i> -resveratrol (mg/g de peso fresco)				
	LF	LeA	LeM	LeB	LeV
Calos derivados de segmentos nodais	tr	0,29±0,002 ^e	7,45±0,05 ^a	0,65±0,01 ^d	2,32±0,007 ^c
Calos derivados de segmentos internodais	nd	tr	2,55±0,008 ^b	0,35±0,004 ^e	tr

Legenda: LF- Luz fluorescente branca; LeA- Led azul; LeM- Led misto (vermelho+ azul); LeB- Led branco; LeV- Led vermelho. (nd) Não detectado; (tr) Traço- sinal abaixo do limite de quantificação. Nota: Os dados representam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 16–Sobreposição do perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais de *A. repens* incubados sob diferentes tipos de luz.

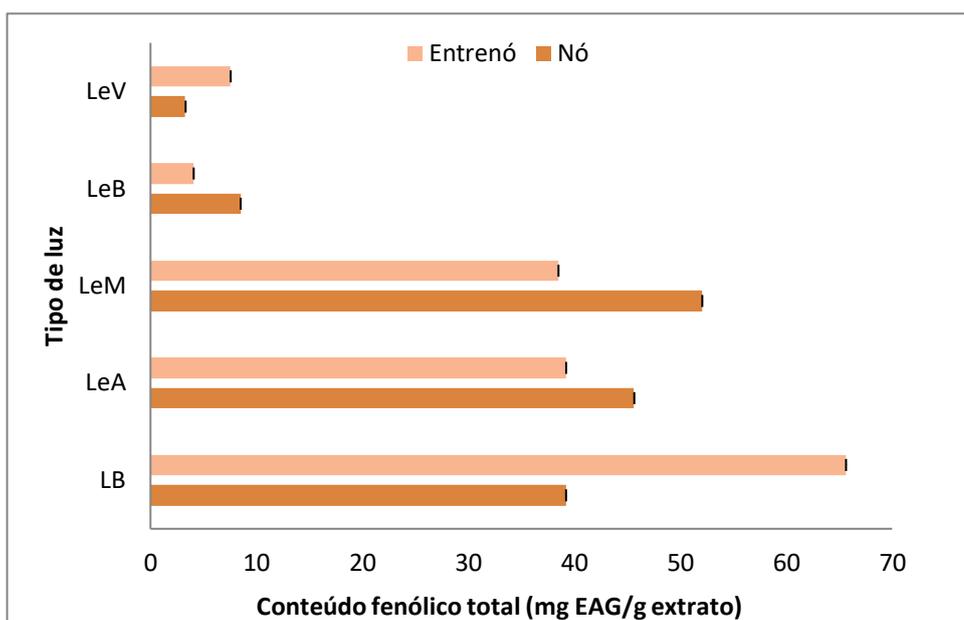


Legenda: seta vermelha indica sinal do *trans*-resveratrol nos diferentes tipos de luz.

4.3 Determinação do conteúdo fenólico

Na análise do conteúdo de fenóis, foi observado que os extratos preparados a partir de calos derivados de segmentos internodais incubados sob luz fluorescente branca e de segmentos internodais incubados sob LED misto apresentaram maiores teores, com o equivalente a $65,6 \pm 0,01$ e $52,07 \pm 0,01$ mg de ácido gálico/g de extrato, respectivamente (Figura 17).

Figura 17– Conteúdo fenólico de extratos de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados em diferentes tipos de luz, expressos em mg de equivalente de ácido gálico.



Legenda: LF- Luz fluorescente branca; LeA- Led azul; LeM- Led Misto (vermelho + azul); LeB- Led branco; LeV- Led vermelho.

4.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.4.1 Ensaio DPPH

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

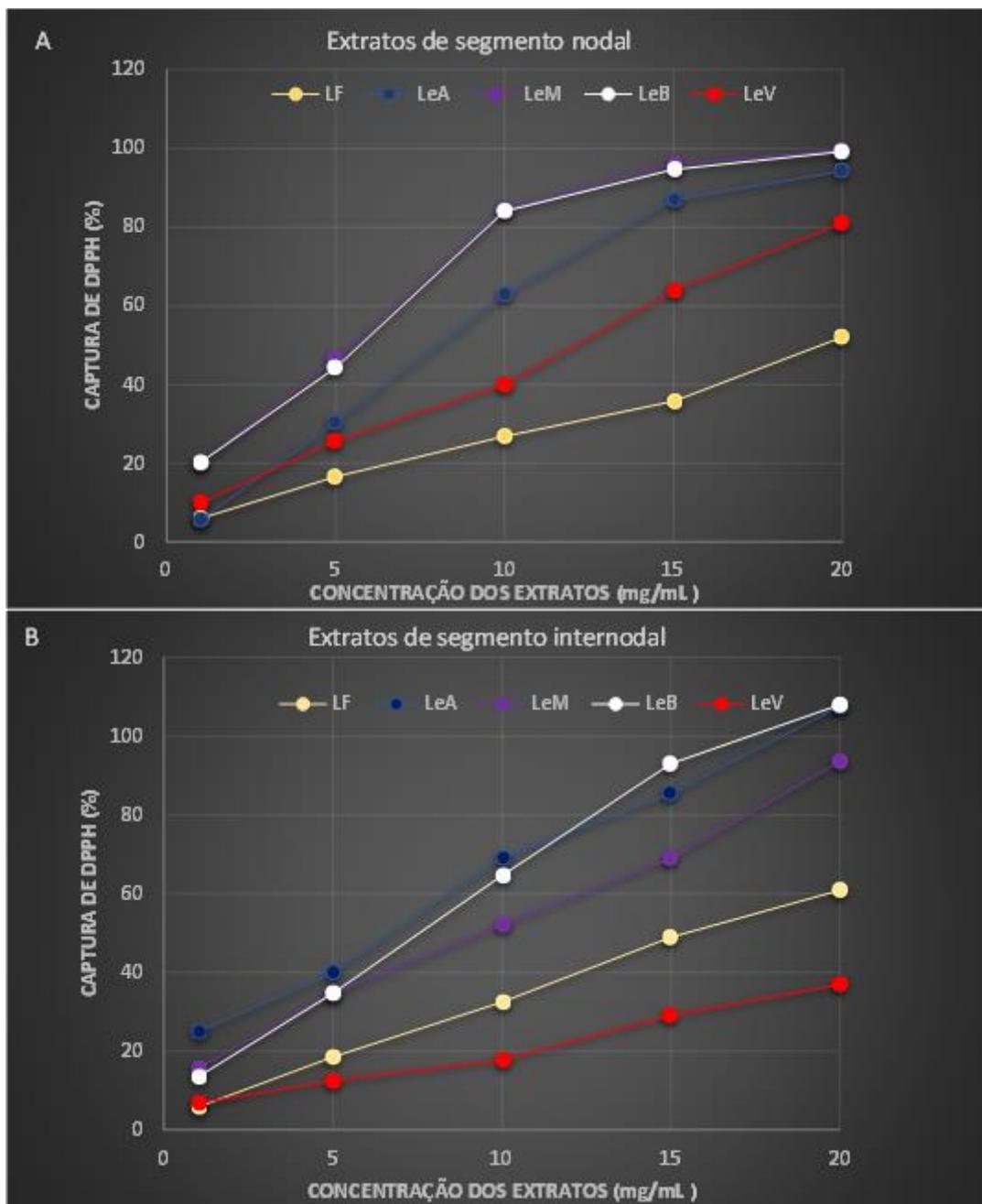
Os valores de CE_{50} variaram entre 5,5 a 20,4 g L⁻¹ nos extratos de calos derivados de segmentos nodais obtidos sob diferentes tipos de luz, enquanto que extratos de calos derivados de segmentos internodais apresentaram valores entre 6,8 e 21,1 g L⁻¹ (Tabela 4). Os extratos de calos obtidos a partir de segmentos nodais cultivados sob LED misto e branco apresentaram o menor valor de CE_{50} (5,5 e 6,0 g L⁻¹), com maior percentual de captura de DPPH (Figura 18 A). Por outro lado, o menor percentual de captura foi observado nos extratos de calos obtidos sob luz fluorescente branca (Figura 18, Tabela 4). Em geral, os extratos dos materiais produzidos a partir de segmentos nodais sob os diferentes tipos de LED apresentaram maior potencial antioxidante que os materiais produzidos sob luz fluorescente branca (Tabela 4).

Tabela 4—Concentração de extrato necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH (CE_{50}) dos extratos etanólicos de calos derivados de segmentos nodais e internodais produzidos *in vitro* e incubados sob diferentes tipos de luz.

Tipo de luz	CE_{50} (g L ⁻¹) de extratos de calos derivados de segmentos caulinares	
	Segmento nodal	Segmento internodal
LF	20,4±1,3 ^d	21,1±1,1 ^b
LeA	8,4±1,0 ^b	7,1±1,0 ^a
LeM	5,5±1,1 ^a	6,8±2,9 ^a
LeB	6,0±0,9 ^{ab}	7,7±0,5 ^a
LeV	15,3±5,4 ^c	16,5±5,4 ^b

Legenda: LF- Luz fluorescente branca; LeA- Led azul; LeM- Led Misto (vermelho + azul); LeB- Led branco; LeV- Led vermelho. Nota: Os dados representam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 18– Percentual de captura do radical DPPH por extratos de calos derivados de segmentos nodais e internodais incubados sob diferentes tipos de luz.



Legenda: A. Extratos de calos derivados de segmentos nodais B. Extratos de calos derivados de segmentos internodais. LF- Luz fluorescente branca; LeA- Led azul; LeM- Led Misto (vermelho + azul); LeB- Led branco; LeV- Led vermelho.

Os valores de conteúdo fenólico, atividade antioxidante e teor de *trans*-resveratrol obtidos encontram-se apresentados na tabela abaixo.

Tabela 5 – Comparação de conteúdo fenólico, atividade antioxidante e teor de *trans*-resveratrol em extratos de calos de segmentos nodais e internodais de *A. repens* obtidos sob diferentes tipos de luz

Tipo de luz	Tipo de explante					
	Segmento nodal			Segmento internodal		
	Conteúdo fenólico (mg EAG/g)	CE ₅₀ (g L ⁻¹)	[] <i>trans</i> -resveratrol (mg/g)	Conteúdo fenólico (mg EAG/g)	CE ₅₀ (g L ⁻¹)	[] <i>trans</i> -resveratrol (mg/g)
LF	39,2±0,01 ^b	20,4±1,3 ^d	tr	45,6±0,01 ^a	21,1±1,1 ^b	nd
LeA	45,6±0,02 ^{ab}	8,4±1,0 ^b	0,29±0,002 ^e	39,2±0,02 ^b	7,1±1,0 ^a	tr
LeM	52,07±0,01 ^a	5,5±1,1 ^a	7,45±0,05 ^a	38,5±0,01 ^b	6,8±2,9 ^a	2,55±0,008 ^b
LeB	8,50±0,007 ^c	6,0±0,9 ^{ab}	0,65±0,01 ^d	4,07±0,006 ^d	7,7±0,5 ^a	0,35±0,004 ^e
LeV	3,29±0,03 ^d	15,3±5,4 ^c	2,32±0,007 ^c	12,07±0,04 ^c	16,5±5,4 ^b	tr

Legenda: LF- Luz fluorescente branca; LeA- Led azul; LeM- Led Misto (vermelho + azul); LeB- Led branco; LeV- Led vermelho; (nd) Não detectado; (tr) Traço- sinal abaixo do limite de quantificação. Nota: Os dados representam média ± desvio padrão. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (p< 0.05).

DISCUSSÃO

Considerando que as condições de cultura desempenham um importante papel na indução da resposta morfogênica *in vitro*, neste trabalho foi analisado o efeito de diferentes fontes de luz no estabelecimento de plantas *in vitro* a partir de segmentos caulinares, na indução de calos a partir de explantes de plantas *in vitro* na produção de metabólitos secundários de *A. repens*.

A luz é um importante fator para a morfogênese vegetal. Sendo assim, os componentes como a qualidade, quantidade, direção e periodicidade, podem modular de forma direta ou indireta o crescimento e desenvolvimento de uma planta (GARELLO *et al.*, 1995). A composição, intensidade e comprimento de onda são também importantes para determinar a velocidade do crescimento das células, a acumulação de pigmentos e a diferenciação dos plastídios (ARNIM & DENG, 1996).

O comprimento de onda e a densidade de fluxo luminoso têm efeitos significativos no cultivo *in vitro*. Os efeitos de diferentes LEDs na morfogênese de espécies como *Musa* spp. (NHUT *et al.*, 2002), *Lactuca sativa* (OKAMOTO, YANAGI & TAKITA, 1996), *Capsicum annuum* (BROWN, SCHURGER & SAGER, 1995), *Solanum tuberosum* (JAO & FANG, 2004), *Spinacia oleracea* (YANAGI & OKAMOTO, 1997), *Protea cynaroides* (WU & LIN, 2012), entre outras, têm sido bem documentados na literatura.

Segmentos caulinares de *A. repens* apresentaram maior alongamento da parte aérea quando cultivados sob LED vermelho. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de *Zantedeschia albomaculata*, em que o maior alongamento de brotos ocorreu quando cultivados sob luz vermelha ou azul (RIBEIRO *et al.*, 2009). Na multiplicação *in vitro* do morangueiro, as brotações de maior comprimento também foram obtidas sob LED vermelho (ROCHA *et al.*, 2010). Esses resultados podem estar relacionados à indução da síntese de auxinas em folhas pela luz vermelha, conforme descrito por Muir e Zhu (1983). Além disso, a luz vermelha é importante para o desenvolvimento do aparato fotossintético e para o acúmulo de amido, já que possui um espectro próximo da absorvância máxima das clorofilas e fitocromos (ROCHA *et al.*, 2010; MALUTA *et al.*, 2013). Por outro lado, resultados distintos dos obtidos neste trabalho foram descritos para explantes de *Alternanthera brasiliana* e em culturas de *Spathiphyllum*, que

apresentaram maior alongamento dos brotos sob LED azul e misto, respectivamente (NHUT et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram também um efeito positivo do LED vermelho enraizamento, e do LED azul para uma maior produção de folhas. Uma possível explicação é que apenas os fótons de comprimento de onda de 400 a 700nm são utilizados na fotossíntese e cerca de 90% dessa radiação fotossinteticamente ativa é absorvida pelas folhas, sendo o restante refletido na superfície foliar (PEREIRA & SILVA, 2007).

Na avaliação do efeito da luz na indução de calogênese a partir de explantes de plantas *in vitro* de *A. repens*, segmentos nodais e internodais apresentaram formação de diferentes tipos de calos (compactos, friáveis ou mistos), de acordo com a qualidade da luz. A maior taxa de calogênese a partir de segmentos nodais foi observada nas culturas incubadas sob LED vermelho ou LED azul, enquanto que segmentos internodais apresentaram maior eficiência de calogênese quando cultivados sob LEDs branco ou misto.

O crescimento e desenvolvimento de calos também dependem do comprimento de onda e da intensidade luminosa (SEIBERT, WETHERBEE & JOB, 1975). Estudos sobre o efeito dos LEDs sobre a formação de calos e indução de embriogênese já foram realizados em algumas espécies, incluindo cana-de-açúcar (FERREIRA et al., 2016) e *Agave tequilana* (RODRÍGUEZ-SAHAGÚN et al., 2011). Em *Panax vietnamiensis* (NHUT et al., 2015) e *Oncidium* (CHUNG et al., 2010), o LED misto (vermelho + azul) foi considerado o mais eficiente para crescimento de calos e embriões somáticos. Em *A. repens*, a produção de embriões pode ser observada sob os LEDs azul, branco e vermelho.

A indução de calos embriogênicos já foi observada com a adição de 2,4-D no meio de cultura em diferentes espécies (FEHÉR et al., 2002; FEHÉR, PASTERNAK & DUDITS, 2003; ZHANG, LI & KONG, 2007), e em resposta a BAP em algumas espécies do gênero *Arachis*, com a produção de embriões em estágio cotiledonar e torpedo (PACHECO et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, tendo sido obtidos calos embriogênicos com a formação de embriões nos mesmos estádios, porém utilizando meio de cultura suplementado com o TDZ. Diversos trabalhos já demonstraram que a utilização de TDZ, 2,4-D ou BAP, isoladamente ou em combinação, é eficaz para indução de calos embriogênicos em diferentes cultivares de

Coffea (SILVA, 2003; MARQUES, 2005; FIGUEIRA, 2005; SILVA et al., 2009), *Zantedeschia* (DUQUENNE et al., 2006) e *Ocimum basilicum L.* (COSTA et al., 2015). A cultura de calos não morfogênicos, em geral, é conduzida com o objetivo de investigar o potencial de produção de substâncias bioativas com interesse farmacológico. Neste trabalho, calos produzidos sob diferentes tipos de luz foram avaliados do ponto de vista do perfil fitoquímico, conteúdo fenólico e atividade antioxidante.

A extração é a primeira e mais importante etapa para o isolamento e a purificação de substâncias bioativas (ĆUJÍĆ et al., 2016). A maceração, uma técnica convencional, é muito utilizada para a extração de compostos fenólicos (AZMIR et al., 2013; LIMA et al., 2004; CANUTO, SILVEIRA & BEZERRA, 2010). Nesse método, o tipo e a concentração do solvente, assim como tempo de maceração, também influenciam a eficiência de extração de diferentes substâncias (CUJIC et al., 2016). Dessa forma, no preparo de extratos etanólicos de *A. repens*, foi avaliado inicialmente o efeito do tempo de maceração em etanol.

Na quase totalidade dos tecidos avaliados, os extratos de *A. repens* obtidos com maior tempo de maceração apresentaram menor eficiência na extração do *trans*-resveratrol, sendo o tempo de 30 minutos escolhido para a preparação dos extratos posteriores. Este fato pode estar relacionado à degradação de substâncias durante períodos mais prolongados (CHEN et al., 2016). Ćujić et al. (2016), observaram que o melhor tempo de maceração para extrair compostos fenólicos em espécies de *Aronia* era de 60 minutos, e que tempos superiores a 90 minutos não aumentavam a eficiência do processo. Por outro lado, Radojković et al. (2016) obtiveram melhor eficiência de extração de compostos fenólicos e flavonoides partir de folhas de *Morus* após 24 horas de maceração.

Diversas substâncias bioativas já foram descritas no gênero *Arachis*, tanto em plantas desenvolvidas em condições naturais quanto em materiais obtidos *in vitro*, sendo os estilbenos, onde se inclui o *trans*-resveratrol, a principal classe encontrada (PARK et al., 2003; KU et al. 2005; LIN et al., 2007; YANG et al., 2010a; YANG et al., 2010b; LOPES et al., 2011; KIM et al., 2013; SANTOS, 2016). Neste trabalho, a CCD foi utilizada como técnica preliminar para detecção de *trans*-resveratrol em extratos dos calos incubados em diferentes qualidades de luz, por ser uma técnica rápida e de fácil interpretação. Foram encontradas bandas azuis, correspondentes a polifenóis, e bandas

alaranjadas, características de flavonoides, de forma semelhante ao descrito por Santana et al (2007).

O teor e o tipo de estilbenosencontrados podem ser influenciados pela eliciação com luz ultravioleta (CHUNG et al., 2003; MEDINA-BOLIVAR et al., 2003; KU et al., 2005; CHANG et al., 2006) ou eliciadores bióticos (YANG et al., 2010a; YANG et al., 2010b; RAO, WADIA & STRANGE, 1996). Neste trabalho, a qualidade de luz influenciou o teor de *trans*-resveratrol e de outras substâncias com tempos retenção próximos, as quais, provavelmente representam tipos diferentes de estilbenos.

Na análise quantitativa por CLAE-DAD-UV aqui realizada, os extratos de calos derivados de segmentos nodais de *A. repens* obtidos sob LED misto apresentaram teores de *trans*-resveratrol significativamente mais elevados (7,45 mg/g de peso fresco) do que a maioria dos valores encontrados na literatura. Esse valor corresponde, por exemplo, a um teor 79 vezes maior do que o máximo obtido por Santos (2016), em um estudo comparativo de diversos materiais de cinco cultivares de *A. hypogaea* (0,094 mg/g de peso fresco). Sanders et al (2000) analisaram grãos de 15 cultivares do amendoim cultivado (*A. hypogaea*) e detectaram teores entre 0,02 e 1,79 µg/g. Resultados semelhantes foram relatados por Tokusüoglu et al (2005) em cultivares de amendoim da Turquia e concentrações menores também foram encontradas em uva (750 µg/g de peso fresco) (CANTOS, ESPN & TOMS-BARBEN, 2001 e 2002; DOUILLET-BREUIL et al, 1999).

A capacidade antioxidante dos extratos vegetais está principalmente relacionada com os compostos fenólicos que são sintetizados pelas plantas em resposta a estresses abióticos ou bióticos (infecção, estresse hídrico, estresse causado pela baixa temperatura ou pela intensidade luminosa) (SAPTARINI, WARDATI & JULIWATI, 2013). Neste trabalho, os extratos analisados por CLAE foram também avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos, sendo os resultados correlacionados à atividade antioxidante dos materiais, com base no ensaio de captura do radical DPPH. A atividade antioxidante foi significativamente aumentada nos extratos de calos de *A. repens* obtidos sob LEDs misto e azul, os quais apresentaram um teor mais elevado de fenóis, de forma semelhante ao observado em *Spondias pinnata* (HAZRA, BISWAS & MANDAL, 2008).

O efeito da qualidade de luz no teor de compostos fenólicos pode variar de acordo com a espécie. Li & Kubota (2009) demonstraram um aumento de compostos fenólicos em plantas de alface mantidas sob LEDs vermelho e verde, ao contrário do observado nas

culturas sob LED azul. Resultados semelhantes foram encontrados em extratos de culturas de *Pleurotus eryngii* e *Hordeum vulgare*, que apresentaram maior atividade antioxidante sob LED azul e menor atividade sob LED vermelho (JANG et al., 2011; LEE & HYUN, 2011). Yong et al (2008) observaram um aumento de 34% de atividade antioxidante nos extratos de materiais de *Amaranthus* spp. incubados sob LED misto e azul em relação ao controle. Outros trabalhos também relataram o aumento de diversas substâncias em tomate (GILIBERTO et al., 2005), café (RAMALHO et al., 2002) e alface (OHASHI-KANEKO et al., 2007), na presença de luz azul e, em *Cranberry*, sob luz vermelha. Por outro lado, foi também demonstrado que a associação de luz vermelha e azul (LED misto) é eficaz para o desenvolvimento de diversas espécies (LIN et al., 2013; JOHKAN et al., 2011). Portanto, esses resultados demonstram a viabilidade de otimizar o aumento da concentração de diversas substâncias utilizando diferentes qualidades de luz (LI & KUBOTA, 2009).

Neste trabalho, não houve uma correlação positiva entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de calos produzidos sob luz fluorescente branca, os quais apresentaram grande quantidade desses compostos, porém com menor atividade. Estes resultados podem ser consequência da ação de outros constituintes que não sejam polifenóis, considerando que várias substâncias na célula possuem potencial antioxidante. Além disso, para que compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico, é preciso que sejam capazes de retardar a velocidade da auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres, ainda que em baixas concentrações, e também que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996; SOARES et al., 2008). Sendo assim, ainda que o extrato apresente grande quantidade de compostos fenólicos, podem não ter ação antioxidante.

No gênero *Arachis*, diversos estudos já foram realizados utilizando o ensaio de captura do radical DPPH (ABBASI et al., 2009; LOPES et al., 2013; BRAGA et al., 2016; CAMARGO et al., 2011; CHANG et al., 2006), sendo o potencial antioxidante de extratos de diversos materiais associado principalmente ao resveratrol (LOPES et al., 2013). Neste trabalho, o maior teor de *trans*-resveratrol foi encontrado nos calos produzidos sob LED misto, cujos extratos apresentaram um potencial antioxidante maior que aqueles de calos obtidos sob as outras qualidades de luz testadas. Esses extratos também apresentaram produção de outras substâncias com tempo de eluição

próximo ao *trans*-resveratrol, o que sugere que sejam seus derivados, possivelmente relacionados também à atividade antioxidante.

O conjunto dos resultados deste trabalho permitiu o estabelecimento culturas de calos sob os diferentes tipos de LEDs. A análise desses materiais revelou diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos, incluindo o *trans*-resveratrol, assim como no potencial oxidante dos extratos. Dessa forma, os sistemas de cultura aqui desenvolvidos, em especial os calos formados sob LED misto, podem vir a ser utilizados como uma alternativa para a produção de estilbenos com ação antioxidante.

CONCLUSÕES

- ✓ A utilização do LED vermelho mostrou-se mais eficiente para o estabelecimento e crescimento de plantas *in vitro* a partir de segmentos caulinares excisados de plantas mantidas em telado e cultivados em meio MS0, uma vez que, nessas condições, foi possível obter plantas maiores, em tempo reduzido;
- ✓ O uso de LED branco induziu a maior taxa de calogênese, enquanto que a utilização dos LEDs azul ou vermelho permitiu a formação de calos organogênicos e embriogênicos;
- ✓ As análises cromatográficas indicaram a presença de resveratrol e outros estilbenos característicos do gênero *Arachis* nos calos formados sob LED misto. Além disso, a qualidade de luz induziu o aumento da quantidade dessas substâncias em relação à luz fluorescente branca;
- ✓ Os extratos de calos derivados de segmentos nodais ou internodais incubados sob LED misto apresentaram significativo conteúdo fenólico e ação antioxidante.

PERSPECTIVAS

- ✓ Identificação das substâncias presentes nos diferentes extratos dos materiais incubados sob os diferentes tipos de LEDs testados;
- ✓ Determinar as variações nos conteúdos de proteínas, nos calos provenientes dos diferentes tipos de LED testados.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.A.; RIAZ, T.; KHAN, M.&AJAIB, M. Chemical composition of volatile fraction of pakistani peanut and its antiradical activities. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**; v. 31(6); p. 955-959, 2009.
- ABBOTT, J.A.; MEDINA-BOLIVAR, F.; MARTIN, E. M. ; ENGELBERTH, A.S.; VILLAGARCIA,H.; CLAUSEN, E.C.; CARRIER, D.J. Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. **Biotechnology Progress**, v. 26, p 1344-1351, 2010.
- AHUJA, I; KISSEN, R.& BONES, A.M. Phytoalexins in defense against pathogens. Trends in **Plant Science** February, Vol. 17, No. 2, 2012.
- AI SYAH, S.; GRUPPEN, H.; SLAGER, M.; HELMINK, B. & VINCKEN, J.P. Modification of prenylated stilbenoids in Peanut (*Arachis hypogaea*) seedlings by the same fungi the elicited them: the fungus strikes back. **Journal Agricultural food Chemistry**, 63(42):9260-9268, 2015.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Documento **Embrapa Cerrados**, Planaltina, ISSN 1517-5111, p 16, 2002.
- ANDRADE, S.R.M.; PINTO, A.C.Q.; FALEIRO, F.G.; CORDEIRO, M.C.R.; RAMOS, V.H.V. & TEIXEIRA, J.B. Desenvolvimento e avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de manga visando a micropropagação. Boletim de pesquisas e desenvolvimento/ **Embrapa Cerrados**, Planaltina-DF, 153, p 24, 2005.
- ARAÚJO, S.G. **Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação de atividades biológicas de *Arachis villosulicarpa* Hoehne**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.
- ARNIM, A.V. E DENG, X-W. Light controle seedling development. Annual Review **Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.215-243, 1996.
- ARORA, M.K. & STRANGE, R.N. Phytoalexin accumulation in groundnuts in response to wounding. **Plant Science**, v. 78, p. 157-163, 1991.
- ATWILL, R.L.; NOPO-OLAZABAL, L. & MEDINA-BOLIVAR, F. Bioproduction and purification of prenylated resveratrol analogs from hairy root cultures of peanut. **Planta Medica** 78(11), 2012.

AZEVEDO, J.M.A.; SILVA, H.S.F.; ASSIS, G.M.L.; SANTOS, L.F.A.; WOLER, P.F. Genetic divergence among accessions of *Arachis repens* based on vegetative morphological traits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.10,p. 2067-2073, 2011.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M. A., GHAFOOR, K., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p.426 – 36, 2013.

BAJAJ, Y. P. S.; RAM, A.K; LABANA, K.S. & SINGH, H. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*. **Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 35–39, 1981.

BANSAL, U.K.; SATIJA, D. R. & AHUJA, K. L. Oil composition of diverse groundnut (*Arachis hypogaea* L) genotypes in relation to different environments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Volume 63, pp 17–19, 1993.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. Dissertação de mestrado, Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

BRAGA, G.C.; MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P. & ALENCAR, S.M. Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango and peanut agro-industrial by products. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n° 8, p. 1498-1504, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BROWN, C.S.; SCHURGER, A.C. & SAGER, J.C. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 120:808–813, 1995.

CAI, Z.; KASTELL, A.; MEWIS, I; KNORR, D. & SMETANSKA, I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Plant Cell Culture and Tissue Culture**, 108:401-409, 2012.

CAMARGO, A.C.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; MANSI, D.N.; DOMINGUES, M.A.C. & ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama na cor, capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31(1): 11-15, 2011.

CAMPOS, T.; FERREIRA FILHO, J.A.; SOUSA, A.C.B.; AZEVEDO, H.S.F. & ASSIS, G.M.L. Determinação da coleção nuclear do banco ativo de germoplasma de amendoim forrageiro. In: **Congresso Norte Nordeste de pesquisa e Inovação**, 10, Rio Branco, 2015.

CANTOS, E.; ESPN, J. C.; TOMS-BARBERN, F. A. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new “functional” fruit?. **Journal Agriculture Food Chemistry**. V, 49, 5052–5058, 2001.

_____. Postharvest stilbene enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 50, 6322–6329, 2002.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 662666, 2010.

CARVALHO, M.A; PIZZARO, E.A. & VALLS, J.F.M. Flowering dynamics and seed production of *Arachis pintoi* and *Arachis repens* in the Brazilian Cerrados. **Tropical Grasslands**, Vol. 43, 139–150, 2009.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; RAVENTOS, R. M. L. Isoflavones, lignans and stilbenes origins, metabolism and potential importance to human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1044–1062, 2000.

CAVALCANTE, M.J.B.; SHARMA, R.D. & VALENTIM, J.F. Nematoides associados à *Arachis pintoi* e *Arachis glabrata* cultivados como forrageiras no Acre. **Comunicado técnico Embrapa**, n 130, p1-2, 2001.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. & FERRIER, D.R. Bioquímica ilustrada, 4^o ed, Porto Alegre: Artmed, 533p, 2008.

CHANG, H.S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, J. & PAEK, Y. Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, vol.39, n^o2, p. 129-134, 2003.

CHANG, J.C.; LAI, Y.H.; DJOKO, B.; WU, P.L; LIU, C.D; LIU, Y.W. & CHIOU, R.Y. Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 54(26): 10281-10287, 2006.

CHAO, H-H; JUAN, S-H.; LIU, J-C.; YANG, H-Y.; YANG, E.; CHENG, T-H. & SHYU, K-G. Resveratrol inhibits angiotensin II induced endothelin-1 gene expression

and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, 515, 1-9, 2005.

CHARLET, S; GILLET, F; VILLARREAL, M.L; BARBOTIN, J.N; FLINIAUX, M.A; NAVA-SUCEDO, E. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells with Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. *Plant Physiol Biochem* 38: 875-870, 2000.

CHEN, Q.; FUNG, K.Y.; LAU, Y.T.; NG, K.M. & LAU, D.T.W. Relationship between maceration and extraction yield in the production of Chinese herbal medicine. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 236-243, 2016.

CHEN, R.-S.; WU, P.-L. & CHIOU, Y.-Y. Peanut roots as a source of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, p. 1665-1667, 2002.

CHONG, J.; POUTARAUD, A. & HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, v 177, 143-155, 2009.

CHUNG, IIL-MIN.; PARK, M.R.; CHUN, J.C. & YUN, S-J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, v. 164, 103-109, 2003.

CHUNG, J.P.; HUANG, C.Y.; DAI, T.E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Scientia Horticulturae*, v.124, p.511-516, 2010.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Ano 3, n°19, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2015. Prospecção para Safra 2014/15. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 27 de março de 2015.

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

CONDORI, J.; SIVAKUMAR, G; HUBSTENBERGER, J; DOLAN, M.C; SOBOLEV, V.S& MEDINA-BOLIVAR, F. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. **Plant Physiology Biochemistry**.48(5):310-8, 2010.

COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA, J.H.S.; TORRES, M.F.; SANTOS, O.N.A. & BLANK,A.F Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. **Scientia plena**, v. 11, n.1, 2015.

COSTA, L.C. **Biologia floral de espécies do gênero Arachis L. (Fabaceae – Papiloideae), com ênfase em aspectos da morfologia floral e na anatomia de ovários.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2012.

ĆUJIĆ, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIĆ, G. & IBRIĆ. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry** 194, 135-142, 2016.

DOUILLET-BREUIL, A.-C.; JEANDET, P.; ADRIAN, M.; BESSIS, R. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. **Journal Agriculture Food Chemistry**. V. 47, 4456–4461, 1999.

DUNBAR, K.B. & PITTMAN, R.N. Adventitious shoot formation from mature leaf explants of *Arachis* species. **Crop science**, v. 32(6) p. 1353-1356, 1992.

DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S. HUYLENBROECK, J.V. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zantedeschia* hybrids. **Plant Cell Tissue Organism Culture**, 87:329–331, 2006.

ERGI, A.C. & SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboesa (*Rubus idaeus* L.) ‘BATUM’. **Revista Brasileira e Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

FABRICIO MEDINA-BOLIVAR, F.; CONDORI, J.; RIMANDO, A.M.; HUBSTENBERGER, J.; SHELTON, K. & O’KEEFE, S.F.; BENNETT, S.; DOLAN, M.C. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. **Phytochemistry** 68, 1992–2003, 2007.

FÁVERO, A.P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de Arachis visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.** Tese de Doutorado, ESALQ-USP, 2004.

FEHÉR, A; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, 57:5–12, 2002.

_____, DUDITS D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201- 228, 2003.

FERREIRA, T.L.; SILVA, M.M.A.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. & WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cellular, Tissue and Organism Culture**, 2016.

FIGUEIRA, E. R. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FOLIN, O. & DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v XII, p.239-243, 1912.

FONTANA, M.L.; MROGINSKI, L.A. & REY, H.Y. Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf culture. **Biocell**, 33(3): 179-186, 2009.

FREITAS, F.O.; PEÑALOZA, A.P.S. & VALLS, J.F.M. O amendoim contador de história. Documento 107, 1º Ed, p. 9, **Embrapa**, 2003.

_____. Ampliação da área de ocorrência da espécie *Arachis villosulicarpa* Hoehne. Planta sob cultivo entre os índios Yawalapiti e Waurá, Nordeste do Estado do Mato Grosso- Brasil. **Comunicado Técnico** 106, ISSN 9192-0099, Brasília, 2004.

FRITZEMEIER, K-H.; ROLFS, C-H.; PFAI, J.; KINDL. Action of ultraviolet-C on stilbene formation in callus of *Arachis hypogaea*. **Planta**. 159: 25-29, 1982.

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

GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G; VALLS, J.F.M.& MANSUR, E. Cryopreservation of cultivated and wild *Arachis* species embryonic axes using desiccation and vitrification methods. **CryoLetters** 23, 61-68, 2002b.

GAGLIARDI, R.F.; PACHECO, G.P.; VALLS, J.F.M. & MANSUR, E. Germoplasm preservation of wild *Arachis* species through culture of shoot apices and axillary buds from *in vitro* plants. **Biologia Plantarum** 45 (3): 353-357, 2002a.

_____. COCULILO, S.P.; VALLS, J.F.M. & MANSUR, E. *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). **Biodiversity and Conservation**9: 943–951, 2000.

GARCIA, L.C. **Cultura de Tecidos e Análise Fitoquímica de *Arachis repens* Handro**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

_____. **Cultura de tecidos, investigação fitoquímica e biológica de materiais de campo de *Arachis repens* Handro**. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

GARELLO, G.A.C.; MÉNARD, C. DANSEREU, B. DEGIVRY, M.-T.L.P. The influence of light quality on rose flower senescence: involvement of abscisic acid. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.16, p.135-139, 1995.

GASPAR, L. *Índios do Brasil: alimentação e culinária*. Pesquisa Escolar Online, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Acesso em: 16.9.16. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>, 2013.

GEORGE, E.F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3ed. v. 1. p. 1-28, 2008.

GIMENES, M.A.; LOPES, C.R., GALGARO, M.L., VALLS, J.F.M. & KOCHERT, G. Genetic variation and phylogenetic relationships based on RAPD analysis in section *Caulorrhizae*, genus *Arachis* (Leguminosae). **Euphytica** 116: 187–195, 2000.

GODOI, S.; GRANDIS, A. & TAKAKI, M. A germinação de sementes de *Miconia theaezans* (Bonpl.) Cogniaux (Melastomataceae) é controlada pelo fitocromo. **Naturalia**, Rio Claro, v. 32, p.13-22, 2009.

GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A.; BURRONI, L. V. & GUZMAN, C. A. Fatty acid, sterol and proximate compositions of peanut species (*Arachis* L.) seeds from Bolivia and Argentina. **Grasas Y Aceites**, 48, 219-225, 1997.

_____. NEPOTE, V. & GUZMÁN, C.A. Chemical composition of some wild species (*Arachis* L.) seeds. **Journal Agricultural food chemistry**, 48 (3), p 806-809, 2000.

GILIBERTO, L.; PERROTTA, G.; PALLARA, P.; WELLER, J.L.; FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M.; FIORE, A., TAVAZZA, M. & GIULIANO, G. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. **Plant Physiol.** 137, 199–208, 2005.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.31, n.2, p.166-174, 2013.

GUIMARÃES, P.M.; BRASILEIRO, A.C.M.; PROITE, K.; ARAUJO, A.C.G.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; PIC-TAYLOR, A.; SILVA, F.R.; MORGANTE, C.V.; RIBEIRO, S.G. & BERTIOLI, D.J. A Study of Gene Expression in the Nematode

- Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. **Tropical Plant Biology**, vol 3, pp 183–192, 2010.
- GUPTA, S.D. & JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnological Reports**, 7:211-220, 2013.
- HALDER, M. & JHA, S. Enhanced trans-resveratrol production in genetically transformed root cultures of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, 124 (3), 2015.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, J.F.T. & GENEVE, R.L. Plant propagation: principles and practices. 7th ed. Upper Saddle River: **Prentice Hall**, 880p, 2002.
- HAZRA, B; BISWAS, S. & MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 8:63, 2008.
- HOLLAND, K.W.; BALOTA, M.; III, W.N.E.; MALLIKARJUNAN, P.; TANKO, J.M.; ZHOU, K. & O'KEEFE, S.F. ORAChromatography and total phenolics content of Peanut root extracts. **Journal of Food Science**, v. 76, n°3, 2011.
- HUETTEMAN, C.A. & PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cellular, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- INGHAM, J.L. 3,5,4'- Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). **Phytochemistry**, vol 15, pp. 1791-1793, 1976.
- JANG, M-J; LEE, Y-H; KIM, J-H & JU, Y-C. Effect of LED Light on Primordium Formation, Morphological Properties, Ergosterol Content and Antioxidant Activity of Fruit Body in *Pleurotus eryngii*. **The Korean Journal of Mycology**, v. 39, pp.175-179, 2011.
- JAO, R.C & FANG, W. Growth of potato plantlets *in vitro* is different when provided concurrent versus alternating blue red light photoperiods. **Horticultural Science**, v.39, n.2, p380-382, 2004.
- _____. Effects of frequency and duty ratio on the growth of potato plantlets *in vitro* using light emitting diodes. **Hort Science** 39:375–379, 2004.
- JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P.T.B.; COSTA, S.S.; GONÇALVES, C.Q.B. & BRANDÃO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in*

in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **ACTA Amazônica**, 40 (2): 275-280, 2010.

JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, 47:91–110, 2005.

JOHANSEN D. A., Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York, pp. 1-523; 1940.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HAHIDA, S. & YOSHIHARA, T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa*. **Environmental and Experimental Botany**, 75 128–133, 2012.

JOYCE, P.; KUWAHATA, M.; TURNER, N & LAKSHAMANAN, P. Selection system and cocultivation médium are important determinants of *Agrobacterium* mediated transfection of sugarcane. **Plant Cellular Reports** 29(2):173-183, 2010.

KANEDA, Y.; Tabei, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T. & KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.

KIM, J.S. & PARK, S.U. Resveratrol production in transgenic hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea*. **In vitro Cellular & Developmental Biology –animal** 43:S52-S52, 2007.

_____; LEE, S.Y & PARK, S.U. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. **African Journal Biotechnology**, v.7: 3788-3790, 2008.

KIM, H.-H; GOINS, G.D.; WHEELER, R.M. & SAGER, J.C. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red and blue-light emitting diodes. **Horticultural Science**, Saint Joseph, v.39, n.7, p. 1617-1622, 2004.

KIM, T.P.N.; YHI, N.V.; VAN, P.T.; SIEM, P.Q.N.; THUY, D.N., THAT, Q.T. & PHI, P.N.K. Phytochemical constituents and determination of resveratrol from the roots of *Arachis hypogaea* L. **American Journal of Plant Sciences**, 4, 2351-2358, 2013.

KING, R.E.; BOMSER, J.A. & MIN, D.B. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety**, v.5, 2006.

KRAPOVICKAS, A. & GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia** 8 (1-4): 1-186, 1994.

- KRAUS, J.E & ARDUN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica, Rio de Janeiro: **EDUR**, 1997.
- KU, K-L.; CHANG, P-S.; CHENG, Y-C. & LIEN, C-Y. Production of Stilbenoids from the Callus of *Arachis hypogaea*: a Novel Source of the Anticancer Compound Piceatannol. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v 53, 3877–3881, 2005.
- LANZ, T.; SCHRODER, G. & SCHRODER, J. Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L. **Planta**, v 181:169–175, 1990.
- LEE, J. H.; BAEK, I. Y.; HA, T. J.; CHUONG, M-G; KO, J. M.; OH, S-K.; KIM, H. T; RYU, H.W.; PARK, K. Y. & PARK, K. H. Identification and characterization of phytochemicals from Peanut (*Arachis hypogaea* L) Pods. **Food Science and Biotechnology**, v17, p.475-482, 2008.
- LEE, N.Y. & HYUN, J-N. LED Effect on Free Radical-Scavenging Activity of Barley Leaf. **Journal Crop Science Biotechnological**, v14:317-320, 2011.
- LI, J; OU-LEE, A.S-M; RABA, R.; AMUNDSON, R.G & ROBERT L. *Arabidopsis* Flavonoid Mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. **The Plant Cell**, Vol. 5, 171-179, 1993.
- LI, Q & KUBOTA, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany** 67, 59–64, 2009.
- LI, Z.; JARRET, R.L.; PITTMAN, R.N.; DUNBAR, K.B. & DEMSKI, J.W. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Arachis paraguariensis* Chod. et Hassl. using a nurse culture method. **Plant Cellular, Tissue and Organism Culture**, v 34:83-90, 1993.
- LIMA, J.A.; PINTO, J.C.; EVANGELISTA, A.R. & SANTANA, R.A.V. Amendoim forrageiro (*Arachis pintoii* Krapov. & Gregory). Editora Universidade Federal de Lavras, Boletins de extensão. Disponível em: www.editora.ufla.br/index.php/boletins-tecnicos-e-de-extensao/boletinsdeextensao. Acesso em: 28 de março de 2015.
- LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; SILVA, G. S. B.; LIMA, D. E. S. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 17, n.1, p. 53-57, jan./mar., 2004.

LIN, K-H; HUANG, M-Y; HUANGC, W-D; HSUC, M-H; YANG, Z-W & YANG, C-M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v 150 86–91, 2013.

LIN, L-L.; LIEN, C-Y.; CHENG, Y-C. & KU, K-L. An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC couple with UV and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, 853, 175-182, 2007.

LOPES, R.M.; AGOSTINI-COSTA, T.S; GIMENES, M.A & SILVEIRA, D. Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 59, p. 4321–4330, 2011.

LOPES, R.M.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A.; VASCONCELOS, P.A.S.; ALVES, R.B.N.; SILVA, J.P. & AGOSTINI-COSTA, T.S. Characterization of resveratrol content in ten wild species of section *Arachis*, genus *Arachis*. **Genet Resour Crop Evol**, 60:2219-2226, 2013.

LUDWIG, R.L.; LOVATO, T.; PIZZANI, R.; GOULART, R.Z. & SHAEFER, P.E. Produção e Qualidade do *Arachis pintoi*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico conhecer, v. 6, n°11, 2010.

MAJEROWICZ, N. & PERES, L.E.P. Fotomorfogênese em Plantas In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**, 1°ed., Capítulo 19, p. 439, 2004.

MALUTA, F.A.; BORDIGNON, S.R.; ROSSI, M.L. & AMBROSONA, G.M.B.; RODRIGUES, P.H.V. Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.9, p. 1303-1307, 2013.

MANSUR, E.; PACHECO, G. & CARNEIRO, M.L.V. Conservação *in vitro* de germoplasma. In: A. Borém. (ORG). Domesticação e Melhoramento de plantas. **Viçosa: UFV**, p. 171-191, 2009.

MARQUES, R. V. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* em função de diferentes reguladores de crescimento**. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

MEDINA-BOLIVAR, F.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, C.; NOPO-OLAZABAL, L.; BAKER, J.; ATWILL, R.; ABBOTT, J.; DOLAN, M.; CARRIER, J.; SIVAKUMAR, G.; NAIR, V. & HUBSTENBERGER, J. Distinct Biosynthesis of resveratrol analogues in hairy root cultures of peanut and Muscadine Grape. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, V. 46, pp. 90-90, 2010b.

_____ RIMANDO, A.M; HUBSTENBERGER, J; SHELTON, K.; O'KEEFE, S.F.; BENNETT, S.; & DOLAN, M.C. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. **Phytochemistry**, V. 68, 1992–2003, 2007.

_____ DOLAN, M.; BENNETT, S.; CONDORI, J.; & HUBSTENBERGER, J. Production of stilbenes in plant hairy root cultures. **United States Patent**, No. 7,666-677, 2010 a.

_____ SRIVATSAN, M.; SIVAKUMAR, G.; BADANAVALU, M.; CONDORI, J.; DOLAN, M. Production and neuroprotective properties of natural resveratrol analogs from hairy root cultures of peanut. **In vitro Cellular & Developmental Biology** - Animal 44:S22-S22 ,2008.

MINI-VOCABULÁRIO TUPI-GUARANI. Disponível em:
www.povodearuanda.com.br. Acesso em: 16 de Setembro de 2016.

MROGINSKI, E; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M. & MROGINSKI, L.A. Thidiazuron Promotes *In vitro* Plant Regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via Organogenesis. **Journal Plant Growth Regul.**, 23:129–134, 2004.

MROGINSKI, L.A. & FERNANDEZ, A. Production of plantlets by anther culture *in vitro* of wild species of *Arachis* (Leguminosae). **Oleagineux**, v. 35, n.2, p89-92, 1980.

MUIR, R.M. & ZHU, L-J. Effect of light in the control of growth by auxin and its inhibitor in Sunflower. **Physiologia Plantarum**, v.57, p.407-410,1983.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A reversed medium for rapid growth and bioassays with Tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**,v 15:473-497, 1962.

NASCIMENTO, I.S. O cultivo do amendoim forrageiro. **Revista Brasileira de agrociências**, Pelotas, v.12, n°4, p. 387-393, 2006.

NETO, S.P.S. & ANDRADE, S.R.M. Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. Curso de biotecnologia aplicada à agropecuária, **Embrapa Cerrados**, 5° edição, 2013.

NHUT, D.T.; HONG, L.T.A.; WATANABE, H.; GOI, M. & TANAKA, M. Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source.**Acta Horticulture**,v575:117–124, 2002.

_____; TAKAMURA, T.; WATANABE, H. & TANAKA, M. Artificial light source using Light-emitting Diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. **Acta Horticulture**, v692, 2005.

- _____; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K & TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light emitting diode. **Plant Cellular, tissue and organism culture**, v.73, p.43-52, 2003.
- NHUT, D.T.; HUYNH, N. P.; TAI, N. T.; NAM, N. B.; LUAN, V. Q.; HIEN, V. T.; TUNG, H. T.; VINH, B. T. & LUAN, T. C. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.29, n.2, p.299-308, 2015.
- OGUTU, L.; NOPO-OLAZABAL, L. & MEDINA-BOLIVAR, F. Biosynthesis Enhancement of stilbenoids in hairy root cultures of peanut. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, Vol. 49, pp s50-S50, 2013.
- OHASHI-KANEKO, K.; TAKASE, M.; KON, N.; FUJIWARA, K. & KURATA, K. Effect of light quality on growth and vegetable quality in leaf lettuce, spinach and komatsuna. **Environmental Control Biology** 45, 189–198., 2007
- OKAMOTO, K.; YANAGI, T. & TAKITA, S. Development of plant growth apparatus using blue and red LED as artificial light source. **Acta Horticulture**. 440:111–116, 1996.
- OZIAS-AKINS, P.; ANDERSON, W.F. & HOLBROOK, C.C. Somatic embryogenesis in *Arachis hypogaea* L." genotype comparison". **Plant Science**, 83,103-111, 1993.
- PACHECO, G.; GAGLIARDI, R.F.; CARNEIRO, L.A.; VALLS, J.F.M. & MANSUR, E. *In vitro* regeneration and conservation of wild species of *Arachis*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 82(2) 311-315, 2007a.
- _____; CALLADO, C.H.; VALLS, J.F.M. & MANSUR, E. The role BAP in somatic embryogenesis induction from seeds explants of *Arachis* species from section *Erectoides* and *Procumbentes*. **Plant Cellular, tissue and organism culture**, 88:121-126, 2007b.
- _____; VALLS, J.F.M. & MANSUR, E. Plant regeneration in *Arachis stenosperma* Krapov. and W. C. Gregory from roots and calluses derived from leaflets of *in vitro* plants. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 44: 14-17, 2008.
- PARK, M-R.; BAEK, S-H.; KIM, Y-D.; YOO, N-H., JIN, I-D.; RHA, E-S.; KIM, J-K.; CHOI, K-G. & YUN, S. J. Content of Resveratrol in tissue of Peanut plant. **Bulletin of the Agricultural College**, v.34:55-61, 2003.

- PEREIRA, I.S. & SILVA, E.H. Diferentes qualidades de luz no cultivo *in vitro* de *Coffea arabica* L. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil: Águas de Lindóia, SP, Anais. Brasília, D.F : **Embrapa Café**, 2007.
- PEREIRA, R.J. & CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v.3, n^o4, pp 146-152, 2012.
- PHILLIPS, G.C. Invited Review: *In vitro* Morphogenesis In Plants – Recent Advances. **In vitro Cellular Developmental Biology plant** 40:342–345, 2004.
- PINTO, M.D.C.; GARCÍA-BARRADO, J.A. & MACÍAS, P. Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1653-1657, 2003.
- PRADO, E.A.; SECCHI, A.N. & MROGINSKI, L.A. Conservación de la capacidad caulogénica de calos de *Arachis major* (Leguminosae) durante prolongados subcultivos. **Turríalba**, v.38, n.3, p.249-254, 1988.
- RADOJKOVIĆ, M.; ZEKOVIĆ, Z.; MAŠKOVIĆ, P.; VIDOVIĆ, S.; MANDIĆ, A.; MIŠAN, A. & DUROVIĆ, S. Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, (117) 50-58, 2016.
- RAMALHO, J.C.; MARQUES, N.C.; SEMEDO, J.N.; MATOS, M.C. & QUARTIN, V.L. Photosynthetic performance and pigment composition of leaves from two tropical species is determined by light quality. **Plant Biology** 4, 112–120, 2002.
- RANI, A.S. & REDDY, G.M. Multiple shoot regeneration from de-embryonated cotyledons of cultivated and wild species of *Arachis*. **Journal of Genetics and Breeding**, v.50, n.4, p.351-355, 1996.
- RAO, P.V.S.; WADIA, K.D.R & STRANGE, R.N. Biotic and abiotic elicitation of phytoalexins in leaves of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49, 343-357, 1996.
- REY, H.Y & MROGINSKI, L.A. Regeneration of Plants from Apical Meristem Tips and Nodal Segments of *Arachis pintoii*. **Peanut Science**, 30:75-79, 2003.
- _____. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid and triploid *Arachis pintoii*. **Biologia plantarum** 50 (1): 152-155, 2006.
- _____; SCOCCHI, A.M.; GONZALEZ, A.M.; MROGINSKI, L.A. Plant regeneration in *Arachis pintoii* (Leguminosae) through leaf culture. **Plant Cell Reports**, 19:856-862, 2000.

- RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some process, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology** 24: 1-20, 1994.
- RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; SANTOS, J.W. & CARVALHO, J.M.F.C. Efeito do thiadizuron na microprogagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 14(4): 366-371, 2010.
- RIBEIRO, M.N.O.; PASQUAL, M.; SILVA, A.B. & RODRIGUES, V.A. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural, Santa Maria**, 39(8): 2388-2393, 2009.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J. & PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biology and Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- ROCHA, P.S.G.; OLIVEIRA, R.P.; SAVITTARO, W.B. & SANTOS, U.L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, 40(9):1922-1928, 2010.
- RODRIGUES-BRANDÃO, I.; KLENOWSKE, A.M.; EINHARDT, A.M.; LIMA, M.C.; AMARANTE, L.; PETERS, J.A. & BRAGA, E.J.B. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*. **Ciencia Rural**, v.44, n°10, Santa Maria, 2014.
- RODRÍGUEZ-SAHAGÚN, A.; ACEVEDO-HARNÁNDEZ, G.; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUES, J.M.; RODRÍGUEZ-GARAY, B.; CERVANTES-MARTÍNEZ, J.; CASTELLANOS-HERNÁNDEZ, O.A. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. azul. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 104(2):271-275, 2011.
- ROLFS, C.H.; FRITZEMEIER, K.H.; KINDL, H. Cultured cells of *Arachis hypogaea* susceptible to induction of stilbene synthase (resveratrol-forming). **Plant Cell reports**, v.1, p. 83-85, 1981.
- _____; SCHÖN, H.; STEFFENS, M.; KINDL, H. Cell-suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. **Planta**, v.172, n.2, p. 238-244, 1987.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A. & SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANDERS, T.H; MCMICHAEL, R.W & HENDRIX, K.W. Occurrence of resveratrol in edible peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 48(4):1243-6, 2000.

SANTANA, I.G.; SEVERO, I.L.; ALMEIDA, L.C.; PEREIRA, P.I.R.M.; SILVA, E.M. & BARRA, M.T.F. Determinação do perfil cromatográfico de extratos secos vegetais. **Revista Eletrônica de farmácia**. V4, n2, p. 54-57, 2007.

SANTANA, S.H. **Revisão taxonômica das secções Heteranthae Krapov. & W.C. GREG e Triseminatae Krapov. & W.C. GREG. Do gênero Arachis L.(Fabaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, DF, 2013.

SANTOS, G.C.L. **Análise fitoquímica e avaliação da atividade biológica de plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de cultivares brasileiras de *Arachis hypogaea* L. (amendoim)**. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

SANTOS, R.R. **Cultura de tecidos e avaliação do efeito da qualidade de luz na morfogênese *in vitro* de *Arachis repens* Handro**. Monografia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

SAPTARINI, N.M.; WARDATI, Y. & JULIAWATI, R. Antioxidant activity of extract and fraction of yellow passion fruit (*Passiflora flavicarpa*) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol.5, Issue 2, 2013.

SASS, J.E. Elements of botanical microtechnique. McGraw-Hill, **Book company Inc, London**, New York, pp. 1-222, 1958.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G. & HECKTHEUER, L.H. Determinação de Resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(3): 437-442, 2005.

SCHÖPPNER, A. & KINDL, H. Purification and properties of stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. **Journal Biology Cheme**. 259. 6806-6811,1984.

SEIBERT, F.; WETHERBEE, P.J. & JOB, D.D. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. **Plant Physiology**, v.56, p 130-139, 1975.

SELLARS, R.M.; SOUTHWARD, G.M. & PHILLIPS, G.C. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. **Crop Sci**. 30: 408–414, 1990.

SHÄFFER, C.C. **Mapeamento espacial e modelagem da distribuição do gênero *Arachis* (Fabaceae) no Brasil e análise da ocorrência em unidades de conservação.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, DF, 2012.

SHIN, E. C.; PEGG, R. B.; PHILLIPS, R. D. & EITENMILLER, R. R. Commercial Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars in the United States: Phytosterol Composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, p.161-167, 2010.

SILVA, A. S. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de luz em meio com 2,4-D, BAP, TDZ e cinetina.** Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

SILVA, A.S.; LUZ, J.M.Q.; RODRIGUES, M.; BITTAR, C.A. & LINO, L.O. BAP, 2,4-D and acetyl-salicylic acid on the callus induction and differentiation in *Coffea arabica* L. anthers. **Ciência agrotecnologia**, vol.33, no.5, Lavras, 2009.

SILVA, H. E & FERREIRA, G. B. Efeito de diferentes concentrações de BAP na Indução de embriões somáticos em calos oriundos de anteras de café. In: **Congresso regional de biotecnologia avanços e aplicações**, 2006.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S. & KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, R.P.; MENDES, B.M.J. & MOURÃO-FILHO, F.A.A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.43, n.10, p.1331-1337, 2008.

SILVA, S.C. **Caracterização citogenética, molecular e morfológica de acessos do gênero *Arachis* com ênfase na secção *Heteranthae*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE p. 98, 2007.

SILVA, S.C; MARTINS, M.I. G; SANTOS, R.C.; PEÑALOZA, A.P.S.; FILHO, P.A.M.; BENKO-ISEPPON, A.M.; VALLS, J.F.M. & CARVALHO, R. Karyological features and banding patterns in *Arachis* species belonging to the *Heteranthae* section. **Plant Syst Evol** 285: 201-207, 2010.

SILVA, G.S. **Contribuição a taxonomia do gênero *Arachis*- Secção *Arachis* à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, p. 17, 2008.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; E LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 299, p.152-178, 1999.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J. & FETT, R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. **Ciência Tecnologia e Alimentos**, vol.28 no.3, 2008.

SOBOLEV, V. S.; COLE, R. J.; DORNER, J. W. Isolation, purification, and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. **Journal of AOAC Internacional**, 78, 1177-1182, 1995.

_____. Localized production of phytoalexins by Peanut (*Arachis hypogaea*) kernels in response to invasion by *Aspergillus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 1949-1954, 2008.

_____; KHAN, S.I.; TABANCA, N.; WEDGE, D.E.; MANLY, S.P.; CUTLER, S.J.; COY, M.R.; BECNEL, J.J.; NEFF, S.A. & GLOER, J.B. Biological activity of Peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and select natural and synthetic stilbenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, 59, 1673-1682, 2011.

SORGATO, J.C.; ROSA, Y.B.C.J.; SOARES, J.S.; LEMES, S.R. & SOUSA, G.G. Light in intermediate acclimatization of *in vitro* germinated seedlings of *Dendrobium phalaenopsis* Deang Suree. **Ciência Rural**, v.45, n.2, 2015.

SOUSA, I.B. **Cultura de tecidos, análise fitoquímica e determinação da atividade antioxidante de extratos de sementes, plantas *in vivo* e materiais obtidos *in vitro* de *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.** Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

SRINAVASAN, T.; KUMAR, K.R.R. & KIRTI, P.B. Establishment of efficient and rapid regeneration system for some diploid wild species of *Arachis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 101:303–309, 2010.

STILL, P.E.; PLATA, M.I.; CAMPBELL, R.J.; BUENO, L.C.; CHICHESTER, E.A. & NIBLETT, C.L. Regeneration of fertile *Arachis paraguariensis* plants from callus and suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.9, p.37-43, 1987.

TOLLETT, C.A.; NOPO-OLAZABAL, L. & MEDINA-BOLIVAR, F. Production of stilbenoids in hairy roots cultures of peanut and their purification by high performance counter current chromatography. **Conference paper in ACS national Meeting book of Abstracts**, v. 247, 2014.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BURSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M. & ROMANO, R. Glossário de biotecnologia vegetal. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, p. 36, 2000.

VALENTIM, J.F. Potencial forrageiro de acessos de *Arachis* sp. nas condições ambientais do Estado do Acre. **Boletim de Pesquisa**, n 10, ISSN 0101-0565, 1996.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociencia**, Vol. 9 N° 1 y N° 2 pág.123 – 132, 2005.

_____. *Arachis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: //floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29478. 2015.

_____. O gênero *Arachis* L. (Leguminosae): importante fonte de proteína na pré-história sul-americana? In: Reunião científica da Sociedade de Arqueologia Brasileira, 8, Porto Alegre. **Coleção Arqueologia**, n°1, v2, p.256-280, 1996.

_____. & SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolívia. **Bonplandia**, 14: 35-64, 2005.

_____. & SIMPSON, C.E. Taxonomy, natural distribution and attributes of *Arachis*. In: Kerridge, P.C. e Hardy, B. (eds.). **Biology and Agronomy of forage Arachis**. Cali, CIAT, 1-18, 1994.

_____; SILVA, G.P.; MONÇONATO, L. Diversidade genética no gênero *Arachis* e a origem do amendoim. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17, Piracicaba: **ESALQ/Depto. De Genética**, 19-33, 2000.

VEIGA, R.F. A VALLS, J. F.M.; TOMBOLATO, A.F.C.; BARBOSA, W & PIRES, E.G. Amendoins silvestres para uso ornamental. **Revista Brasileira Horticultura Ornamental**,v.9, n.1, p.7-15, 2003.

VELLOSO, M.A.L.; ABREU, I.N. & MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* choisy crescend *in vitro*. **ACTA Amazônica**, v.39, p. 267-272, 2009.

VIDOZ, M.L.; REY, H.Y.; GONZALEZ, A.M. & MROGINSKI, L.A. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). **Physiological plantarum**, Vol. 26, N°1, 59-66, 2004.

_____; KLUSACEK, P.; REY, H.Y. & MROGINSKI, L.A. *In vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86:111–115, 2006.

VILLAREAL, M.L.; ARIAS, C; VEJA, J; FERIA-VELASCO, A; RAMIREZ, O.T; NICASIO, P; ROJAS, G; QUINTERO, R. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* - a plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cellular Tissue and Organism Culture** 50: 39-44,1997.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.& WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**, Documentos 316, 2010.

VUONG, T.V.; FRANCO, C. & ZHANG, W. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. **Biotechnology Reports**, v 1–2, pp 15–21, 2014.

WAGNER, H. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 1996.

WU, H-C & LIN, C-C. Red Light-emitting Diode Light Irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. **HortScience**, 47(10): 1490-1494, 2012.

YANAGI, T. & OKAMOTO, K. Utilization of super-bright light emitting diodes as an artificial light source for plant growth. **Acta Horticulture** 418:223–228, 1997.

YANG, M. H.; LIN, Y.J; KUO, C.H & KU, K.L. Medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* as a potent elicitor in production of t-resveratrol and t-piceatannol in peanut calluses. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 9518–9522, 2010a.

_____; KUO, C.H; HSIEH, W.C & KU, K.L. Investigation of microbial elicitation of trans-resveratrol and trans-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 58(17):9537-41, 2010b.

_____; LIN, Y-J.; KUO, C-H. & KU, K-L. Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* as a Potent Elicitor in Production of t-Resveratrol and t-Piceatannol in Peanut Calluses. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 58, 9518–9522, 2010 a.

_____; KUO, C-H; HSIEH, W-C & KU, K-L. Investigation of Microbial Elicitation of trans-Resveratrol and trans-Piceatannol in Peanut Callus Led to the Application of Chitin as a Potential Elicitor. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 58, 9537–9541, 2010b.

YANG, T.; FANG, L.; NOPO-OLAZABAL, C.; CONDORI, J.; NOPO-OLAZABAL, L.; BALMACEDA, C.; MEDINA-BOLIVAR, F. Enhanced Production of Resveratrol, Piceatannol, Arachidin-1, and Arachidin-3 in Hairy Root Cultures of Peanut Co-treated

with Methyl Jasmonate and Cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 63(15), 2015.

_____; RIMANDO, A.M.; SOBOLEV, V.; MOCKAITIS, K.; MEDINA-BOLIVAR, F. Characterization of stilbenoid-specific prenyltransferase activity in peanut hairy roots. **Plant Physiology Preview**, pp.16.00610, 2016

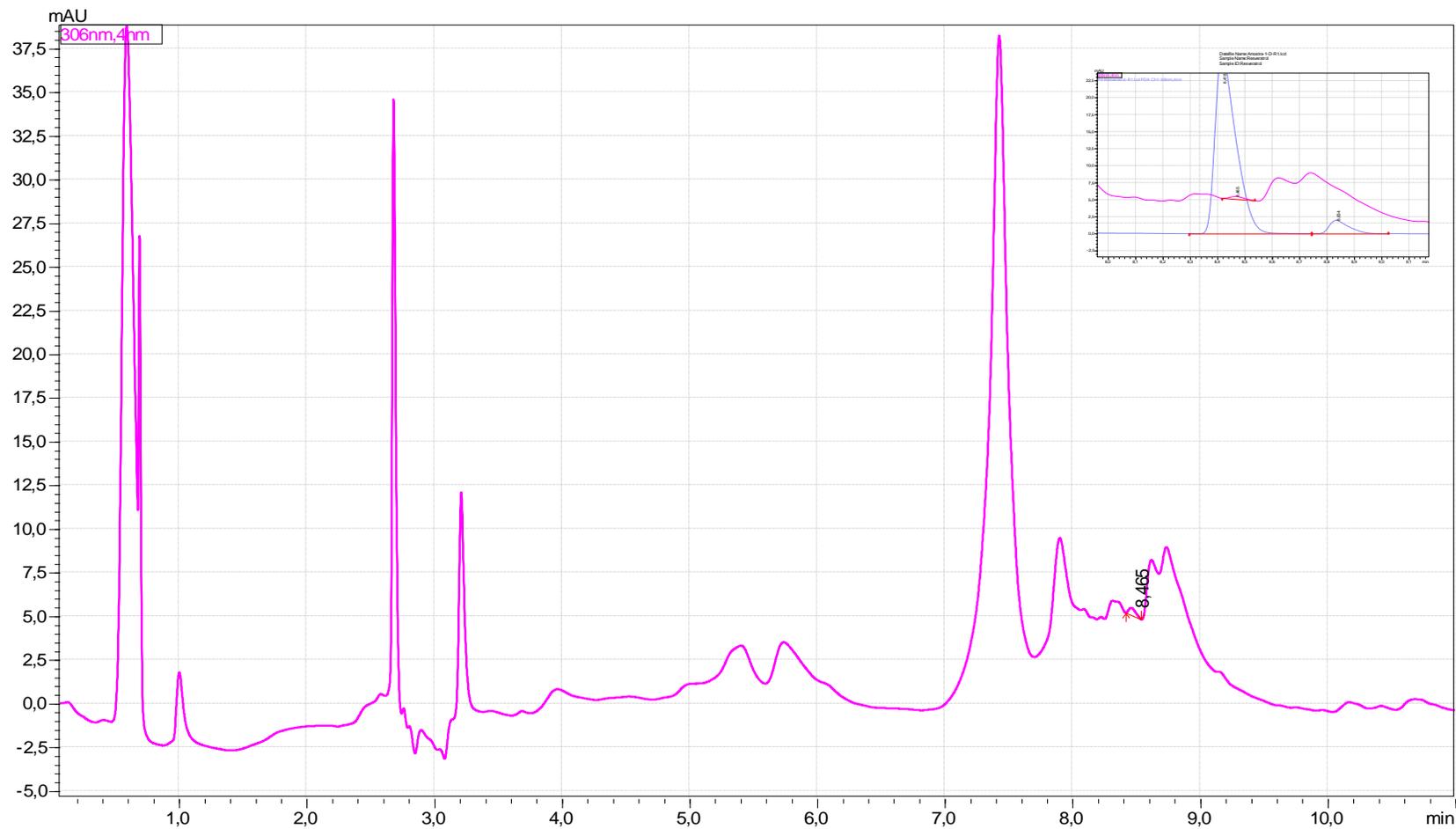
YAO, Q-S.; SHAN, C-M.; JIANG, J-G.; WU, Y-Y. & YU, M. High frequency induction of hairy roots and effect of NAA and 2,4-D on peanut hairy roots growth and resveratrol content. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2012.

YONG, C.J; MO, S.D; MAN, K.J.; SEOK, S.B.; YUL, Y.S.; WOON, K.B.&GU, H.B. Effects of LEDs on the germination, growth and physiological activities of amaranth sprouts. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology** , v.26, n.2 pp.106-112, 2008.

ZHANG CX, LI Q, KONG L. Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 91:273-280, 2007.

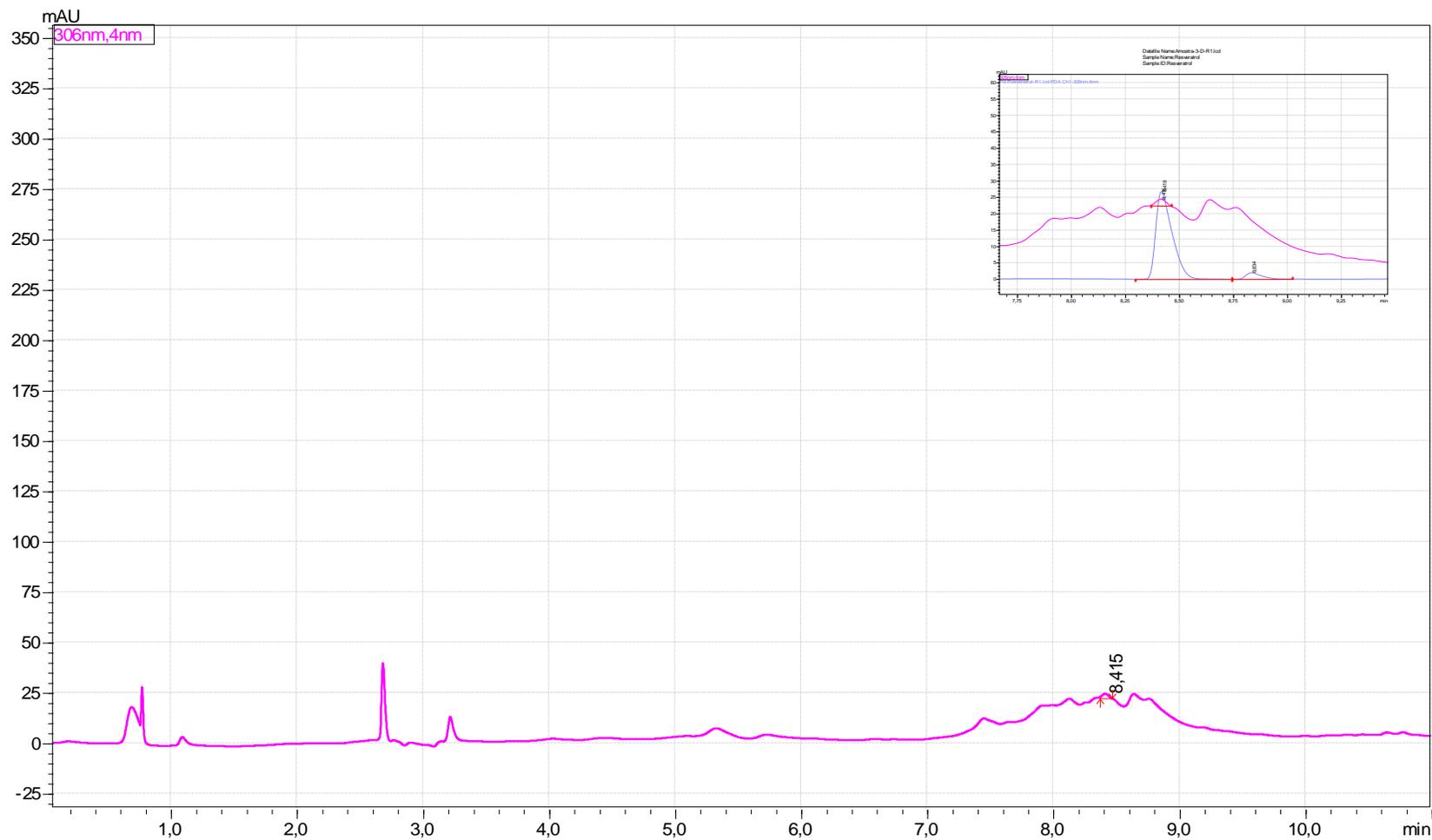
ZHIJIAN, L; JARRET, R.L; PITTMAN, R.N.; DUNBAR, K.B. & DEMSKI, J.W. Efficient plant regeneration from protoplasts of *Arachis paraguariensis* Chod. et Hassl. using a nurse culture method. **Plant cellular tissue and organism culture**, v. 34, Issue 1, pp 83–90, 1993.

APÊNDICE A - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob luz fluorescente branca



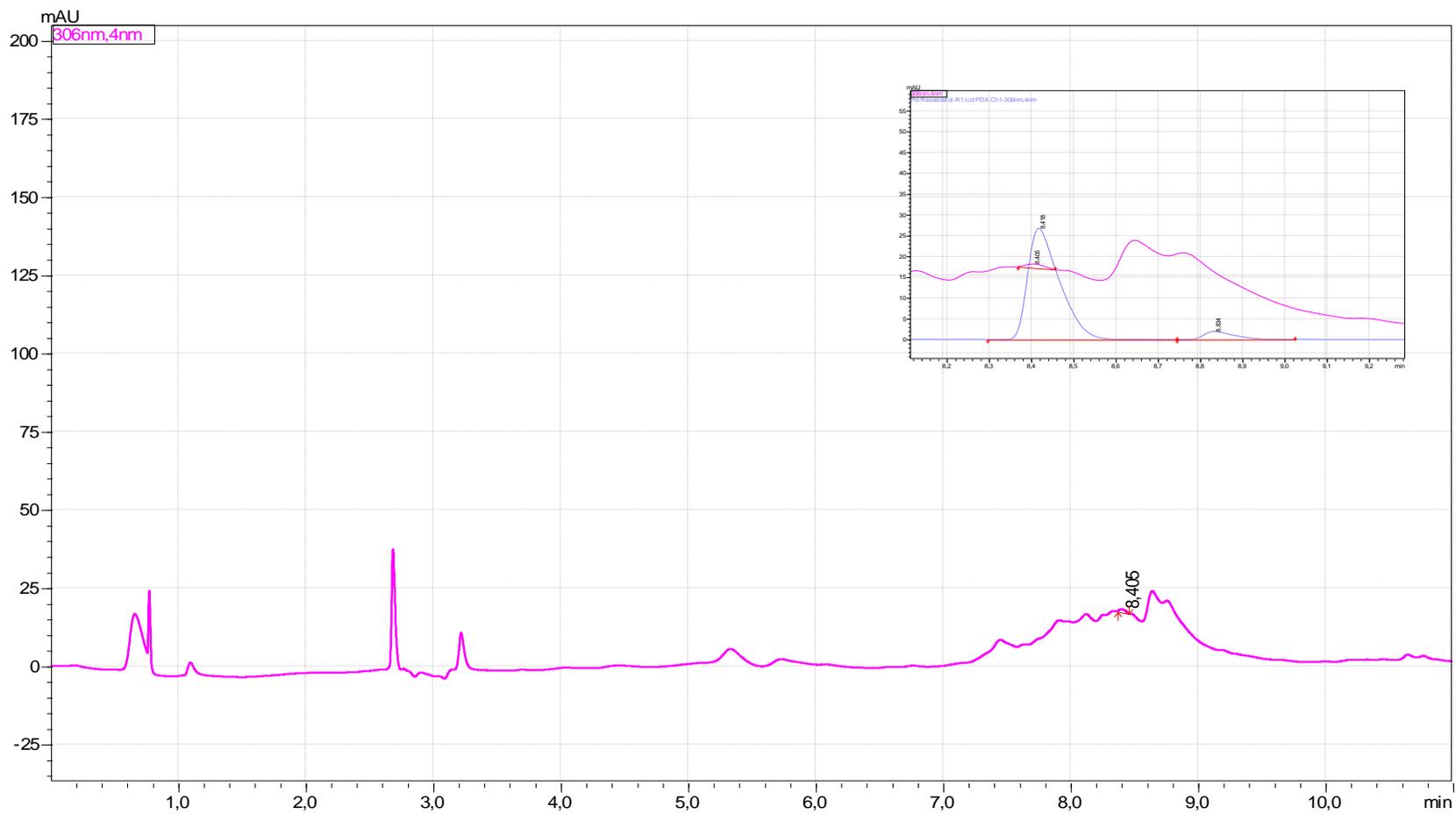
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE B - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED azul.



Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans-resveratrol*; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE C -Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED azul.



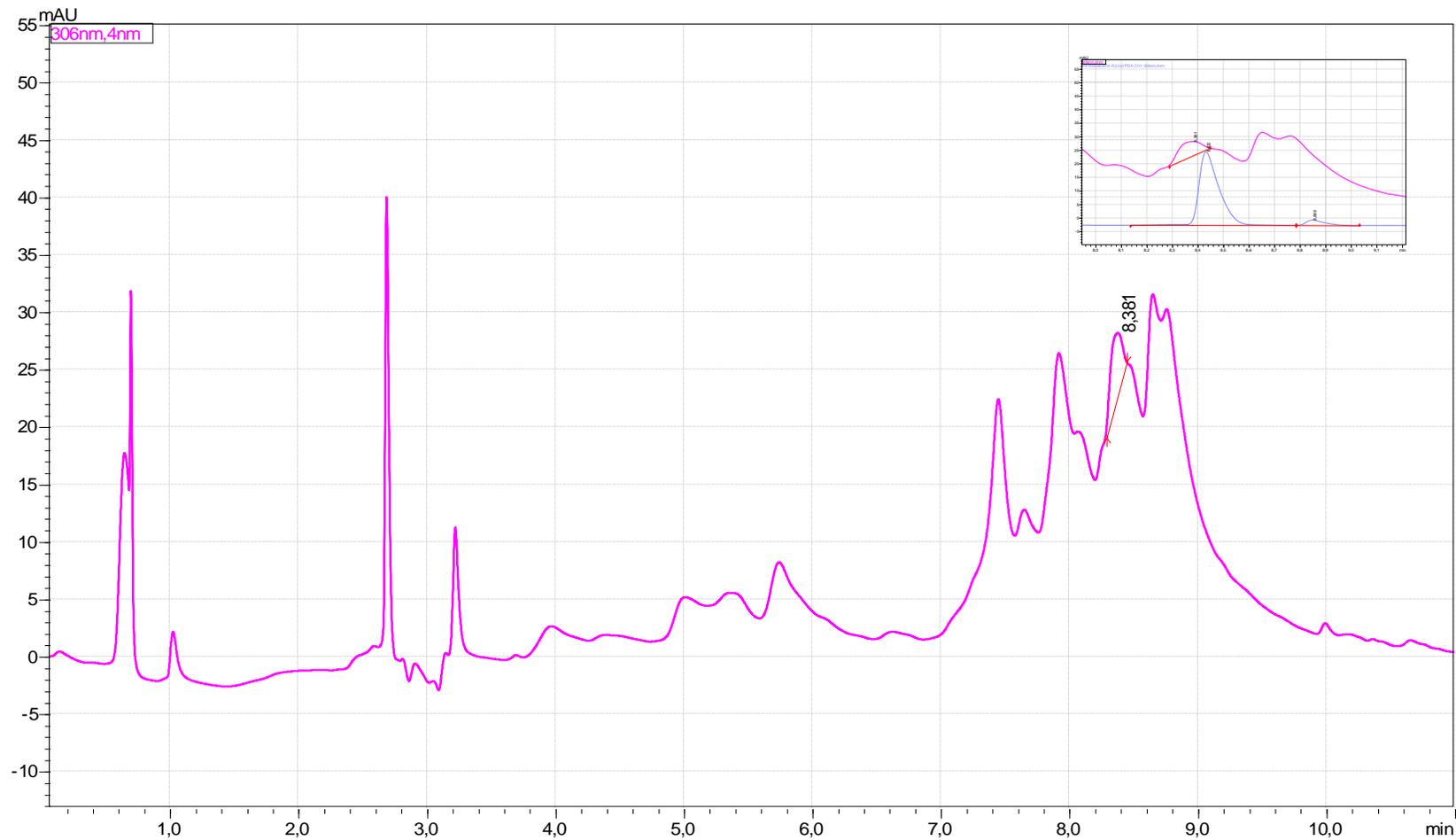
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE D - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED misto.



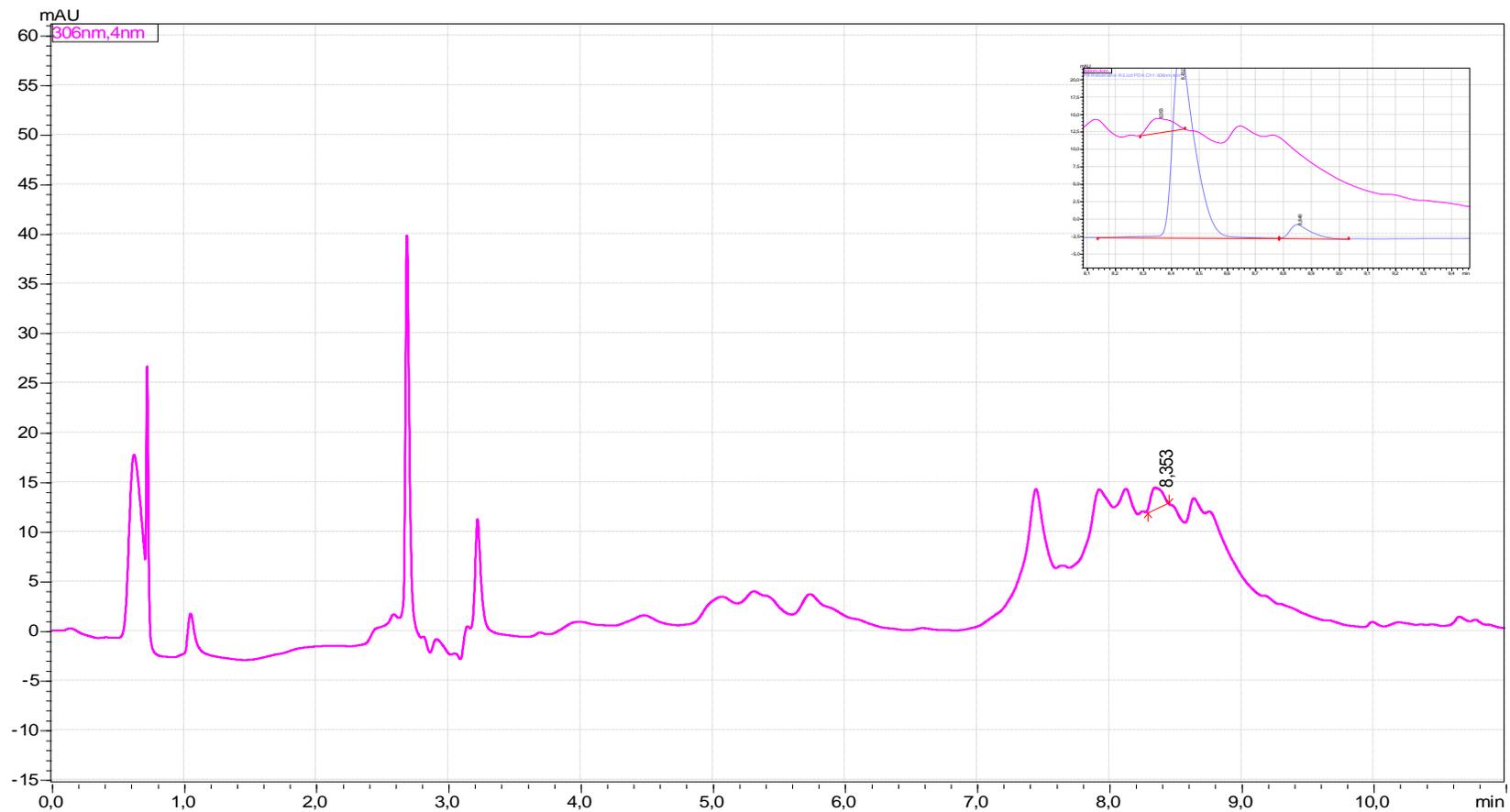
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans-resveratrol*; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE E - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED branco.



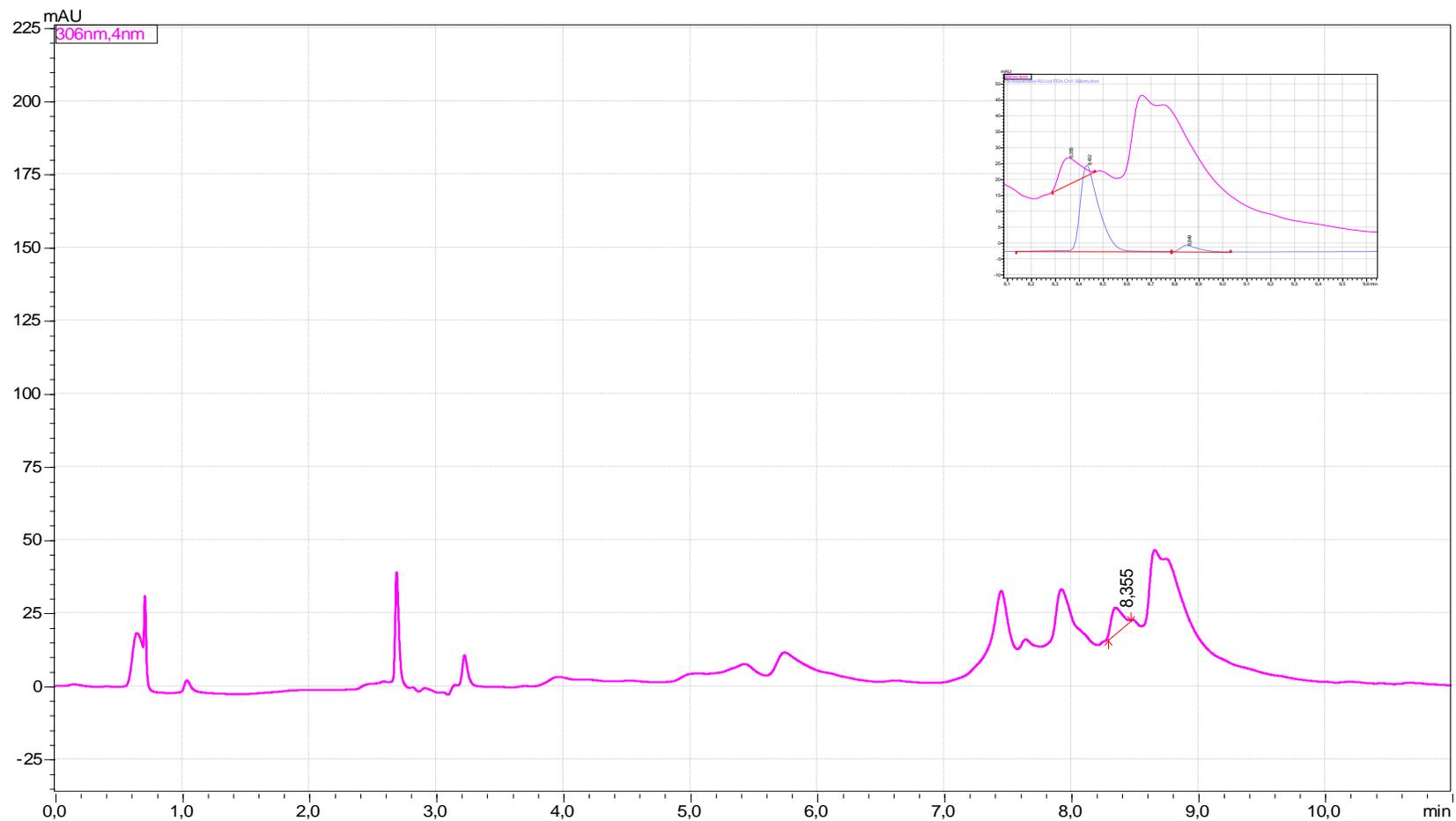
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE F - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED branco.



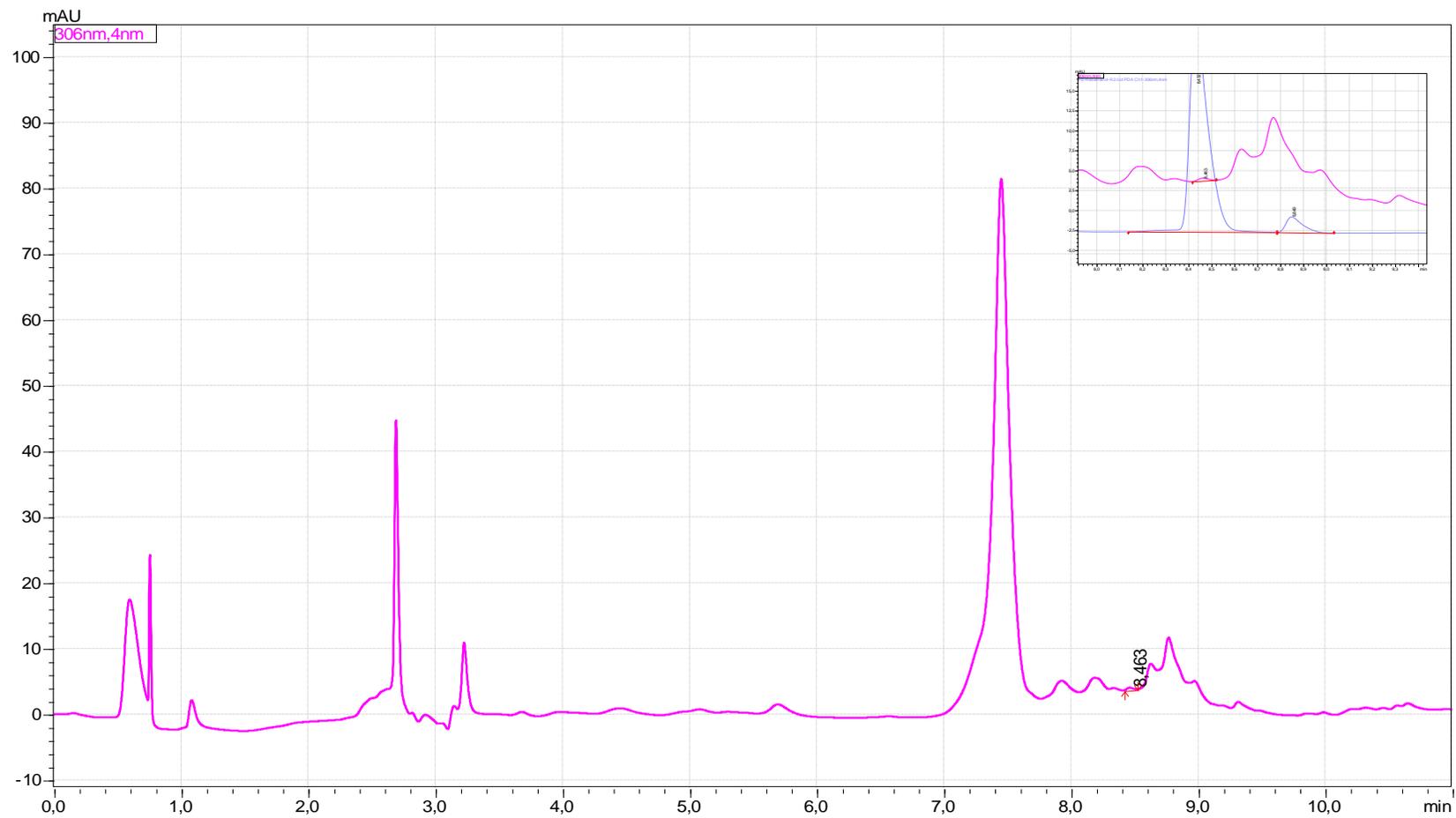
Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans-resveratrol*; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE G - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos nodais incubados sob LED vermelho.



Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*

APÊNDICE H - Perfil cromatográfico dos extratos etanólicos oriundos de segmentos internodais incubados sob LED vermelho.



Legenda: Linha azul- padrão comercial do *trans*-resveratrol; Linha rosa- extrato etanólico de calos de *A. repens*